



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



СОДЕРЖАНИЕ ГОРМОНОВ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ АБК В ЛИСТЯХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

**Романова А.К.¹, Новичкова Н.С.¹,
Высоцкая Л.Б.², Ахтямова З.А.^{2,3},
Ахиярова Г.Р.², Иванов Б.Н.¹,
Кудоярова Г.Р.², Веселов С.Ю.³**

¹Институт фундаментальных проблем
биологии РАН, Пушкино

²Уфимский Институт биологии Уфимского
федерального исследовательского центра РАН, Уфа
E-mail: vysotskaya@anrb.ru

³Башкирский государственный университет, Уфа

В работе представлены результаты исследований концентрации гормонов в листьях сахарной свеклы разного возраста параллельно с измерением их роста и метаболической активности, которую оценивали по содержанию сахаров и азот-содержащих соединений, активности рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы и протеаз. Выявлено наиболее высокое содержание ауксинов в активно растущем верхнем листе и поддержание высокого уровня цитокининов в верхнем и среднем листьях, для которых характерен высокий уровень фотосинтеза. Старение нижнего листа, проявляющееся в снижении уровня хлорофилла и фотосинтеза и активации протеолиза белков, сопровождалось снижением уровня цитокининов. Уровень глюкозы постепенно повышался по мере перехода от верхнего листа к среднему и нижнему листьям. Повышение содержания глюкозы сопровождалось признаками старения только на фоне снижения уровня цитокининов в нижнем листе. Концентрация АБК была самой высокой в верхнем растущем листе и более низкой – в зрелом и стареющем листьях. Вместе с тем, иммуногистохимическая локализация АБК выявила повышение уровня этого гормона в области флоэмной паренхимы нижнего листа. Обсуждается возможная роль ауксинов в поддержании роста листьев, важность понижения уровня цитокининов в запуске процессов старения под влиянием глюкозы и вовлеченность абсцизовой кислоты в активную загрузку метаболитов во флоэму стареющих листьев.

Ключевые слова: *Beta vulgaris* L, цитокинины, абсцизовая кислота, ИУК, хлорофилл, глюкоза, старение

HORMONE CONTENT AND ABSCISIC ACID LOCALIZATION IN LEAVES OF DIFFERENT AGE OF SUGAR BEET

**Romanova A.K.¹, Novichkova N.S.¹,
Vysotskaya L.B.², Akhtyamova Z.A.^{2,3},
Akhtyarova G.R.², Ivanov B.N.¹,
Kudoyarova G.R.², Veselov S.Yu.³**

¹Institute of Fundamental Problems of Biology of the
Russian Academy of Sciences, Pushchino

²Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research
Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa

E-mail: vysotskaya@anrb.ru

³Bashkir State University, Ufa

We have measured tissues concentration of hormones in the leaves of sugar differing in their age in comparison with their growth and photosynthetic activity evaluated as a result of comparison of sugar levels and nitrogen-containing substances and activity of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Our aim was to follow the dependence of developmental processes and senescence on interaction between sugars and hormones. IAA and abscisic acid concentrations were found to peak in the tissues of actively growing young leaves, whereas concentration of cytokinins remained elevated in the fully developed and young still growing leaves distinguished by their active photosynthesis and manifested in Rubisco activity. Decrease in photosynthesis and greater proteolysis as well as reduction in pigment level served as the signs of the leaf senescence and coincided with the reduced cytokinins levels. Concentration of glucose continuously rose from the young to the senescent leaves coinciding with the process of senescence only when cytokinins level decreased. Immunolocalization have shown elevated staining for ABA in the vascular bundles of the eldest leaves, implication of IAA in the control of the process of the growth, importance of reduced cytokinins in the glucose-induced triggering of senescence and possible involvement of ABA in the control of the export of assimilates into the vasculature of old leaves.

Keywords: *Beta vulgaris* L, cytokinins, abscisic acid, IAA, chlorophyll, glucose, senescence

Поступила в редакцию: 12.03.2018

ВВЕДЕНИЕ

В процессе роста и развития листьев формируется один из важнейших органов растения, который осуществляет ассимиляцию углекислого газа, а, по мере развития листа, усиливаются его донорные функции, т.е. способность обеспечивать органы-акцепторы продуктами усвоения углерода. Донорная функция листьев усиливается по мере их старения, при котором происходит распад и ремобилизация как полисахаридов, так и белков [Schippers et al., 2015; Romanova et al., 2016]. Процесс старения знаменуется деструкцией хлоропластов, а поскольку эти органоиды содержат большую часть белков листа, их распад являются богатым источником азота для его реутилизации [Girondé et al., 2015]. Приведенные факты объясняют неубывающий интерес к механизмам, регулирующим процесс старения. Гормон абсцизовая кислота (АБК) является одним из эндогенных факторов, который связывают с регуляцией старения [Pourtau et al., 2004]. Так ускорение старения, зарегистрированное в стрессовых условиях, пытались связать с накоплением этого гормона [Ghanem et al., 2008; Navlova et al., 2008; Song et al., 2016], который часто называют гормоном стресса. Вместе с тем, роли АБК в регуляции старения листьев в отсутствие стресса уделяли меньше внимания, а некоторые эксперименты с мутантными растениями, вопреки ожиданиям, показали замедление старения у растений с повышенным содержанием АБК [Barth et al., 2006]. Один из важных аспектов регуляции старения – взаимодействие АБК и сахаров. Предполагается, что известный эффект торможения роста растений на ранних стадиях онтогенеза под влиянием глюкозы может быть связан с ее способностью активировать синтез АБК с участием гена *gin* кодирующего дегидрогеназу/редуктазу, которая принимает участие в синтезе АБК [Cheng et al., 2002]. Поскольку процесс старения в ряде случаев сопровождался накоплением глюкозы [Cowan et al., 2005; Wingler et al., 1998], можно было предполагать, что глюкоза стимулирует накопление АБК в стареющих листьях. Растения сахарной свеклы являются удобной моделью для изучения взаимодействия сахаров и АБК в регуляции старения. Насколько нам известно, содержание АБК у растений этого вида изучали лишь в связи с инфицированием [Schmidt et al., 2008] и формированием семян [Hermann et al., 2007], но не в листьях разного яруса в связи со старением. В задачу данной работы входило сравнительное изучение содержания абсцизовой кислоты и сахаров в листьях разных ярусов сахарной свеклы, которые находились на стадии активного роста, зрелости и начала старения. Наряду с общим содержанием АБК, с помощью иммуногистохимических подходов было изучено распределение АБК между клетками листьев растений, что раньше никогда не было предметом изучения. Этот подход представляется важным в свете обзора van Doorn [Van Doorn, 2008], в котором говорится, что оценки уровня сигнальных молекул на уровне целого органа может быть недостаточным для выявления их роли в регуляции старения, и требуется их анализ на уровне отдельных клеток. Наряду с содержанием АБК была также проведена оценка уровня цитокининов и ауксинов в листьях разного возраста растений сахарной свеклы. Оценить возможный вклад цитокининов было важно в связи с данными о роли этого гормона в регуляции роста листьев и старения [Raines et al., 2016]. Возможное участие ауксинов также представляло интерес в связи с их ролью в регуляции роста листьев [Веселов и др., 2008]. Наряду с содержанием сахаров мы также оценили содержание хлорофилла и белков, поскольку полученные ранее данные

свидетельствовали об информативности этих характеристик как показателей созревания и старения листьев и усиления их донорных функций [Romanova et al., 2011].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сеянцы сахарной свеклы *Beta vulgaris* L., подвид *saccharifera* (“white beet”) выращивали при 16 ч фотопериоде, освещенности $300 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ ФАР [Romanova et al., 2016]. Дефицит азота и дефицит воды в прикорневой зоне мы исключали путем регулярных чередующихся подкормок смесью Кнопа и поливом водой.

В опыте использовали растения семидесятидневного возраста. Возраст индивидуальных листьев определяли визуально со времени их появления на растении до даты эксперимента. Для обнаружения АБК избраны листья: не полностью развернутые (возраст 18 дней (18д)), полностью развернутые (возраст 40 дней (40д)) и старейший, но не сенильный (возраст 58 дней (58д)). Содержание сухого вещества в листьях определяли высушиванием при 80 °С после фиксации их при 105 °С. Отбор проб для всех анализов в высечках, лишенных крупных сосудов, производили в одно и то же время суток – по прошествии трех часов с начала освещения после периода темноты.

Содержание растворимых углеводов (рУгл) в водно-спиртовом экстракте определяли с реактивом фенол-серная кислота и с калибровкой по сахарозе [DuBois et al., 1956]; глюкозы – с глюкозооксидазой с кислородным электродом Кларка [Novichkova et al., 2008]; Хл ($a+b$) – спектрофотометрическим методом в экстракте 96%-го этанола [Wintermans and de Motts, 1965]; содержание растворимых белков (рБел) – с реактивом Фолина [Lowry et al., 1951] после осаждения 4%-ной трихлоруксусной кислотой из буферного экстракта.

Экстракты для определения активности Рубиско (рибулезо-1,5-бифосфат-карбоксилаза/оксигеназа) получали гомогенизацией листьев в охлажденном 0.05 М трис-НСl буфере, рН 8.0 в присутствии стабилизирующих добавок. Потенциальную активность фермента измеряли в условиях полного насыщения карбоксилазной функции бикарбонатом, как описано ранее [Romanova et al., 1998; Romanova et al., 2016]. Радиоактивность кислотоустойчивого ^{14}C - продукта после высушивания измеряли в сцинтилляционном спектрометре LS 100С (фирмы “Beckman”, США). В рамках данного исследования Рубиско рассматривали как белок-мишень сигнального действия внешних и внутренних факторов.

Фитогормоны экстрагировали с помощью 80 %-ного этилового спирта. Экстракцию ИУК и АБК проводили из водного остатка после упаривания этанола по модифицированной схеме, как описано [Veselov et al. 1992]. Из подкисленной до рН 2-3 аликвоты водного остатка АБК и ИУК дважды экстрагировали диэтиловым эфиром (5:1 v/v), затем переводили их в водную фазу, добавляя 1 % раствор гидрокарбоната натрия, (соотношение водной и органической фазы – один к трем), снова подкисляли до рН 2-3 и после двукратной реэкстракции диэтиловым эфиром метилировали. После метилирования упаренные досуха образцы растворяли в небольшом количестве этилового спирта (50-100 μL) и проводили иммуноанализ с помощью специфических антител к ИУК и АБК, как описано [Vysotskaya et al., 2008; Sharipova et al., 2016].

Цитокинины из аликвоты водного остатка концентрировали на картридже С18 [Bond-Elut, RP-C18], спиртовой элюат упаривали и наносили на тонкослойную пластину для хроматографирования, как описано [Kudoyarova et al., 2014]. Зеатин, его рибозид и

нуклеотид, положение которых определяли по поглощению метчиками ультрафиолета при длине волны 250 нм, элюировали фосфатным буфером pH 7.2-7.4, проводили иммуноанализ с помощью специфических антител к ZR. Для подтверждения надежности результатов иммуноанализа проводилось сравнение данных иммуноанализа с результатами физико-химических методов хромато-масс-спектрометрии [Kudoyarova et al., 2014].

Иммуногистохимическая локализация гормонов в клетках проведена с помощью специфических антител к АБК, как уже описано [Sharipova et al., 2016]. Содержащиеся в клетках гормоны фиксировали с помощью карбодиимида (КДИ), отмывали от фиксатора в фосфатном буфере (pH 7.3), обезвоживали в серии спиртов и заключали в гидрофильную метакрилатную смолу JB-4 (Electron Microscopy Sciences 1, USA). Гормоны на срезах выявляли с помощью специфических антител против АБК. Связавшиеся с клеточными структурами антитела к гормонам выявляли на срезе с помощью вторичных антител, меченных коллоидным золотом, и препарата «серебряного усилителя» (silver enhancer). За развитием окраски наблюдали в световой микроскоп (Carl Zeiss, Jena, Germany). Специфичность связывания антител подтверждена в данных экспериментах с помощью сравнения окрашивания срезов при использовании специфической и неиммунной сыворотки, а также ранее – в экспериментах, где было зарегистрировано повышение интенсивности окрашивания при поглощении экзогенной АБК, а также пониженное иммунное окрашивание срезов корней дефицитного по АБК мутанта (отрицательный контроль) [Sharipova et al., 2016]. Иммунное окрашивание на АБК оценивали, измеряя интенсивность окрашивания пикселей внутри интересующей области 8-битных изображений с помощью программы ImageJ (ver. 1.48, National Institute of Health) [Sharipova et al., 2016]. Анализировали изображения 10 срезов для каждого варианта. Интенсивность окрашивания выражали в процентах, принимая за 100% максимальное, и за 0% - минимальное окрашивание в опыте.

Полученные результаты подвергали тестам one-way ANOVA для подтверждения достоверности различий. Результаты представлены в виде средних величин и ошибок средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На срезах листьев, обработанных иммунной сывороткой, после фиксации КДИ, были видны детали мезо-структуры листьев разного возраста видны в световом микроскопе. Клетки хлоренхимы 18д листа – сравнительно мелкие, плотно прижатые друг к другу, межклетников почти нет. Структура ткани 40-дневного листа (далее – “зрелый”) менее плотная; вакуоли увеличены, цитоплазма тянется тонким слоем вдоль клеточных оболочек. Старейший из исследованных листьев, 58д характеризовался рыхлостью хлоренхимы и большими межклетниками.

На срезах 18д листа наибольшая иммунная реакция на АБК впервые для листьев сахарной свеклы была нами обнаружена в клеточной оболочке и хлоропластах (полуколичественная оценка интенсивности окрашивания приведена на рис. 1). Окрашивание заметно уменьшалось с возрастом листьев.

Исследование срезов листьев в области мелких сосудистых пучков показало очень слабую реакцию иммунного окрашивания в 18д. Однако отчетливое окрашивание появилось

в клетках, сопровождающих сосудистые пучки старейшего 58д листа (рис. 2). На контрольных срезах, обработанных неиммунной сывороткой, клеточные структуры были едва различимы (данные не приводятся).

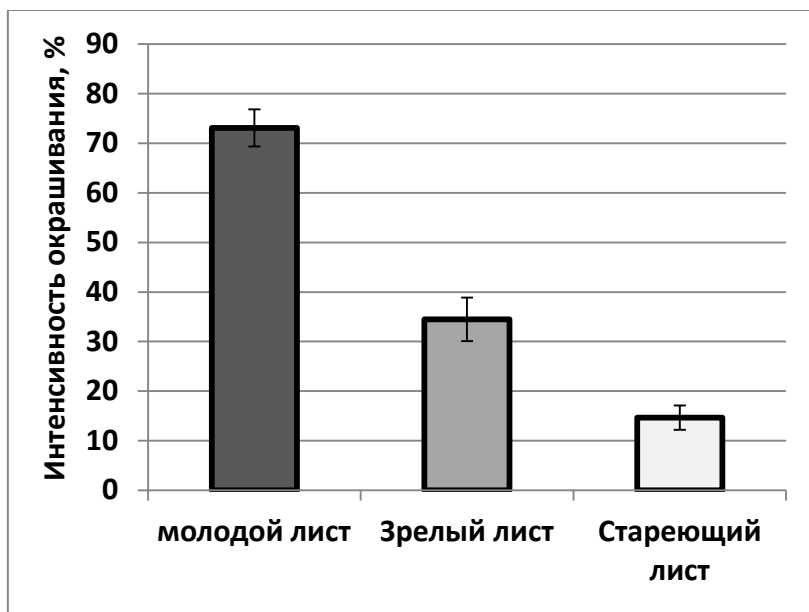


Рис. 1. Результаты оценки интенсивности иммуногистохимического окрашивания на АБК срезов листьев разного возраста с помощью программы ImageJ.

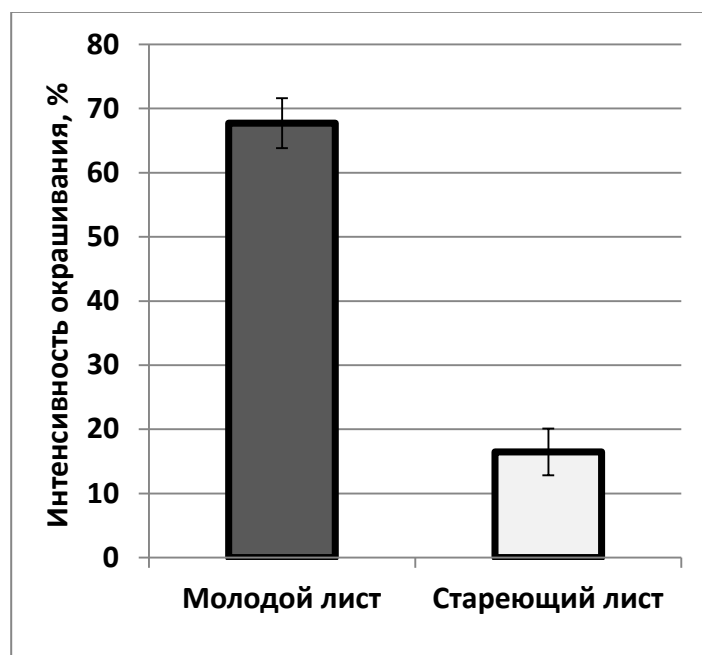


Рис. 2 Результаты оценки интенсивности иммуногистохимического окрашивания на АБК в клетках флоэмы сосудистого пучка листьев свеклы разного возраста с помощью программы ImageJ. (старейший лист – 58д; молодой лист – 18д).

К моменту проведения опыта из общего числа образовавшихся 15 листьев семядольные и первая пара настоящих листьев уже отсутствовали, а три верхних листа были развернуты лишь частично. Избраны листья трех возрастов: 18 дней (д.), 40 д и 58 д. Из них площадь и вес 18д листа были минимальны (табл. 1). Увеличения веса листа: в 3.3 раза для 40д и в 4.1 раза для 58д листьев за счет увеличения толщины листа были более выражены, чем площади листьев (в 2.7 раза у 40д и в 3.4 раза у 58д листьев). Удельная поверхностная плотность листа (УППЛ) у 40д и 58д листьев в 1.2 раза больше, чем у 18 д листа.

Таблица 1. Площадь, сырая и сухая масса, удельная поверхностная плотность (УППЛ) листьев разного возраста сахарной свеклы

| Показатели | Возраст листьев, дни | | |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 18 | 40 | 58 |
| Площадь листа, см ² | 16± 2 ^a | 43 ± 4.0 ^o | 61 ± 5.9 ^B |
| Сырая масса листа, г | 0.49 ± 0.05 ^a | 1.87 ± 0.19 ^o | 2.31 ± 0.27 ^B |
| УППЛ, г/м ² (по сырой массе) | 321 ± 35 ^a | 367 ± 51 ^o | 410 ± 50 ^o |
| Сухая масса 1 листа, г | 0.107 ± 0,01 | 0.263 ± 0,04 | 0.324 ± 0,04 |

Одинаковые надстрочные буквы означают отсутствие достоверного отличия.

Самое высокое содержание сухой массы (18.5 %^a от сырой массы) наблюдалось у 18д листа и снижалось до 15.1 ± 1.8%^o в 40д листе и до 14.2±1.7 %^o в 58д листе.

В таблице 2 показано, что содержание суммы рУгл (минус Глю) в 18д листе было ниже, чем в полностью развернутых листьях. Различие между 40д и 58д листьями было невелико и статистически недостоверно. Содержание Глю в 18д листе было минимальным, заметно возрастало в 40д листе и еще больше – в 58д листе. Таким образом, характер изменений, связанных с возрастом листа у двух родственных веществ (Глю образуется из сахарозы) различался, что говорит о принципиальном отличии функций этих С-соединений. И в то же время обращает на себя внимание сходство изменений исследованных N-соединений в листьях разного возраста. Так, содержание рБел, одинаково высокое в 18д и 40д листьях, резко снижалось (примерно в 2 раза) в 58д листе. Содержание хлорофиллов (a+b) в 18д и 40д листьях тоже было одинаковым, но резко снижалось (в 3 раза) в 58д листе. Активность Рубиско в 18д и в 40д листьях существенно не отличалась, но снижалась почти в 2.7 раза в 58д листе.

Таблица 2. Биохимические показатели листьев (листовых пластинок) разного возраста сахарной свеклы.

| Содержание, мг | Возраст листьев, дни | | |
|---|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | 18 | 40 | 58 |
| Растворимые углеводы минус глюкоза, мг/лист | 6.2 ± 0.3 ^a | 19.8 ± 2.0 ^b | 25.1 ± 1.3 ^b |
| Глюкоза, мг/г лист | 0.4 ± 0.005 ^a | 1.3 ± 0.05 ^b | 1.7 ± 0.04 ^c |
| Растворимый белок, мг/лист | 13.1±0.4 ^a | 37.8±1.7 ^a | 24.2 ± 2.5 ^b |
| Хлорофиллы a и b, мг/лист | 0.95 ± 0.07 ^a | 2.58 ± 0.3 ^a | 1.18 ± 0.02 ^b |
| Рубиско, *мкмоль мин ⁻¹ лист | 3.38 ± 0.2 ^a | 6.58 ± 0.1 ^a | 2.84 ± 0.1 ^b |

*Изменения потенциальной активности эквивалентны изменениям количества белка фермента.

Одинаковые надстрочные буквы означают отсутствие достоверного отличия.

Таблица 3. Содержание гормонов (нг/г сухой массы) в листьях сахарной свеклы разного возраста: верхние (18 д), средние (40 д) и нижние (58 д).

| Гормон | 18 д | 40 д | 58 д |
|--------|---------------------|---------------------|---------------------|
| ЦК | 22±1.6 ^a | 32±3.3 ^a | 16±1.4 ^b |
| ИУК | 178±16 ^a | 146±7 ^a | 37±4 ^b |
| АБК | 34±3 ^a | 24±4 ^b | 21±2 ^b |

Одинаковые надстрочные буквы означают отсутствие достоверного отличия.

ОБСУЖДЕНИЕ

Размер листа верхнего яруса был меньше, чем среднего, что указывает на то, что верхний лист продолжал активно расти, и в основном характеризовался высокими биохимическими показателями (табл. 1 и 2). Лист среднего яруса отличался высоким уровнем хлорофилла, растворимых белков и Рубиско, что указывало на высокую активность в нем метаболических процессов, а нижний лист – пониженным уровнем хлорофилла, растворимых белков и Рубиско, что является индикатором процессов старения, которые начались в этом органе [Romanova et al., 2011].

Тот факт, что максимально высокое содержание АБК было зарегистрировано нами в верхнем молодом листе, соответствует некоторым публикациям, где также сообщалось о более высоком уровне этого гормона в молодых листьях [Zeevaart, Boyer, 1984; Nejad, van Meeteren, 2007]. Эти данные противоречат представлению об АБК как об ингибиторе роста растений, которое доминировало до недавнего времени. Между тем, это представление было опровергнуто сведениями о том, что дефицитные по АБК мутанты имели меньшие размеры по сравнению с растениями исходного генотипа даже в условиях высокой влажности, которая исключала влияние АБК на уровне ограничения транспирации [LeNoble et al., 2004]. Было показано, что АБК может усиливать рост листьев, подавляя продукцию этилена [Hussain et al., 2000]. В обзоре Schippers с соавторами [Schippers et al, 2015] утверждается, что АБК играет двойственную роль, подавляя экспрессию генов, кодирующих белки хлоропластов и индуцируя деградацию хлорофилла в процессе старения [Liang et al., 2014] и, напротив, проявляя положительное воздействие на развитие хлоропластов в более раннем возрасте растений [Kim et al., 2009]. Таким образом, высокий уровень АБК, зарегистрированный нами в молодых листьях сахарной свеклы, не должен был быть препятствием для последующего роста и развития листа и накопления в нем хлорофилла. Предполагается, что АБК может индуцировать различный набор генов в зрелых и стареющих листьях [Guo and Gan; 2006, 2012].

Процессу роста листа верхнего яруса могла также способствовать высокая концентрация ИУК, зарегистрированная нами в молодом листе. Ранее было показано, что повышение уровня этого гормона способствует активации удлинения клеток листа [Веселов и др., 2008]. В стареющем листе сахарной свеклы нами не было зарегистрировано накопления АБК. Не исключено, что на более поздних стадиях старения повышение содержания АБК удалось бы обнаружить, поскольку по данным литературы резкое накопление этого гормона происходит на стадии, близкой к гибели листа [Cowan et al., 2005].

Повышенный уровень АБК был зарегистрирован нами в клетках паренхимы флоэмы нижнего стареющего листа сахарной свеклы. У растений пшеницы была обнаружена корреляция между концентрацией АБК во флаговом листе на фоне умеренной засухи и ремобилизацией запасенного в листе углерода, что соответствовало данным о снижении содержания хлорофилла в этом листе под влиянием экзогенной АБК [Yang et al., 2003]. Хотя мы не обнаружили увеличения суммарного содержания АБК в старом листе (вероятно, за счет отсутствия стресса), было обнаружено накопление АБК в клетках паренхимы флоэмы, возможно за счет перераспределения этого гормона между клетками листа. Эти результаты свидетельствуют о непосредственном участии данного гормона в усиленной загрузке флоэмы в стареющем листе, что соответствует сведениям о способности АБК активировать работу переносчиков, как на уровне активации экспрессии кодирующих их генов [Hoth et al.,

2010], так и за счет повышения под ее влиянием активности АТФаз [Zhang et al., 2006], обеспечивающих энергией вторично-активный транспорт.

Роль сахаров в старении листьев активно обсуждается. Тем не менее, по мнению van Doorn стимулом к старению может быть как повышенная концентрация сахаров, так и их дефицит, а накопление сахаров в стареющем листе может быть не причиной, а следствием старения [van Doorn, 2008]. Ранее у сахарной свеклы не было зарегистрировано значительного увеличения общего уровня растворимых сахаров по мере старения листа [Novichkova et al., 2008], что воспроизвелось в настоящих экспериментах. Тем не менее, в наших опытах мы зарегистрировали накопление в старом листе глюкозы, а ранее было показано снижение содержания хлорофилла в обработанных глюкозой листьях сахарной свеклы [Novichkova et al., 2008]. Именно глюкозе отводится сигнальная роль в регуляции многих процессов в растении, которую связывают с гексокиназой, выполняющей не только ферментативную, но и сенсорную функцию [Sheen, 2014]. Добавление глюкозы в питательный раствор молодых растений активировало синтез АБК, а чувствительность к глюкозе (ее способность подавлять рост и фотосинтез молодых растений) была понижена у дефицитных по АБК растений [Cheng et al., 2002]. Однако взаимодействие системы передачи сигналов от АБК и глюкозы не проявлялось у зрелых (стареющих) растений [Pourtau et al., 2004]. Эти данные литературы соответствуют результатам наших опытов, в которых не было зарегистрировано связи между уровнем АБК и глюкозы (концентрация первой повышалась в процессе старения, а АБК – оставалась неизменной).

Представляет интерес обсуждение того, что повышение концентрации глюкозы, зарегистрированное нами в листе среднего яруса сахарной свеклы по сравнению с верхним листом, не сопровождалось снижением содержания хлорофилла, уровень которого был более высоким в зрелом листе. Содержание цитокининов оставалось высоким в зрелом листе сахарной свеклы. Ранее было показано, что цитокинины могут элиминировать ингибирующее влияние глюкозы на растения [Moore et al., 2003]. Кроме того, хорошо известна способность цитокининов стимулировать фотосинтез и предотвращать старение [см. ссылки обзора Веселов и др., 2017]. Все это позволяет нам предположить, что высокий уровень цитокининов в зрелом листе сахарной свеклы мог предотвратить индукцию процессов старения под влиянием повышенной концентрации глюкозы в этом листе. Продолжая эту мысль, можно констатировать, что только на фоне снижения концентрации цитокининов, накопление глюкозы сопровождалось старением и, вероятно, стимулировало этот процесс. Это предположение нуждается в дальнейшей проверке.

Таким образом, оценка в листьях сахарной свеклы разного возраста содержания гормонов, сахаров и белков позволило выявить связь между повышенным содержанием ауксинов в молодом листе и его активным ростом, а также участие цитокининов в регуляции развития листа, которое заключалось в предотвращении старения в зрелом активно функционирующем листе. Накопление глюкозы в листе могло инициировать процесс старения на фоне пониженного содержания цитокининов. Общее содержание АБК было высоким в молодых листьях, снижалось у зрелого листа и не менялось по мере его старения. Тем не менее, с помощью метода иммуногистохимической локализации нам впервые удалось показать повышенное содержание АБК в клетках флоэмной паренхимы стареющего листа, что соответствует представлению о роли этого гормона в экспорте метаболитов из стареющего листа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barth C., Tullio M., Conklin P.L. The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence // *Journal of Experimental Botany*. 2006. V. 57(8). P. 1657–1665.
2. Cheng W.H., Akira Endo A., Zhou L., Penney J., Chen H.C., Arroyo A., Leon P., Nambara E., Asami T., Seo M., Koshiba T., Sheen J. A Unique short-chain dehydrogenase/reductase in arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions // *Plant Cell*. 2002. V. 14. P. 2723–2743.
3. Cowan A.K., Freeman M., Bjorkman P.O., Nicander B., Sitbon F., Tillberg E. Effects of senescence-induced alteration in cytokinin metabolism on source-sink relationships and ontogenic and stress-induced transitions in tobacco // *Planta*. 2005. V. 221. P. 801–814.
4. DuBois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Calorimetric Dubois Method for Determination of Sugar and Related Substances // *Analytical Chemistry*. 2002. V. 28(3). P. 350–356.
5. van Doorn W.G. Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels? // *Journal of Experimental Botany*. 2008. V. 59(8). P. 1963–1972.
6. Ghanem M.E., Albacete A., Martinez-Andujar C., Acosta M., Romero-Aranda R., Dodd I.C., Lutts S., Perez-Alfocea F. Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) // *Journal of Experimental Botany*. 2008. V. 59. P. 3039–3050.
7. Girondé A., Etienne P., Trouverie J., Bouchereau A., Le Cahérec F., Leport L., Orsel M., Niogret M.F., Nesi N., Carole D., Soulay F., Masclaux-Daubresse C., Avice J.C. The contrasting N management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanisms of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during seed filling // *BMC Plant Biology*. 2015. V.15. P. 59.
8. Guo Y., Gan S. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence // *Plant Journal*. 2006. V. 46. P. 601–612.
9. Guo Y., Gan S. Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments // *Plant, Cell and Environment*. 2012. *Plant, Cell and Environment* V. 35(3). P. 644–55.
10. Havlová M., Dobrev P., Motyka V., Storchová H., Libus J., Dobra J., Malbeck J., Gaudinová A., Vanková R. The role of cytokinins in responses to water deficit in tobacco plants over-expressing trans-zeatin O-glucosyltransferase gene under 35S or SAG12 promoters // *Plant, Cell and Environment*. 2008. V. 31. P. 341–353.
11. Hermann K., Meinhard J., Dobrev P., Linkies A., Pesek B., Heß B., Machackova I., Uwe Fischer U., Leubner-Metzger G. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): a comparative study of fruits and seeds // *Journal of Experimental Botany*. 2007. V. 58(11). P. 3047–3060.
12. Hoth S., Niedermeier M., Feuerstein A., Hornig J. and Sauer N. An ABA-responsive element in the AtSUC1 promoter is involved in the regulation of AtSUC1 expression // *Planta*. 2010. V. 232. P. 911–923.
13. Hussain A., Black C. R., Taylor I. B. and Roberts J. A. Does an antagonistic relationship between ABA and ethylene mediate shoot growth when tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants encounter compacted soil? // *Plant, Cell and Environment*. 2000. V. 23. P. 1217–1226.

14. Kim C., Lee K.P., Baruah A., Nater M., Göbel C., Feussner I., Apel K. O₂-mediated retrograde signaling during late embryogenesis predetermines plastid differentiation in seedlings by recruiting abscisic acid // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009. V. 106. P. 9920–9924.
15. Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Arkhipova T.N., Zaytsev D.Yu, Prinsen E., Egutkin N.L., Medvedev S.S., Veselov S.Yu. Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) // *Journal of Experimental Botany*. 2014. V. 65. P. 2287–2294.
16. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with folin phenol reagent // *The Journal of Biological Chemistry*. 1951. V. 193. P. 265–275.
17. LeNoble M.E., Spollen W. G. and Sharp R. E. Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression // *Journal of Experimental Botany*. 2004. V. 55. P. 237–245.
18. Liang C., Wang Y., Zhu Y., Tang J., Hu B., Liu L., Ou S., Wu H., Sun X., Chu J., Chu C. OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence associated genes in rice // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014. V. 111. P. 10013–10018.
19. Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.H., Liu Y.X., Hwang I., Jones T., Sheen J. hormonal signaling role of the arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling // *Science*. 2003. V. 300. P. 332–336.
20. Nejad A.R., van Meeteren U. The role of abscisic acid in disturbed stomatal response characteristics of *Tradescantia virginiana* during growth at high relative air humidity // *Journal of Experimental Botany*. 2007. V. 58(3). P. 627–636.
21. Novichkova N. S., Romanova A. K., Ignat'ev A. R., Mudrik V. A., Permyakov S. E., Ivanov B. N. Effect of surplus glucose on physiological and biochemical characteristics of sugar beet leaves in relation to the age of the leaf and the whole plant // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2008. V. 55(2). P. 201–210.
22. Pourtau N., Mares M., Purdy S., Quentin N., Rue A., Wingler A. Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence // *Planta*. 2004. V. 219. P. 765–772.
23. Raines T., Shanks C., Cheng C.Y., McPherson D., Argueso C.T., Kim H.J., Franco-Zorrilla J.M., Lopez-Vidriero I., Solano R., Vankova R., Schaller G.E, Joseph J. Kieber J.J. The cytokinin response factors modulate root and shoot growth and promote leaf senescence in *Arabidopsis* // *Plant Journal*. 2016. V. 85(1). P. 134–147.
24. Romanova A.K., Semenova G.A., Ignat'ev A.R., Novichkova N.S., Fomina I.R. Biochemistry and cell ultrastructure changes during senescence of *Beta vulgaris* L. leaf. // *Protoplasma*. 2016. V. 253. P. 719–727.
25. Romanova A. K., Semenova G. A., Novichkova N. S., Ignat'ev A.R., Mudrik V. A., Ivanov B. N. Physiological, biochemical, and fluorescence parameters of senescing sugar beet leaves in the vegetative phase of growth // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2011. V. 58(2). P. 271–282.
26. Schippers J.H.M., Schmidt R., Wagstaff C., Jing H.C. Living to die and dying to live: the survival strategy behind leaf senescence // *Plant Physiology*. 2015. V. 169. P. 914–930.
27. Schmidt K., Pflugmacher M., Klages S., Mäser A., Mock A., Stahl D.J. Accumulation of the hormone abscisic acid (ABA) at the infection site of the fungus *Cercospora beticola* supports the role of ABA as a repressor of plant defence in sugar beet // *Molecular Plant Pathology*. 2008. V. 9. P. 661–73.

28. Sharipova G., Veselov D., Kudsoyarova G., Fricke W., Dodd, I., Katsuhara M., Furuichi T., Ivanov I., Veselov S. Exogenous application of abscisic acid (ABA) increases root and cell hydraulic conductivity and abundance of some aquaporin isoforms in the ABA deficient barley mutant Az34 // *Annals of Botany*. 2016. V. 118(4). P.777–785.
29. Sheen J. Master regulators in plant glucose signaling networks // *Journal of Plant Biology*. 2014. V. 57(2). P. 67–79.
30. Song Y., Xiang F., Zhang G., Miao Y, Miao C., Song C.P. Abscisic Acid as an Internal Integrator of Multiple Physiological Processes Modulates Leaf Senescence Onset in *Arabidopsis thaliana* // *Frontiers in Plant Science*. 2016. V.7. P. 181.
31. Veselov S. Yu., Kudoyarova G. R., Egutkin N. L., Gyuli-Zade V. Z., Mustafma A. R., Kof E. M. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid // *Physiologia Plantarum*. 1992. V. 86. P. 93–96.
32. Vysotskaya L.B., Korobova A.V., Kudoyarova G.R. Abscisic acid accumulation in the roots of nutrient-limited plants: its impact on the differential growth of roots and shoots // *Journal of Plant Physiology*. 2008. V. 165. P. 1274–1279.
33. Wingler A., von Schaewen A., Leegood R.C., Lea P.J., Quick W. P. Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiology*. 1998. V. 116. P. 329–335.
34. Wintermans J. F., de Mots A. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol // *Biochim Biophys Acta*. 1965. V. 109(2). – P. 448–53
35. Yang J., Zhang J., Wang Z., Zhu Q. and Liu L. Involvement of abscisic acid and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling // *Plant, Cell and Environment*. 2003. V. 26. P. 1621–1631.
36. Zeevaart J., Boyer G. Accumulation and Transport of Abscisic Acid and Its Metabolites in *Ricinus* and *Xanthium* // *Plant Physiology*. 1984. V. 74. P. 934–939.
37. Zhang X.Y, Wang X.L., Wang X.F., Xia G.H., Pan Q.H., Fan R.C., Wu F.Q., Yu X.C., Zhang D.P. A Shift of Phloem Unloading from Symplasmic to Apoplasmic Pathway Is Involved in Developmental Onset of Ripening in Grape Berry // *Plant Physiology*. 2006. V. 142. P. 220–232.
38. Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р., Кудрякова Н.В., Кузнецов В.В. Роль цитокининов в стресс-устойчивости растений // *Физиология растений*. 2017. Т. 64(1). С. 1–14.
39. Веселов Д.С., Сабиржанова И.Б., Сабиржанов Б.Е., Чемерис А.В. Изменения экспрессии гена экспансина, содержания ИУК и скорости растяжения клеток листа растений кукурузы при засолении // *Физиология растений*. 2008. Т. 55. С. 108–113.