

УДК 581.1

Биотехнологические подходы в создании растений, толерантных к гипоксии и аноксии

Б. Б. Вартапетян¹, Ю. И. Долгих¹, Л. И. Полякова¹, Н. В. Чичкова², А. Б. Вартапетян²¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, Ботаническая ул., 35²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

E-mail: borisvartapet@ipppras.ru

Поступила в редакцию 06.08.2013

После доработки 19.03.2014

РЕФЕРАТ Представлены результаты ряда работ, направленных на создание клеточных линий, а также целых растений, устойчивых к анаэробному стрессу. В основу разработанных биотехнологических подходов легли более ранние фундаментальные исследования анаэробного стресса растений, поэтому во «Введении» кратко отмечена актуальность самой проблемы, подчеркнута значимость работ, в которых рассмотрены две главные стратегии адаптации растений к анаэробному стрессу – адаптации на молекулярном уровне, в которой ключевую роль играет анаэробный энергетический метаболизм (истинная толерантность), и адаптации на уровне целого организма растений путем формирования аэренхимы и облегченного транспорта кислорода (кажущаяся толерантность). Так, путем ступенчатой клеточной селекции *in vitro*, проведенной в условиях аноксии в отсутствие экзогенных углеводов, были выделены толерантные к анаэробному стрессу клетки сахарного тростника и пшеницы. Из толерантных клеток пшеницы были регенерированы целые растения, более устойчивые к корневому анаэробно-биозу. Показано, что в толерантности клеток к аноксии существенную роль играет способность более активно утилизировать экзогенный нитрат. Толерантность клеток закреплялась на генном уровне и передавалась в ряду поколений. Рассмотрены также другие успешные попытки повысить толерантность растений к анаэробному стрессу путем сверхэкспрессии генов, ответственных за синтез цитокинина и за программированную клеточную смерть, а также благодаря стимуляции гликолиза. Представленные данные подтвердили концепцию о двух главных стратегиях адаптации растений к анаэробному стрессу, выдвинутую ранее на основе фундаментальных исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА анаэробный стресс, индекс роста, клеточная селекция *in vitro*, программированная клеточная смерть, трансгенные растения, ультраструктура митохондрий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПДК – пируватдекарбоксилаза; АДГ – алкогольдегидрогеназа.

ВВЕДЕНИЕ

Растения – облигатные аэробы, поэтому дефицит кислорода в среде (гипоксия), а особенно его полное отсутствие (аноксия), вызывают экстремальный экологический стресс. Между тем, в естественных условиях, а также в результате деятельности человека растения нередко подвергаются резкому дефициту молекулярного кислорода. Чаще всего кислородную недостаточность растения испытывают на переувлажненных и затопленных почвах, ввиду малой растворимости и низкой скорости диффузии кислорода в воде [1, 2]. В настоящее время переувлажненные земли занимают обширные территории во многих странах [3–5]. Предполагается, что таяние в зоне вечной мерзлоты,

а также полярных льдов и, как следствие этого, подъем уровня Мирового океана могут привести к затоплению обширных регионов нашей планеты. Дефицит кислорода наблюдается также на плотных почвах [6]. Наиболее уязвимы в этом отношении корни и семена растений. В северных странах и в странах с умеренным климатом из-за образования газонепроницаемой ледяной корки на поверхности почвы или растений в осенний и зимний периоды страдают озимые злаки и многолетние растения [7]. Анаэробный стресс приводит к повреждению и даже к массовой гибели сельскохозяйственных культур и дикорастущих растений, нанося тем самым существенный экологический и экономический ущерб.

Проблема гипоксии и аноксии актуальна и в связи с необходимостью длительного хранения сельскохозяйственных продуктов: плодов, зерна, овощей [8].

В последние десятилетия интерес к изучению анаэробного стресса растений резко повысился не только у физиологов и биохимиков, но и у молекулярных биологов и генетиков. Постоянно увеличивается количество публикаций, а также проводимых под эгидой Международного общества по анаэробному стрессу растений (ISPA) конференций, посвященных изучению гипоксии и аноксии растений. Проблема анаэробного стресса обсуждается в многочисленных специальных выпусках международных журналов (см. *Annals of Botany* (special section). 1994. V. 74. № 3. Ed. Jackson M.B.; *Annals of Botany* (special Issue). 1997. V. 79. Ed. Jackson M.B.; *Annals of Botany* (special section). 2002. V. 90. № 4. Ed. Smirnov N.; *Annals of Botany* (special Issue). 2003. V. 91. Eds Visser E., Voeselek L.A.C.J., Jackson M.B.; Физиология растений (специальный выпуск). 2003. Т. 50. № 6. Ред. Вартапетян Б.Б.; *Annals of Botany* (special Issue). 2005. V. 96. Ed. Jackson M.B.; *Annals of Botany* (special Issue). 2009. Eds Jackson M.B., Ishizawa K., Ito O.; *New Phytologist* (special Issue). 2011. V. 190. № 2. Eds Perata P., Armstrong W., Voeselek L.A.C.J.), а также в ряде монографий [9–14], подготовленных членами ISPA, которые сыграли важнейшую роль в дальнейшем развитии этого направления науки.

Активно разрабатывается общепризнанная в настоящее время концепция о двух главных стратегиях адаптации растений к анаэробному стрессу: адаптации на молекулярном уровне, которая реализуется в отсутствие или при дефиците кислорода благодаря капитальной перестройке клеточного метаболизма, и адаптации на уровне целого растения благодаря транспорту кислорода из аэрируемых частей растения в органы (корни, корневище), которые находятся в бескислородной среде, т.е. стратегии избегания, обхода анаэробного стресса. Становится все более очевидной ключевая роль энергетики клетки как в метаболической адаптации, так и в повреждении растений в условиях анаэробного стресса.

Высокая чувствительность растений к дефициту кислорода, особенно к полному его отсутствию, объясняется тем, что высшие растения, будучи облигатно аэробными, для нормальной жизнедеятельности нуждаются в постоянном присутствии доступного молекулярного кислорода в окружающей их внешней среде.

Тем не менее многие виды растений, преимущественно дикорастущие, в процессе эволюции приобрели способность к временному или постоянному обитанию на переувлажненных и даже затопленных анаэробных почвах [15, 16]. Среди культурных

растений исключением является рис *Oryza sativa* L., который, как известно, выращивается преимущественно на затопленных почвах [17–19]. Однако даже растения риса нередко сильно страдают от анаэробного стресса, когда проростки оказываются полностью затопленными, как это бывает в муссонный период в Восточной и Юго-Восточной Азии [20].

Выработанная в процессе эволюции или искусственной селекции способность многих растений временно или постоянно обитать на затопленных анаэробных почвах свидетельствует об актуальности и целесообразности как фундаментальных исследований в этой области, направленных на выяснение молекулярных механизмов адаптации растений, так и прикладных подходов, в частности биотехнологических методов (геновая и клеточная инженерия) создания толерантных к анаэробному стрессу растений. Исследования в этой области были, однако, в основном фундаментальными, они подготовили серьезную базу для того, чтобы перейти к более активному изучению прикладных проблем анаэробного стресса, в частности к разработке биотехнологических методов и подходов к созданию растений, толерантных к гипоксии и аноксии, в чем и состояла цель рассмотренных в нашем обзоре работ.

В настоящем обзоре обсуждаются биотехнологические подходы, разработанные на основе более ранних фундаментальных исследований в этой области, в частности на концепции о двух главных стратегиях адаптации растений к анаэробному стрессу [15–17, 21, 22]. В основу одного из таких подходов легли результаты исследований, показавшие ключевую роль анаэробного энергетического метаболизма (гликолиз и брожение), а также метаболизма углеводов в адаптации растений к анаэробному стрессу [21–24]. Исходя из этих представлений путем селекции *in vitro* в отсутствие экзогенных углеводов получены клеточные линии сахарного тростника *Saccharum officinarum* L. [22, 25] и пшеницы *Triticum aestivum* L. [26, 27], заметно более толерантные к аноксии, чем исходные каллусные клетки. Из более толерантных клеток *T. aestivum* L. были затем регенерированы целые растения, которые, как показало выращивание на затопленной почве, оказались устойчивыми и к почвенному анаэробному стрессу.

Рассмотрены также результаты опытов по селекции клеток растений *in vitro*, в которых выявлена защитная роль экзогенного нитрата как возможного альтернативного акцептора электронов в экстремальных условиях аноксии [28].

С учетом представлений о ключевой роли энергетического метаболизма в адаптации растений к анаэробному стрессу изучена возможность повышения

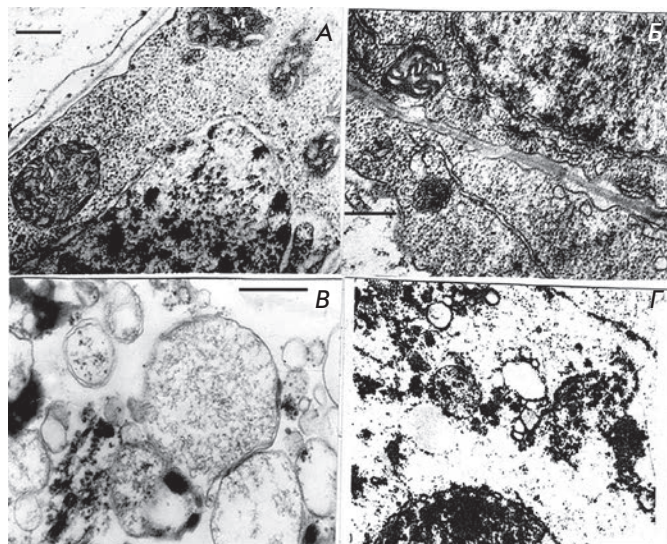


Рис. 1. Ультраструктура клеток каллуса чувствительной линии *S. officinarum* в условиях аноксии в отсутствие экзогенной глюкозы. А – контроль; Б – 24 ч анаэробной инкубации; В – 48 ч; Г – 72 ч анаэробной инкубации. М – митохондрия, масштабная линейка 0.5 мкМ

толерантности растений путем сверхэкспрессии в них генов пируватдекарбоксилазы (ПДК) и алкогольдегидрогеназы (АДГ) [29–32].

Другой биотехнологический подход, также успешно использованный для получения растений, более толерантных к почвенному затоплению [33], принципиально отличался от приведенных выше подходов. В этом случае за основу взяли другой широко известный факт, а именно реакцию большинства чувствительных к гипоксии и аноксии растений к анаэробному стрессу: затопление почвы на ранних этапах приводит к увяданию и старению надземных органов растений, а затем уже к их гибели. С другой стороны, хорошо известно, что старение растений в определенной степени регулируется гормонально: цитокинины существенно способствуют омоложению стареющих надземных органов [34, 35]. Учитывая эти обстоятельства, была сделана попытка усилить потенциальную способность растений к синтезу цитокинина и тем самым повысить их устойчивость к анаэробному стрессу путем переноса в растение бактериального гена *ipt*, ответственного за синтез этого гормона [26, 33].

Возможность повышения толерантности растений к анаэробному стрессу изучали также на трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum* Samsun NN с повышенной активностью недавно открытого фермента фитаспазы [36–38], который участвует в осу-

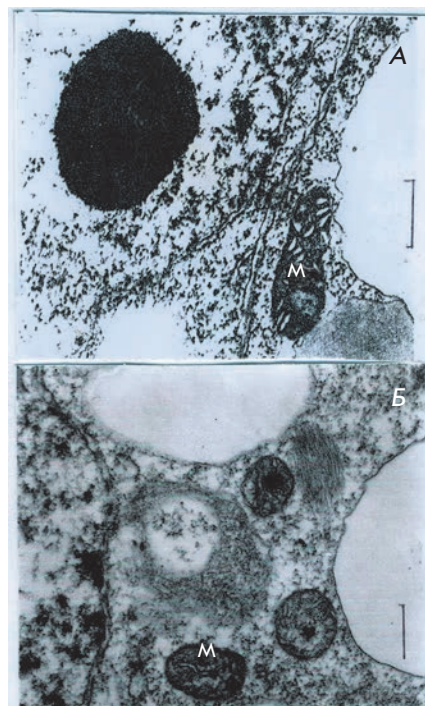


Рис. 2. Ультраструктура клеток каллуса чувствительной линии *S. officinarum* в условиях аноксии и в присутствии 3% глюкозы. А – контроль; Б – 96 ч анаэробной инкубации. М – митохондрия, масштабная линейка 0.5 мкМ

ществлении запрограммированной клеточной смерти растений. Интерес к трансгенным растениям табака возник в связи с более ранними исследованиями [15, 17, 22], в которых была продемонстрирована не метаболическая адаптация на молекулярном уровне, а принципиально иная стратегия адаптации растений к анаэробной среде – формирование аэренхимы и избегание анаэробноза благодаря дальнему транспорту кислорода, т.е. адаптация на уровне целого организма.

СЕЛЕКЦИЯ *in vitro* КЛЕТОК САХАРНОГО ТРОСТНИКА *Saccharum officinarum*, ТОЛЕРАНТНЫХ К АНАЭРОБНОМУ СТРЕССУ

Как было отмечено, основой этого биотехнологического подхода стали результаты исследований, в которых установлена ключевая роль анаэробного энергетического и углеводного метаболизма в толерантности различных органов растений к гипоксии и аноксии [15–17, 21–24]. Ключевую роль анаэробного энергетического и углеводного метаболизма в толерантности к аноксии подтверждают также представленные здесь электронно-микроскопические исследования ультраструктуры митохондрий клеток каллусов сахарного тростника, которые переносили из аэробной среды в анаэробную в отсутствие и в присутствии экзогенной глюкозы в среде (рис. 1 и 2). Степень толерантности клеток к анаэробному стрессу определяли

Таблица 1. Индексы роста каллуса сахарного тростника, прошедшего анаэробную инкубацию разной продолжительности на среде без глюкозы, после культивирования в условиях нормальной аэрации в течение 1 месяца

Анаэробная инкубация, ч	Индекс роста	% от контроля
0	4.63 ± 0.50	100
6	2.35 ± 0.25	50.7 ± 5.4
24	1.47 ± 0.15	31.7 ± 3.2
48	0.60 ± 0.09	13.0 ± 2.0
72	0.55 ± 0.10	11.8 ± 2.2
96	0.16 ± 0.01	3.5 ± 0.32

путем электронно-микроскопического изучения ультраструктуры митохондрий, весьма чувствительных к отсутствию кислорода. В условиях дефицита кислорода возникают довольно характерные изменения ультраструктуры мембран митохондрий.

В отсутствие экзогенных углеводов в среде клетки, выдержанные в течение 24 ч в условиях аноксии (рис. 1Б), не имели существенных отличий в ультраструктуре митохондрий и других органелл от контрольных (рис. 1А) клеток в аэробных условиях. При более длительном анаэробии (48 ч) деструктивные явления в митохондриях и других органеллах становились явными (рис. 1В). Аноксия в течение 72 ч приводила к полной деградации как митохондрий, так и других клеточных органелл (рис. 1Г).

Напротив, в присутствии 3% глюкозы в среде деструктивные изменения в ультраструктуре митохондрий и других клеточных органелл отсутствовали даже при анаэробии в течение 96 ч (рис. 2Б).

Наряду с электронно-микроскопическими наблюдениями мы оценивали также способность клеток каллусов восстанавливать рост в постанаэробный период в условиях нормальной аэрации, т.е. определяли индекс роста каллусов (разница между конечной массой и начальной, деленной на начальную) после 1 месяца культивирования в нормальных условиях.

Результаты этих опытов показали, что в отсутствие экзогенных углеводов по мере продления анаэробии у клеток существенно снижается индекс постанаэробного роста, приближаясь к нулю при анаэробии в течение 96 ч (табл. 1).

Толерантность клеток к аноксии существенно повышалась, когда клетки подкармливали экзогенной глюкозой (табл. 2).

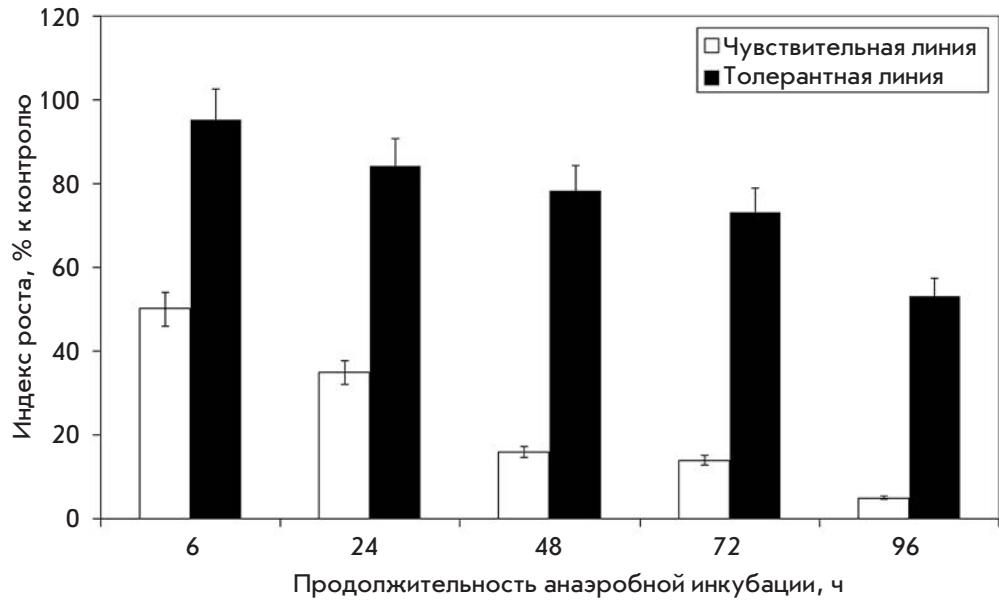
Таблица 2. Индексы роста каллуса сахарного тростника, прошедшего анаэробную инкубацию разной продолжительности на среде с 3% глюкозой, после культивирования в течение 1 месяца в условиях нормальной аэрации

Анаэробная инкубация, сут	Индекс роста	% от контроля
0	5.7 ± 0.51	100
3	3.0 ± 0.29	52.0 ± 5.0
5	2.9 ± 0.31	50.8 ± 5.4
7	2.5 ± 0.27	43.8 ± 4.7
9	1.5 ± 0.14	26.3 ± 2.4
14	0.2 ± 0.06	3.3 ± 1.1

В опытах на клетках каллусов сахарного тростника также была показана ключевая роль энергетического и углеводного метаболизма в формировании толерантности клеток к аноксии, поэтому дальнейшую селекцию толерантных клеток каллуса [25–28] и анаэробное экспонирование клеток проводили в отсутствие экзогенных углеводов (глюкозы) в среде. Лишь в таких условиях, когда устойчивость клеток к аноксии определялась особенностями анаэробного метаболизма эндогенных резервов углеводов, можно было надеяться получить путем селекции истинно толерантные к аноксии клетки.

Исходя из результатов предварительных опытов была разработана последовательная ступенчатая селекция толерантных к аноксии клеток в среде без углеводов *in vitro*. После анаэробной инкубации в течение 48 ч 13% клеток сохраняли способность к последующему росту в аэробных условиях. Каллусы, инкубированные без кислорода в течение 48 ч, затем переводили в условия нормальной аэрации. Аэробно сформировавшиеся клоны после анаэробной инкубации (48 ч) повторно инкубировали в условиях аноксии, увеличив экспозицию до 72 ч. Выжившие после второго этапа селекции клетки подвергали действию анаэробии (96 ч) и отбирали аэробно растущие клоны. После трех этапов селекции была выделена клеточная линия сахарного тростника, которая росла в постанаэробный период в условиях нормальной аэрации намного активнее, чем исходный каллус. Даже после аноксии в течение 96 ч половина таких клеток сохраняла способность к делению, тогда как у исходного каллуса подобная выживаемость наблюдалась только после 6-часового анаэробии (рис. 3).

Рис. 3. Индекс роста клеток чувствительной и устойчивой каллусной линии *S. officinarum*, прошедших инкубацию в анаэробных условиях, после месяца культивирования в условиях нормальной аэрации. Белые столбцы – исходный каллус до селекции; черные столбцы – клеточная линия после селекции клеток *in vitro*



СЕЛЕКЦИЯ *in vitro* ТОЛЕРАНТНЫХ К АНОКСИИ КЛЕТОК ПШЕНИЦЫ, А ТАКЖЕ РЕГЕНЕРАЦИЯ ИЗ НИХ ЦЕЛЫХ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К КОРНЕВОМУ ЗАТОПЛЕНИЮ

Аналогичные опыты по селекции толерантных клеток в отсутствие экзогенных углеводов проведены также с каллусными клетками пшеницы *T. aestivum* L. с целью последующей регенерации из отобранных более толерантных клеток целых растений, устойчивых к корневому затоплению [27]. В процессе селекции в условиях аноксии клетки постепенно теряли способность и к последующему аэробному росту, и к регенерации целых растений из устойчивых к аноксии клеток, поэтому мы проводили селекцию клеток в условиях 32 ч анаэробнозиса. При этом индекс роста клеток составлял 45%, а способность к регенерации целых растений из толерантных клеток – 18% (рис. 4).

Растения, регенерированные из толерантных клеток после селекции в условиях аноксии, а также контрольные растения испытывали в условиях корневого затопления в течение 16 дней при температуре 26°C. Из контрольных растений выжило лишь около 30%, тогда как из растений-регенерантов – 73%.

Чтобы выяснить генетическую природу толерантности к почвенному анаэробнозису, семена, полученные от толерантных растений-регенерантов первого поколения, высевали, а затем определяли толерантность выросших растений к корневому анаэробнозису. Растения R₁ от самоопыления растений-регенерантов были проверены в условиях корневого затопления в почвенном опыте при средних значениях температуры 32 и 22°C (табл. 3). При всех использованных температурах выживаемость по-

Таблица 3. Выживаемость растений R₁ и R₂ пшеницы в условиях корневого анаэробнозиса при разных температурных режимах

Условия опыта	Растения	Всего растений	Выжившие растения	
			число	доля, %
Затопление, 8 дней, 32°C	Контроль	20	0	0
	R ₁	22	7	32
Затопление, 10 дней, 22°C	Контроль	32	18	56
	R ₁	36	36	100
Затопление, 8 дней, 32°C	Контроль	24	11	46
	R ₂	32	32	100

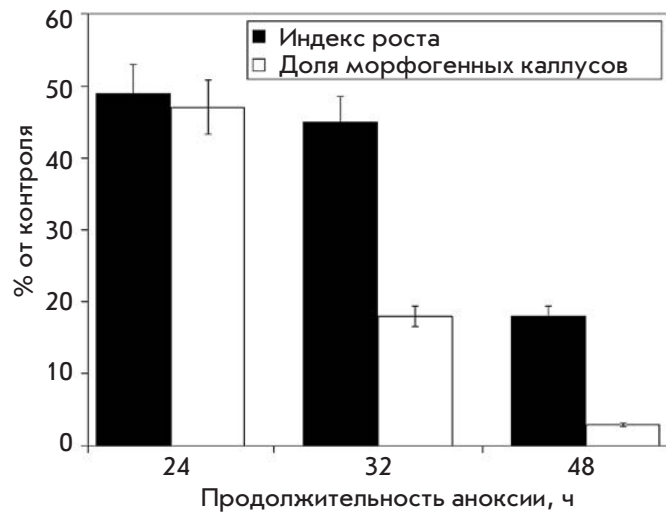


Рис. 4. Индекс роста и доля морфогенных каллусов пшеницы (% от контроля) после анаэробной инкубации в среде без углеводов. Контроль – аэробные условия



Рис. 5. Растения пшеницы после 8-дневного корневого затопления; контрольное (А) и толерантное (Б)

томков растений-регенерантов была выше, чем у контрольных растений.

Тестирование растений R₂ в почвенном опыте показало сохранение ими устойчивости к корневому затоплению (табл. 3, рис. 5). Таким образом, получены доказательства наследования растениями-регенерантами повышенной толерантности к почвенному затоплению.

ЗАЩИТНАЯ РОЛЬ НИТРАТА В ТОЛЕРАНТНОСТИ К АНОКСИИ КЛЕТОК *S. officinarum*, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ *in vitro*

В дальнейшем в опытах на толерантных к аноксии клетках *S. officinarum*, выделенных путем клеточной селекции, а также на клетках исходных каллусов (контроль) была сделана попытка выяснить возможную роль экзогенного нитрата (NO₃⁻) как защитного

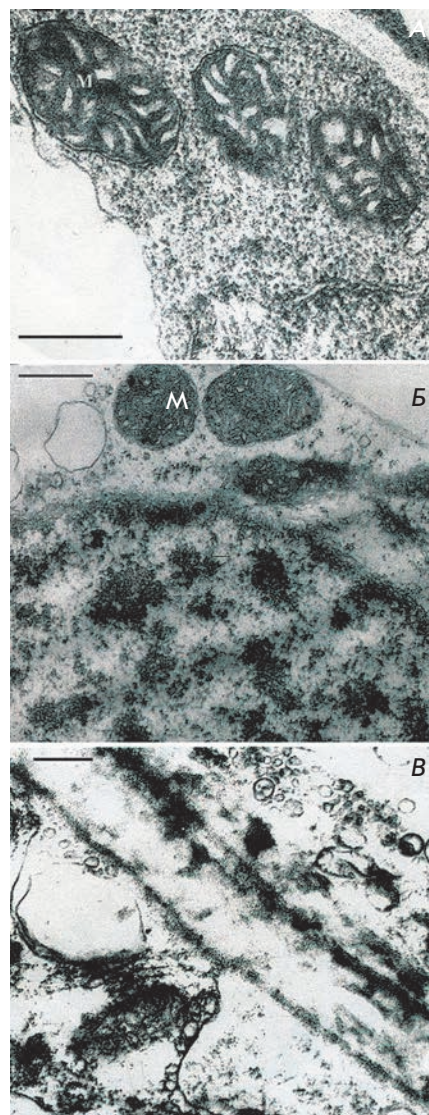


Рис. 6. Ультраструктура клеток каллуса чувствительной линии *S. officinarum* в условиях аноксии и в отсутствие экзогенного нитрата. А – контроль; Б – 6 ч анаэробной инкубации; В – 24 ч анаэробной инкубации. М – митохондрия, масштабная линейка 0.5 мкм

фактора в условиях анаэробной инкубации клеток [28]. В более ранних работах, выполненных как на целых растениях, так и на отделенных органах, было показано, что мобилизация и утилизация экзогенного нитрата играют заметную роль в толерантности растений в отсутствие молекулярного кислорода [39–44].

Электронно-микроскопическое изучение клеток исходных каллусов (контроль) сахарного тростника показало их высокую чувствительность к аноксии в отсутствие нитрата в среде (рис. 6). Шестичасовая анаэробная инкубация таких клеток не приводила к заметной деструкции мембран митохондрий, однако после 24-часового анаэробноза наблюдалась не только деструкция, но и полная деградация мембран как митохондрий, так и других клеточных структур (рис. 6В).

Рис. 7. Ультраструктура клеток каллуса чувствительной линии *S. officinarum* в условиях аноксии и в присутствии экзогенного нитрата. А – контроль; Б – 6 ч анаэробной инкубации; В – 24 ч анаэробной инкубации. М – митохондрия, масштабная линейка 0.5 мкм

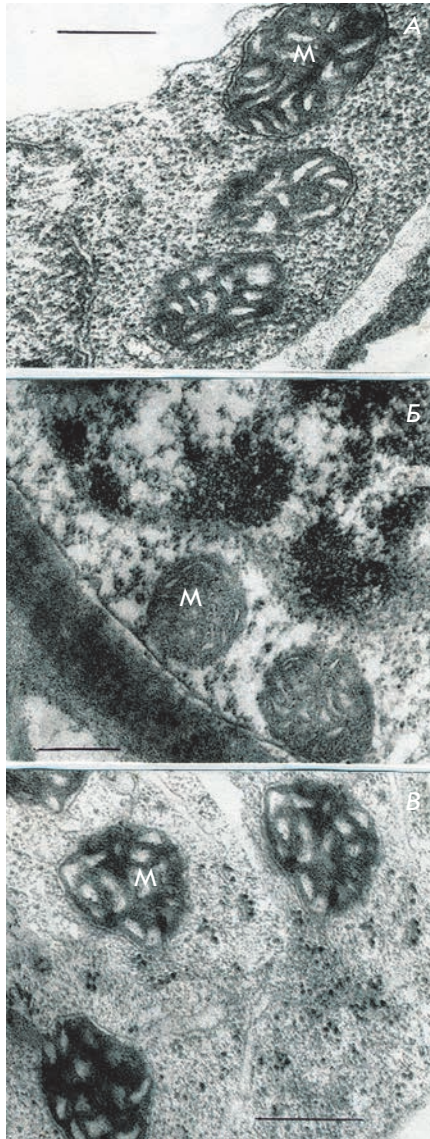
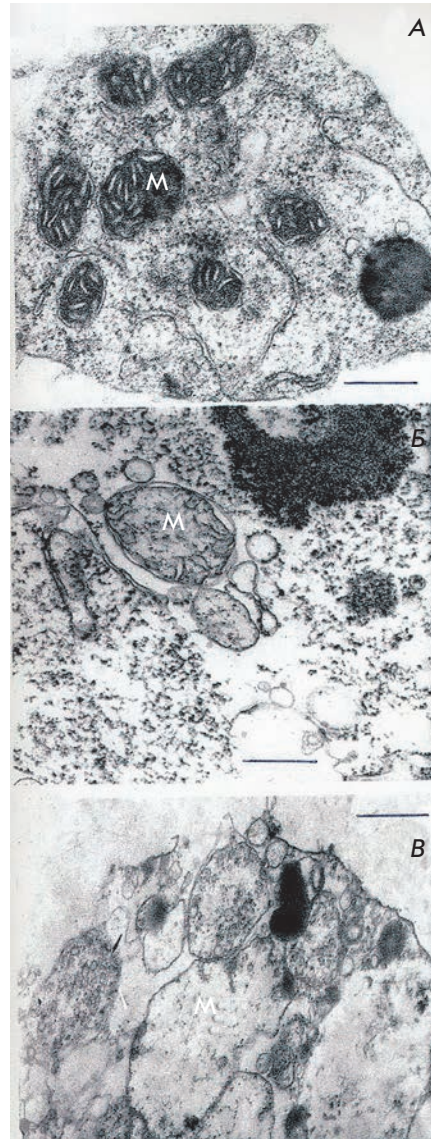


Рис. 8. Ультраструктура клеток каллуса устойчивой линии *S. officinarum* в условиях аноксии и в отсутствие экзогенного нитрата. А – контроль; Б – 24 ч анаэробной инкубации; В – 48 ч анаэробной инкубации. М – митохондрия, масштабная линейка 0.5 мкм



В присутствии экзогенного нитрата каллусные клетки контрольной неустойчивой линии проявили повышенную толерантность к аноксии. Даже при анаэробнозе в течение 24 ч отсутствовали заметные признаки деструкции или деградации мембран митохондрий и других органелл (рис. 7В). Выраженные признаки деструкции мембран митохондрий, переходящей в деградацию, обнаруживались при более длительном анаэробнозе (48 ч).

Клетки устойчивой линии, полученные после селекции *in vitro*, даже в отсутствие нитрата в питательной среде были заметно более толерантными к аноксии, чем исходные клетки (рис. 8). Анаэробная обработка клеток в течение 24 ч не вызывала деструкции мембран (рис. 8Б). Лишь после 48 ч анаэробноза наметились явные признаки деструкции

митохондрий (рис. 8В), а через 72 ч произошла полная деградация ультраструктуры клеток.

Наиболее существенные различия между каллусными линиями были выявлены при анаэробной обработке в присутствии нитратов в питательной среде толерантных клеток, выделенных в процессе селекции *in vitro*. Даже после 48–72 ч анаэробноза ультраструктура митохондрий в таких клетках оставалась неповрежденной (рис. 9Б,В,Г), наблюдались лишь некоторые непатологические морфологические изменения. Однако эти ультраструктурные и морфологические модификации не носили деструктивного характера даже после экспозиции в течение 72 ч (рис. 9Г).

Наряду с изучением состояния ультраструктуры клеток в условиях анаэробноза в присутствии и в от-

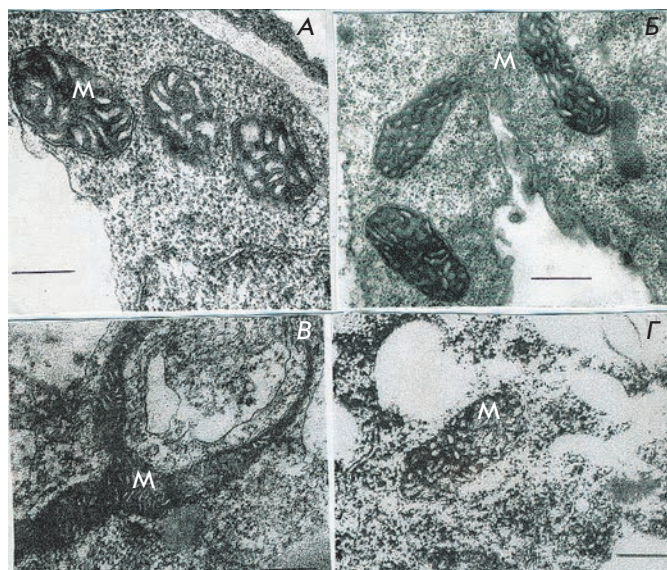


Рис. 9. Ультраструктура клеток каллуса устойчивой линии *S. officinarum* в условиях аноксии и в присутствии экзогенного нитрата. А – 24 ч анаэробной инкубации; Б, В – 48 ч анаэробной инкубации; Г – 72 ч анаэробной инкубации. М – митохондрия, масштабная линейка 0.5 мкм

сутствие нитрата мы наблюдали также за ростом клеток чувствительной и устойчивой линий каллусов в постанаэробный период. Постанаэробный рост клеток чувствительной линии на среде без нитрата был заметно подавлен. В присутствии нитрата каллус чувствительной линии рос не намного лучше, например, после 48-часовой аноксии прирост составлял только 10% от контрольного уровня на среде без нитратов и 16% на полной среде. Присутствие нитрата в питательной среде заметно сильнее благоприятствовало росту клеток толерантной линии: после 48 ч анаэробноза увеличение массы каллуса на среде с нитратом было на 18% больше, чем на безнитратной среде (рис. 10). В присутствии нитратов клетки толерантной линии сохраняли способность к росту даже после 72 ч аноксии, в то время как на среде без нитратов рост практически отсутствовал.

Что же касается каллусов чувствительной линии, то инкубация в условиях аноксии вызывала существенное снижение индекса роста, и, в отличие от устойчивой линии, защитное действие нитрата проявлялось заметно слабее.

Таким образом, полученные результаты вполне определенно показали, что в условиях аноксии экзогенный нитрат действует как защитный фактор и в контрольных клетках, и в клетках, полученных путем селекции *in vitro* в отсутствие молекулярного кислорода. Однако в клетках, выделенных путем

селекции *in vitro*, защитная функция экзогенного нитрата была выражена значительно сильнее, чем в исходных (контрольных) клетках.

Недавние публикации, подтверждающие положительное действие нитрата в условиях гипоксии и аноксии растений, показали сходные результаты и в отсутствие нитрата, но в присутствии микроколичеств нитрита в среде [45–47]. Эти результаты позволили сделать вывод о том, что защитное действие нитрата в отсутствие O_2 следует объяснять электронно-акцепторной ролью не самого нитрата, а, скорее всего, нитрита, либо сигнальной функцией NO_2^- , который в условиях анаэробноза образуется при восстановлении нитрата. С другой стороны, в лаборатории Hill [47] было показано, что в условиях гипоксии в результате восстановления NO_2^- в митохондриях происходит синтез АТФ, возможно, одного из важных факторов защитного действия как нитрита, так и нитрата, который служит источником нитрита в условиях гипоксии и аноксии.

Следует обратить особое внимание на такую особенность толерантных клеток, полученных путем ступенчатой селекции *in vitro* в условиях аноксии, как более существенное повышение в присутствии нитрата толерантности к аноксии [28], чем у исходных клеток, использованных для селекции. Эти наблюдения дают нам определенное основание для утверждения, что толерантность к аноксии в процессе селекции клеток *S. officinarum* значительно повысилась благодаря стимуляции не только гликолитических реакций, но и процессов утилизации нитрата и, возможно, нитрита в этих экстремальных условиях.

Дальнейшие усилия целесообразно направить на выяснение физиологической роли нитрита, образующегося в процессе восстановления нитрата, как возможного альтернативного акцептора электронов либо сигнального фактора в ходе анаэробной инкубации клеток каллусов.

ПОПЫТКИ ПОВЫСИТЬ ТОЛЕРАНТНОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ К АНАЭРОБНОМУ СТРЕССУ ПУТЕМ СТИМУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ (ПДК И АДГ)

Исходя из представлений о ключевой роли анаэробного энергетического метаболизма в метаболической адаптации растений к анаэробному стрессу [15, 21, 22, 48–53] был сделан ряд попыток повысить толерантность растений к гипоксии и аноксии, воздействуя на скорость этанольного брожения, путем сверхэкспрессии генов гликолитических ферментов в трансгенных растениях [29–32]. Результаты первых исследований [29–31] были несколько противоречивыми. Значительный интерес представляют манипуляции с уровнем активности ферментов эта-

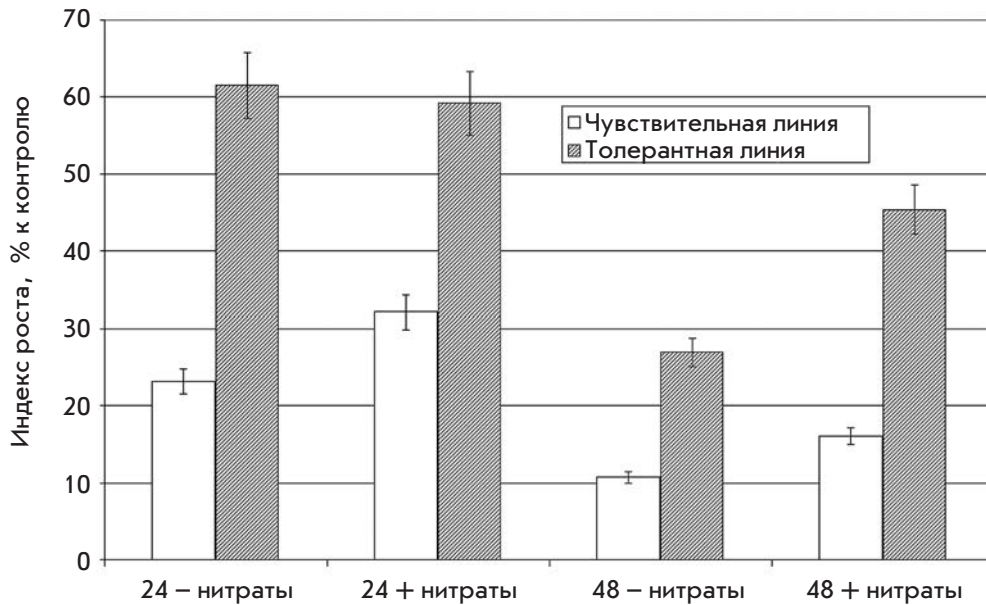


Рис. 10. Индекс роста каллуса устойчивой и чувствительной линий сахарного тростника после анаэробной инкубации. Цифры указывают на длительность (ч) анаэробной экспозиции клеток каллусов в присутствии и в отсутствие нитрата. Контроль – аэробные условия

нольного брожения (ПДК и АДГ) у трансгенных растений *Arabidopsis* [32]. В отличие от корней табака [30], растения *Arabidopsis*, трансгенные по ПДК, обладали не только повышенной скоростью этанольного брожения, но и большей устойчивостью к гипоксии, чем контрольные растения [32]. В отличие от растений *Arabidopsis*, трансгенных по ПДК, повышение активности АДГ в растениях с трансгеном АДГ не приводило к повышению толерантности, хотя мутация в гене *adh1* значительно усиливала накопление ацетальдегида и резко снижала устойчивость к низкокислородному стрессу. Высокая чувствительность и ранимость в условиях гипоксии мутантов АДГ *Arabidopsis* могла быть вызвана накоплением ацетальдегида, содержание которого резко возрастало в клетках, лишенных АДГ, и соответственно возможностью восстановления ацетальдегида и защиты клеток от его токсического действия. Наряду с этим нельзя полностью исключить накопления в этих условиях пировиноградной кислоты, что может в какой-то мере при участии ЛДГ привести к накоплению лактата в токсических количествах. Подкармливая растения сахарозой (3%), авторы показали, что для повышения толерантности необходима обеспеченность растений субстратом. Этот вывод хорошо согласуется с результатами наших более ранних опытов [21] и работ других авторов [48–57]. На основании собственных исследований в работе [32] сделан вывод, что активность ПДК тесно связана с интенсивностью потока углерода по пути этанольного брожения и определяет толерантность к низкокислородному стрессу, т.е. ПДК непосредственно контролирует этанольное

брожение. Таким образом, результаты проведенных на *Arabidopsis* опытов [32] также существенно поддерживают идею о ключевой роли энергетического метаболизма в истинной устойчивости растительных клеток к анаэробному стрессу.

УСТОЙЧИВОСТЬ К КОРНЕВОМУ ЗАТОПЛЕНИЮ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *ipt* АГРОБАКТЕРИЙ

Наряду с изучением возможности повышения толерантности пшеницы к анаэробному стрессу путем клеточной селекции *in vitro* в отсутствие экзогенных сахаров и кислорода была сделана попытка получить более толерантные к корневому затоплению растения пшеницы путем введения гена изопентилтрансферазы (*ipt*), кодирующего ключевой фермент в цепи биосинтеза цитокининов [26]. Интерес к стимуляции синтеза цитокинина в условиях анаэробного стресса возник в связи с тем, что цитокинин оказывает существенное влияние на старение растений, заметно задерживая этот процесс [34, 35]. Для надземных органов растений, испытывающих дефицит кислорода на затопленных почвах, как известно, характерны явные признаки преждевременного старения: хлороз листьев, их опадение и повреждение [58, 59]. Поэтому делались попытки задержать старение трансгенных растений арабидопсиса и пшеницы путем стимуляции синтеза цитокинина и тем самым повысить толерантность к анаэробному стрессу [26, 33, 60]. У полученных в наших опытах трансгенных растений пшеницы в условиях корневого затопления уровень изопен-

Таблица 4. Изменение линейных размеров и урожайности трансгенных по гену *ipt* и контрольных растений пшеницы, подвергнутых 14-дневному корневому затоплению (по отношению к растениям, не испытывавшим затопления, %)

Показатель, % к контролю	Контрольные растения	Трансгенные растения
Среднее увеличение высоты растения за 14 дней корневого затопления	37	51
Доля колосьев, давших семена	33	89
Средний вес семени	26	46
Урожайность	2	36

тениладенина был в 30 раз выше, чем у нетрансформированных растений. Роль изменения гормонального баланса в условиях анаэробного стресса была прослежена у трансгенных и контрольных растений на всем протяжении онтогенеза [26, 33].

В качестве критерия толерантности в опытах с пшеницей использовали такие показатели, как рост надземной массы трансгенных и контрольных растений, а также конечный урожай зерна в условиях, когда прикорневая зона растений была затоплена в течение 14 дней (табл. 4). Как видно из приведенных данных, рост надземных органов у контрольных растений заметно отстает от роста трансгенных по гену *ipt* растений. Еще более существенными были различия в урожайности опытных и контрольных растений. Урожайность определяли как массу зерна (в г), собранного с 1 м² почвы (гм²).

Наряду с этим, в процессе анаэробного воздействия определяли также динамику активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и каталазы) и накопления малонового диальдегида у контрольных растений и у растений, в геном которых был введен агробактериальный ген *ipt*. К концу периода корневого затопления уровень малонового диальдегида у трансгенных растений был на 32% ниже, чем у контрольных. Активность супероксиддисмутазы и каталазы, напротив, у трансгенной пшеницы оставалась высокой в течение всего периода гипоксии, в то время как у контрольных растений она существенно снижалась начиная с шестого дня корневого затопления. Эти данные свидетельствуют о том, что в условиях недостатка кислорода трансгенные растения испытывали меньший стресс, чем контрольные.

Приведенные данные, как и в опытах с арабидопсисом [60], свидетельствуют о положительном действии стимуляции синтеза цитокинина в условиях анаэробного стресса.

О ВОЗМОЖНОЙ РОЛИ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ПРОТЕАЗЫ – ФИТАСПАЗЫ, В ПОВЫШЕНИИ ТОЛЕРАНТНОСТИ РАСТЕНИЙ ТАБАКА К АНАЭРОБНОМУ СТРЕССУ

Программированная клеточная смерть играет ключевую роль как в процессе развития, так и в ответе растений на стресс, включая защиту от патогенов [61–67]. Как уже было отмечено, одна из главных стратегий адаптации растений к гипоксии и аноксии – это избегание анаэробноза благодаря формированию в корнях межклеточных пространств (аэренхима) в результате программированной гибели (апоптоза) определенной части клеток. Аэренхима существенно облегчает дальний транспорт кислорода из аэрируемых надземных органов растений в корни и корневище, которые находятся в анаэробной среде, обеспечивая тем самым способность этих растений выживать даже на затопленных почвах.

Однако аэренхима формируется преимущественно у дикорастущих растений, обитающих на переувлажненных анаэробных почвах. Способность сельскохозяйственных растений в этом отношении сильно ограничена, поэтому анаэробноз у них часто приводит к повреждению и гибели растений. В связи с этим представляет интерес недавно открытая апоптотическая протеаза – фитаспаза [36, 68–70], вовлеченная в программированную смерть клеток растений, т.е. в тот самый процесс, благодаря которому образуется аэренхима. Поэтому в настоящей работе была сделана попытка с помощью трансгенных по фитаспазе растений выяснить, можно ли использовать это свойство фермента для формирования аэренхимы и повышения толерантности к гипоксии и аноксии у тех сельскохозяйственных растений, которые этой способностью не обладают или обладают в слабой степени.

С этой целью использовали растения табака *N. tabacum*: трансгенные, экспрессирующие дополнительно введенный ген фитаспазы, и дикого типа в качестве контроля для сравнительных фенотипических и анатомических исследований. Активность фитаспазы у трансгенных растений в 3 раза превышала активность этого фермента у растений дикого типа (рис. 11).

Результаты предварительных опытов (Милыева Э.Л., Полякова Л.И., Вартапетян Б.Б., неопубликованные данные), проведенных в процессе онтогенеза трансгенных и контрольных растений, выявили заметные отличия этих растений даже в условиях

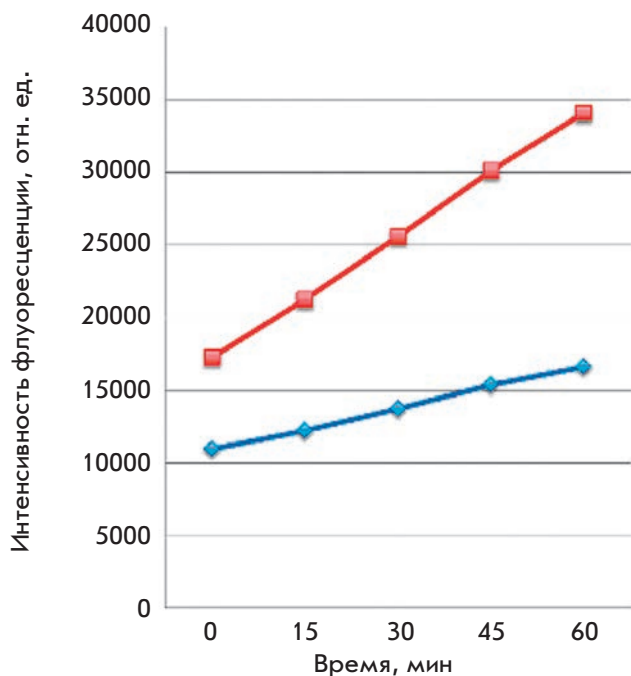


Рис. 11. Скорость гидролиза флуорогенного пептидного субстрата фитаспазы Ac-VEID-AFG в экстрактах листьев табака, синяя кривая – дикий тип, красная – трансгенный сверхпродуцент фитаспазы

Таблица 5. Площадь межклеточных пространств в корнях трансгенных и контрольных растений при нормальной аэрации и корневом анаэробии

Условия опыта	Площадь межклеточных пространств / общая площадь коревой паренхимы корня	
	контроль (дикий тип)	трансгенные растения
Нормальная аэрация	3.53 ± 0.28	2.92 ± 0.68
Корневой анаэробиз, 48 ч*	4.07 ± 1.1	11.45 ± 2.35

*Корни затапливали водой на 5 см выше поверхности почвы.

нормальной аэрации прикорневой зоны, в частности, в отношении ризогенеза, когда их черенки погружали на 17 дней в воду (рис. 12, 13). У трансгенных растений этот процесс происходил более активно. То же самое наблюдалось и в прорастании семян, а также в росте листьев и стеблей у молодых растений табака. В обоих случаях у трансгенных растений эти процессы протекали в 2 раза более активно.

Особый интерес представляло сравнительное изучение анатомического строения корней трансгенных

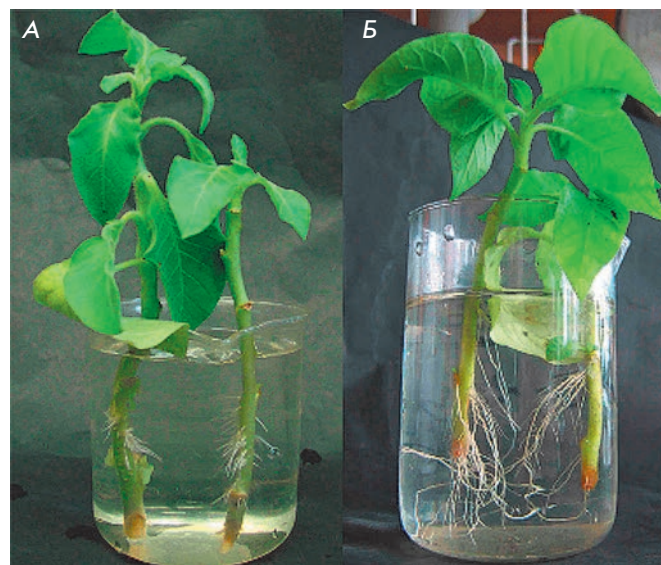


Рис. 12. Ризогенез черенков растений табака дикого типа (А) и трансгенных по гену фитаспазы (Б) через 17 дней после начала опыта

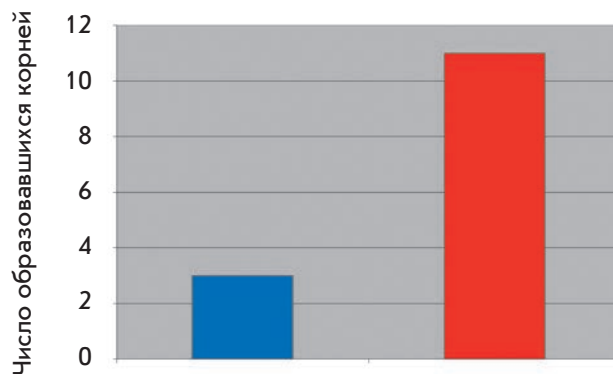


Рис. 13. Ризогенез черенков растений табака дикого типа (синий столбик) и черенков трансгенных по гену фитаспазы (красный столбик) через 17 дней после начала опыта

и контрольных растений, поскольку повышенная активность фермента, ответственного за запрограммированную клеточную смерть (фитаспаза), должна была благоприятствовать формированию межклеточных пространств (аэренхима) в корнях трансгенных растений и способности к большей толерантности в условиях корневого анаэробиза.

Однако количественное определение площади межклеточных пространств, проведенное на поперечных срезах корней как контрольных, так и транс-

генных растений, в условиях нормальной аэрации, не выявило существенных различий.

В условиях же затопления почвы, когда корни испытывают анаэробный стресс, размеры межклеточных пространств у трансгенных растений, как показали результаты предварительных опытов, были заметно большими, чем в контроле (табл. 5).

Следовательно, результаты предварительных наблюдений, которые нуждаются в более детальном исследовании и подтверждении, указывают на то, что повышенная активность фермента фитаспазы, ответственного за программированную клеточную смерть, способствует формированию межклеточных пространств (аэренхимы) в корнях трансгенных растений в условиях гипоксии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре рассмотрены результаты ряда экспериментальных работ, в которых разработаны биотехнологические подходы, включающие генно-инженерные манипуляции и методы клеточной селекции, к созданию растений, толерантных к анаэробному стрессу. В основу этих подходов легли более ранние фундаментальные исследования, в частности, концепция о двух главных стратегиях адаптации

растений к гипоксии и аноксии: адаптации на молекулярном уровне, в которой ключевую роль играет анаэробный энергетический метаболизм клеток (истинная толерантность), и адаптации на уровне целого организма растений путем формирования аэренхимы и облегченного дальнего транспорта кислорода (кажущаяся толерантность).

Заметный вклад, сделанный в рассмотренных исследованиях в создание толерантных к анаэробному стрессу клеток и растений, дает определенное основание надеяться, что итоги этих исследований послужат основой нового направления в биотехнологии и будут способствовать, наряду с классическими методами селекции и гибридизации, дальнейшему развитию прикладных исследований.

Следует также отметить, что результаты рассмотренных исследований позволили подтвердить концепцию о главных стратегиях адаптации растений к гипоксии и аноксии, и о ключевой роли анаэробного энергетического метаболизма в метаболической адаптации растений к анаэробному стрессу, которые были выдвинуты нами ранее на основании фундаментального изучения жизни растений в условиях анаэробноза. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jackson M.B., Ishizawa K., Ito O. // *Ann. Bot.* 2009. V. 103. P. 137–142.
- Visser E.J.W., Voesenec L.A.C.J., Vartapetian B.B., Jackson M.B. // *Ann. Bot.* 2003. V. 91. P. 107–109.
- Maltby E. // *Plant life under oxygen deprivation ecology, physiology and biochemistry* / Eds Jackson M.B., Davies D.D., Lambers H. The Hague: SPB Academic, 1991. P. 3–21.
- Setter T.L., Waters I., Sharma S.K., Sing K.N., Kulshreshtha N., Yaduvanshi N.P.S., Ram P.C., Singh B.N., Rane J., McDonald G., et al. // *Ann. Bot.* 2009. V. 103. P. 221–235.
- Perata P., Armstrong W., Voesenec L.A.C.J. // *New Phytol.* 2011. V. 190. № 2. P. 269–273.
- Smucker A.L.M., Allmaras R.R. // *Internat. Crop Sci. I.* / Eds Buxton D.R., Shibles R., Forsberg R.A., Blad B.L., Asay K.H., Paulsen G.M., Wilson R.F. Madison, Wisconsin: Crop Sci. Soc. America, 1993. P. 727–731.
- Andrews C.J.A. // *Ann. Bot.* 1997. V. 79. Suppl. A. P. 87–92.
- Knee M. // *Plant life under oxygen deprivation ecology, physiology and biochemistry* / Eds Jackson M.B., Davies D.D., Lambers H. The Hague: SPB Academic, 1991. P. 229–243.
- Plant life in anaerobic environments* / Eds Hook D.D., Crawford R.M.M. Ann Arbor, Michigan: Ann Arbor Science, 1st and 2nd eds 1978, 1980.
- Plant life in aquatic and amphibious habitats* / Ed. Crawford R.M.M. Oxford: Blackwell, 1987.
- The ecology and management of wetlands* / Eds Hook D.D., McKee W.H., Smith Jr. H.K., Gregory J., Burrell V.G., DeVoe Ir. M.R., Solka R.E., Gilbert S., Banks R., Stolzy L.H., Brooks C., Matthews T.D., Shear T.H. London: Croom Helm, 1988.
- Plant life under oxygen deprivation* / Eds Jackson M.B., Davies D.D., Lambers H. The Hague: SPB Academic, 1991.
- Interacting stresses on plants in a changing climate.* NATO ASI Ser. / Eds Jackson M.B., Black C.R. Berlin: Springer-Verlag, 1993.
- Oxygen and environmental stress in plants* / Eds Crawford R.M.M., Hendry G.A.F., Goodman B.A. Edinburgh: Proc. Royal Soc. Edinburgh Ser. B. 1994. V. 102.
- Vartapetian B.B. // *Plant life in anaerobic environments* / Eds Hook D.D., Crawford R.M.M. Ann Arbor, Michigan: Ann Arbor Science, 1980. P. 1–12.
- Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Kursanov A.L. // *Nature (London).* 1974. V. 248. № 445. P. 258–259. (See also Erratum V. 250. № 461. P. 84).
- Vartapetian B.B., Sachs M.M., Fagerstedt K. // *Plant Stress.* 2008. V. 2. № 1. P. 1–19.
- Magneschi L., Perata P. // *Ann. Bot.* 2009. V. 103. P. 181–196.
- Steffens B., Gesrt T., Sauter M. // *New Phyt.* 2011. V. 190. № 2. P. 369–378.
- Jackson M.B., Ram P.C. // *Ann. Bot.* 2003. V. 91. Spec. Issue. P. 227–241.
- Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Kozlova G.I., Agapova L.P. // *Protoplasma.* 1977. V. 93. P. 243–256.
- Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Generozova I.P., Polyakova L.I., Maslova I.P., Dolgikh Y.I., Stepanova A.Y. // *Ann. Bot.* 2003. V. 91. P. 155–172.
- Zhang Q., Greenway H. // *J. Exp. Bot.* 1994. V. 45. P. 567–575.
- Perata P., Guglielminetti L., Alpi A. // *Ann. Bot.* 1997. V. 79. P. 49–56.
- Степанова А.Ю., Полякова Л.И., Долгих Ю.И., Вартапетян Б.Б. // *Физиология растений.* 2002. Т. 49. С. 451–458.
- Tereshonok D., Stepanova A., Dolgikh Yu.I., Osipova E., Belyaev D., Vartapetian B.B. // *Plant Stress.* 2010. V. 4. № 1. P. 79–82.

27. Степанова А.Ю., Долгих Ю.И., Вартапетян Б.Б. // Биотехнология. 2010. № 3. С. 1–6.
28. Вартапетян Б.Б., Полякова Л.И., Степанова А.Ю., Долгих Ю.И. // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 6. С. 739–745.
29. Bucher M., Brändle R., Kuhlemeier C. // EMBO J. 1994. V. 13. P. 2755–2763.
30. Tadege M., Brändle R., Kuhlemeier C. // Plant J. 1998. V. 14. P. 327–335.
31. Quimio C.A., Torrizo L.B., Setter T.L., Ellis M., Grover A., Abrigo E.M., Oliva N.P., Ella E.S., Carpena A.L., Ito O., et al. // Plant Phys. 2000. V. 156. P. 516–521.
32. Ismond K.P., Dolferus R., Pauw M.D., Dennis E.S., Good A.G. // J. Plant Phys. 2003. V. 132. P. 1292–1302.
33. Терешонок Д.В., Степанова А.Ю., Долгих Ю.И., Осипова Е.С., Беляев Д.В., Кудоярова Г.Р., Высоцкая Л.Б., Вартапетян Б.Б. // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 5. С. 681–690.
34. Романов Г.А. // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 2. С. 295–319.
35. Lomin S.N., Krivosheev D.M., Steklov M.Yu., Osolodkin D.I., Romanov G.A. // Acta Naturae. 2012. V. 4. № 3(14). P. 31–45.
36. Chichkova N.V., Kim S.H., Titova E.S., Kalkum M., Morozov V.S., Rubtsov Y.P., Kalinina N.O., Taliansky M.E., Vartapetian A.B. // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 157–171.
37. Chichkova N.V., Shaw J., Galiullina R.A., Drury G.E., Tuzhikov A.I., Kim S.H., Kalkum M., Hong T.B., Gorshkova E.N., Torrance L., Vartapetian A.B., Taliansky M. // EMBO J. 2010. V. 29. № 6. P. 1149–1161.
38. Vartapetian A.B., Tuzhikov A.I., Chichkova N.V., Taliansky M., Wolpert T.J. // Cell Death Differ. 2011. V. 18. P. 1289–1297.
39. Reggiani R., Brambilla I., Bertani A. // J. Exp. Bot. 1985. V. 36. P. 1193–1199.
40. Botrel A., Magne C., Kaiser W. // Plant Phys. Biochem. 1996. V. 34. P. 645–652.
41. Fan T.W.M., Higashi R.M., Frenkiel T., Lane A.N. // J. Exp. Bot. 1997. V. 48. P. 1655–1666.
42. Botrel A., Kaiser W. // Planta. 1997. V. 201. P. 496–501.
43. Oberson I., Pavelic D., Braendle R., Rawlyer A. // Plant Phys. 1999. V. 155. P. 792–794.
44. Vartapetian B.B., Polyakova L.I. // Mitochondria: Structure, Functions and Dysfunctions / Ed. Svensson O.L. USA: Nova Publ., 2010. P. 955–966.
45. Igamberdiev A.U., Hill R.D. // J. Exp. Bot. 2004. V. 55. P. 2473–2482.
46. Igamberdiev A.U., Hill R.D. // Ann. Bot. 2009. V. 103. P. 259–268.
47. Stoimenova M., Igamberdiev A.I., Gupta K.J., Hill R.D. // Planta. 2007. V. 226. P. 465–474.
48. Xia J.-H., Saglio P. // Plant Phys. 1990. V. 93. P. 453–459.
49. Waters I., Kuiper P.J.C., Watkin E., Greenway H. // J. Exp. Bot. 1991a. V. 42. P. 1427–1435.
50. Waters I., Morell S., Greenway H., Colmer T.D. // J. Exp. Bot. 1991b. V. 42. P. 1437–1447.
51. Hole D.J., Cobb B.G., Hole P., Drew M.C. // J. Plant Phys. 1992. V. 99. P. 213–218.
52. Xia J.-H., Saglio P.H., Roberts J.K.M. // J. Plant Phys. 1995. V. 108. P. 589–595.
53. Ricard B., van Toai T., Chourey P., Saglio P.H. // J. Plant Phys. 1998. V. 116. P. 1323–1331.
54. Sato T., Harada T., Ischizawa K. // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. P. 1847–1856.
55. Loreti E., Alpi A., Perata P. // Plant Phys. 2003. V. 50. P. 737–742.
56. Voesenek L.A.C.J., Benschop J.J., Bou J., Cox M.C.H., Groeneveld H.W., Millenaar F.F., Vreburg R.A.M., Peeters A.J.M. // Ann. Bot. 2003. V. 91. P. 205–211.
57. Magneschi L., Perata P. // Ann. Bot. 2009. V. 103. P. 181–196.
58. Trought M.C.T., Drew M.C. // Plant Soil. 1980. V. 54. P. 77–94.
59. Singh S., Letham D.S., Palni L.M.S. // Phys. Plant. 1992. V. 86. P. 388–397.
60. Zhang J., van Toai T., Huynh L., Preiszner J. // Mol. Breed. 2000. V. 6. P. 135–144.
61. Hoeberichts F.A., Woltering E.J. // BioEssays. 2003. V. 25. № 1. P. 47–57.
62. Williams B., Dickman M. // Mol. Plant Pathol. 2008. V. 9. № 4. P. 531–544.
63. Reape T.J., McCabe P.F. // New Phytol. 2008. V. 180. № 1. P. 13–26.
64. Reape T.J., McCabe P.F. // Apoptosis. 2010. V. 15. № 3. P. 249–256.
65. Zhang J., Teng C., Liang Y. // Protein Cell. 2011. V. 2. № 10. P. 837–844.
66. van Doorn W.G., Beers E.P., Daugl J.L., Franklin-Tong V.E., Gallois P., Hara-Nishimura I., Jones A.M., Kawai-Yamada M., Lam E., Mundy J., et al. // Cell Death Differ. 2011. V. 18. № 8. P. 1241–1246.
67. Fomicheva A.S., Tuzhikov A.I., Beloshistov R.E., Trusova S.V., Galiullina R.A., Mochalova L.V., Chichkova N.V., Vartapetian A.B. // Biochemistry (Moscow). 2012. V. 77. № 13. P. 1452–1464.
68. Chichkova N.V., Galiullina R.A., Taliansky M.E., Vartapetian A.B. // Plant Stress. 2008. V. 2. P. 89–95.
69. Tuzhikov A.I., Vartapetian B.B., Vartapetian A.B., Chichkova N.V. // Abiotic stress response in plants physiological, biochemical and genetic perspectives / Eds Venkateswarla B., Shanker A. Rijeka: Intech-Open Access Publ., 2011. P. 183–195.
70. Chichkova N.V., Tuzhikov A.I., Taliansky M., Vartapetian A.B. // Phys. Plant. 2012. V. 145. P. 77–84.