

УДК 581.143.6:581.192.6

БИОХИМИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ МИКРОКЛОНОВ ВЕЙГЕЛЫ ЦВЕТУЩЕЙ «ВАРИЕГАТА» *Weigela florida* «*Variegata*» Bunge A. D. С. К СОЛЕ- И МЕДЬИНДУЦИРОВАННЫМ СТРЕССАМ

О. А. Землянухина, В. Н. Калаев, В. С. Воронина, А. Т. Епринцев

Воронежский государственный университет
394006, Воронеж, Университетская площадь, 1

E-mail: oz54@mail.ru, dr_huixs@mail.ru, vs_voronina86@mail.ru, bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 18.01.2017 г.

Получены микроклоны многолетнего кустарника вейгелы цветущей *Weigela florida* «*Variegata*» Bunge A.D.C., адаптированные к условиям засоления и повышенного содержания ионов меди на протяжении трехступенчатого эксперимента *in vitro*. Процесс и степень адаптации изучали путем определения содержания общего растворимого белка клетки, свободного пролина, удельных активностей ферментов и изоферментных спектров пероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, NADH-дегидрогеназы, изоцитратлиазы, малатдегидрогеназы, малик-энзима. В ходе долговременной адаптации (120 сут, 3 пассажа) показано снижение уровня пролина у опытных растений до значений ниже конститутивных параметров в контроле. По изменению активности ферментов и содержанию белка наиболее отличаются от контрольных растения, выращенные на меди. В процессе длительной адаптации к стрессам наиболее специфично поведение ферментов малатдегидрогеназы и малик-энзима как в контрольных, так и в опытных растениях. Показано, что по метаболическому отклику адаптация является многофакторным процессом, первый из которых – функции ферментов, их участие в различных метаболических циклах: ЦТК (малатдегидрогеназный комплекс), окислительная ветвь пентозофосфатного цикла (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), электрон-транспортная цепь (NADH-дегидрогеназа), связь ЦТК через глиоксилат с метаболизмом глицина и серина (внеглиоксисомальная изоцитратлиаза), антиоксидантный фермент пероксидаза. Ко второму и четвертому факторам относятся условия солевого и медного стресса соответственно. Метаболический отклик изученных ферментов различен на разных ступенях адаптации при действии стрессов неодинаковой природы. Третьим фактором являются условия культивирования *in vitro*, оказывающие влияние на онтогенетические процессы. Так, по мере онтогенетического взросления в контрольных растениях увеличивается активность NADH-дегидрогеназы (в 1.9 раз), изоцитратлиазы (в 5.4 раза) и малатдегидрогеназы (в 12.3 раза), а активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы снижается в 1.8 раза, малик-энзима – в 2 раза. Активность пероксидазы остается на постоянном уровне. Для детекции нормального хода адаптации у древесных растений предложено изучение двух ферментов: изоцитратлиазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Ключевые слова: микроклоны, вейгела, ферменты, пролин, адаптация, соле- и медеустойчивость.

DOI: 10.15372/SJFS20170607

ВВЕДЕНИЕ

Одна из причин увеличения площади засоленных почв – вымывание из земли обильными дождями или поливом легкорастворимых минеральных солей. При этом влага быстро испаряется, а соли остаются на поверхности. При повышении температуры окружающей среды наблюдается так называемое вторичное засоление, что особенно актуально в условиях глобального потепления (Панкова, Конюшкова,

2013). Ионы тяжелых металлов в нормальных условиях – эссенциальные элементы, т. е. необходимые растениям в микроколичествах. При увеличении их содержания в почвах, связанном с антропогенной нагрузкой, наблюдается негативное влияние на растения тяжелых металлов, например меди, никеля, свинца, алюминия и др. В частности, это наблюдается в парковых и лесопарковых участках, озеленительных зонах, расположенных вблизи автомагистралей, неподалеку от заводов и т. д. Открытый способ до-

бычи полезных ископаемых, характерный для многих регионов России, вносит существенный вклад в нарушение баланса природных экосистем. Согласно требованиям Закона РФ «О недрах», загрязненные в результате деятельности человека территории должны быть восстановлены для их дальнейшего использования за счет рекультивации почвы биологическим способом: подобные земли заселяют растениями, способными выживать в новых условиях, цвести, плодоносить, создавать популяции. В связи с этим весьма актуальна задача получения больших количеств стрессоустойчивых растений, в том числе соле- и медеустойчивых, с помощью методов микроклонального размножения.

К роду Вейгела (*Weigela* Thunb.) относятся 3 вида кустарников, свободно произрастающих на юге Дальнего Востока России, один из которых (вейгела приятная *Weigela suavis* (Kom.) L. H. Bailey) занесен в Красную книгу Хабаровского края. Вейгела цветущая «Вариегата» (*Weigela florida* «Variegata» Bunge A. D. C.) – это зимостойкий в условиях четвертой зоны зимостойкости декоративный низкорослый кустарник, пользующийся спросом у садоводов и отличающийся желтой каемкой на листе, что придает растению дополнительную привлекательность даже после окончания цветения. Вейгела цветущая, как и вейгела приятная, широко используется для рекультивирования и озеленения техногенно загрязненных территорий.

Цель работы – получение микроклонов вейгелы цветущей «Вариегата», адаптированных к условиям солевого стресса и к влиянию катионов Cu^{2+} , изучение в них адаптивных изменений, направленных на восстановление гомеостаза. Задачи исследования – получение в результате воздействия долговременного ступенчатого стресса устойчивых кустарниковых растений, установление изменений в содержании растворимого белка и аминокислоты пролина, играющего роль маркера адаптации растительных организмов к стрессовому воздействию (Кузнецов, Шевякова, 1999), а также выявление закономерностей взаимодействия ферментов различных метаболических путей на протяжении периода адаптации (120 сут).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Введение первичного материала в культуру ткани осуществляли по описанной ранее методике (Землянухина и др., 2016). Для получения микрорастений, адаптированных к стрессу,

вызванному засолением или влиянием ионов меди, проводили 120-дневный эксперимент, для которого использовали линию растений, полученную от выгонки регенерантов из боковых стеблевых почек. В ходе первого пассажа одновозрастные растения помещали на 10 сут на поверхность питательной среды, дополненной сублетальными концентрациями морской соли (130 мМ), основным компонентом которой был NaCl (98.8 %), или меди (0.075 мМ по ионам меди CuCl_2). Выжившие растения переносили на контрольную безгормональную среду на 30 сут, по истечении которых проводили анализ активности и изоферментного спектра ряда ферментов (1-й пассаж). Опыт последовательно повторяли еще дважды на тех же самых растениях (2-й и 3-й пассажи). После 3-го пассажа повторно измеряли активность и выявляли изозимные спектры ферментов. На всех стадиях определяли содержание растворимого белка по методу Брэдфорда. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (Sigma).

Концентрации пролина определяли по Bates et al. (1973). В эксперименте использовали пищевую морскую соль, ГОСТ Р 51574-2000, полученную из каменной соли ТУ 9192-002-00352851-04 известного состава (содержание NaCl 98.8 %).

Источником меди служила соль CuCl_2 . При стандартном рН 5.6–5.8 питательных сред ионы меди выпадают в осадок, для предотвращения чего было произведено хелатирование соли ЭДТА.

Для получения ферментативных препаратов растения вейгелы *in vitro* растирали со стеклянным песком в 0.1 М *трис*-HCl-буфере, рН 7.5 и центрифугировали в эппендорфах в течение 7 мин при 20 000 g, +4 °С на центрифуге CM50 ELMi (Латвия). Надосадочные жидкости в процессе работы сохраняли в твердотельном термостате BIOSAN CH-100 (Латвия) при –3 °С.

Осуществляли анализ следующих ферментов: пероксидазы (ПО; КФ 1.11.1.7), глюкозо-6-Ф-дегидрогеназы (гл.-6-Ф-ДГ; КФ 1.1.1.49), NADH-дегидрогеназы (NADH-ДГ; КФ 1.6.99.1), изоцитратлиазы (ИЦЛ; КФ 4.1.3.1), изоцитратдегидрогеназы (NADP-форма ИДГ; КФ 1.1.1.42), малатдегидрогеназы (NAD-МДГ; КФ 1.1.1.37), малик-энзима (NAD-МЭ; КФ 1.1.1.39) (Землянухин А. А., Землянухин Л. А., 1996). Относительную общую активность рассчитывали путем отнесения изменения оптической плотности к единице времени (мин) в 1 мл ферментативного препарата с учетом коэффициента молярной экстинкции, а удельную активность – относя

общую активность к содержанию белка в 1 мл ферментативной жидкости (ФЕ/мг). Измерения проводили на спектрофотометре UNICO 2800 (США). Вертикальный электрофорез (ЭФ) осуществлен по методу Дэвиса с выявлением зон активности ферментов по руководству Е. В. Левитеса (1986). Белковые зоны выявляли после проведения ЭФ с додецилсульфатом натрия по методу Лэммли двумя способами окрашивания: с Кумасси R-250 (Laemmli, 1970) и азотнокислым серебром (Практическая химия..., 1989).

Метод окрашивания белка с помощью серебра в 100–200 раз более чувствителен, чем основанный на применении Кумасси R-250. Считается, что электрофореграммы, окрашенные двумя способами, часто отличаются друг от друга весьма значительно: одни белки могут выявляться с Кумасси, другие – с серебром, но случается, что они проявляются одинаково (Практическая химия..., 1989). Поэтому в своей работе мы использовали оба способа выявления фракций белков в акриламидных гелях.

Гели высушивали на стеклянных пластинах, в целлофане (Балаково), в растворе спирт : глицерин (1:1), а затем сканировали с разрешением 300 dpi.

В работе приведены средние значения результатов опытов в четырех биологических повторностях. Статистическая обработка данных выполнена с помощью пакета статистических программ «Stadia». Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе А. П. Кулаичева (2006). Сравнение значений признаков осуществляли с использованием непараметрического Х-критерия Ван-дер-Вардена, так как распределение изучаемых признаков не установлено или не подчиняется нормальному. Кластерный анализ проводили с использованием метрики «нормированный Евклид», стратегия классификации – группового соседа. В матрицу данных вносили средние значения активностей ферментов на каждом этапе эксперимента. Вычисление корреляций для проведения факторного анализа осуществляли с использованием коэффициента корреляции Спирмена. Выбор числа общих факторов осуществляли с использованием критерия Кеттелла.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общий растворимый белок. Несмотря на значительное влияние солевого стресса на активность целого ряда ферментов, он не оказал влияния на содержание растворимого белка в

клетках вейгелы. Так, содержание белка в контрольных растениях снижалось в 2.5 раза от 1-го пассажа к 3-му (различия с 3-м пассажем достоверны ($P < 0.05$)). У растений в условиях длительного солевого стресса содержание белка снизилось в 2.2 раза, т. е. в ходе онтогенеза у растений вейгелы происходит достоверное снижение количества белка на протяжении 120 сут как у контрольных, так и у солевых микроклонов (в 2.2–2.5 раза). Одновременно уже в конце 1-го пассажа содержание растворимого белка у растений в условиях медного стресса было в 2.1 раза меньше по сравнению с контролем (1.21 мг/мл) (различия достоверны ($P < 0.05$)). Однако к концу 3-го пассажа эта разница нивелировалась. Таким образом, в процессе адаптации все опытные растения сравнивались по содержанию белка.

В процессе акклиматизации к разным стрессам могут синтезироваться так называемые белки теплового шока. Их возникновение может быть обусловлено как высокими, так и низкими температурами, инфекциями, различного рода токсинами, включая ионы тяжелых металлов, гипоксию, засоление и т. д. Для выяснения возможного появления таких белков нами проведены электрофоретические исследования в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) с метчиками известной молекулярной массы. На рис. 1 показаны отличия в белковом спектре контрольных растений (наличие белков А и А₁) от опытных. Возможно, адаптационные процессы у вейгелы связаны с исчезновением некоторых низкомолекулярных фракций белков.

Содержание свободного пролина. В работе исследовали содержание свободного пролина, обладающего антиоксидантными, осмолитическими, протекторными свойствами, обеспечивающего постоянство клеточного метаболизма в ходе адаптации к стрессам разной природы (Кузнецов, Шемякова, 1999; Сошникова и др., 2013).

Результаты показали, что на первой стадии острого стресса (10 сут на селективной среде) содержание пролина возрастает по сравнению с контролем в 2–2.5 раза, а затем, по мере адаптации, наблюдается снижение его содержания в опытных растениях с 22.3 (солевые условия) и 26.2 (добавление меди) до 6.1 мг%/г (контроль – 11.2 мг%/г) (различия с контролем достоверны ($P < 0.05$)). При этом у контрольных растений на протяжении всего эксперимента конститутивный уровень пролина составлял около 11 мг%/г. У растений, растущих в открытом грунте, это значение составило 1.3 мг%/г (различия со все-

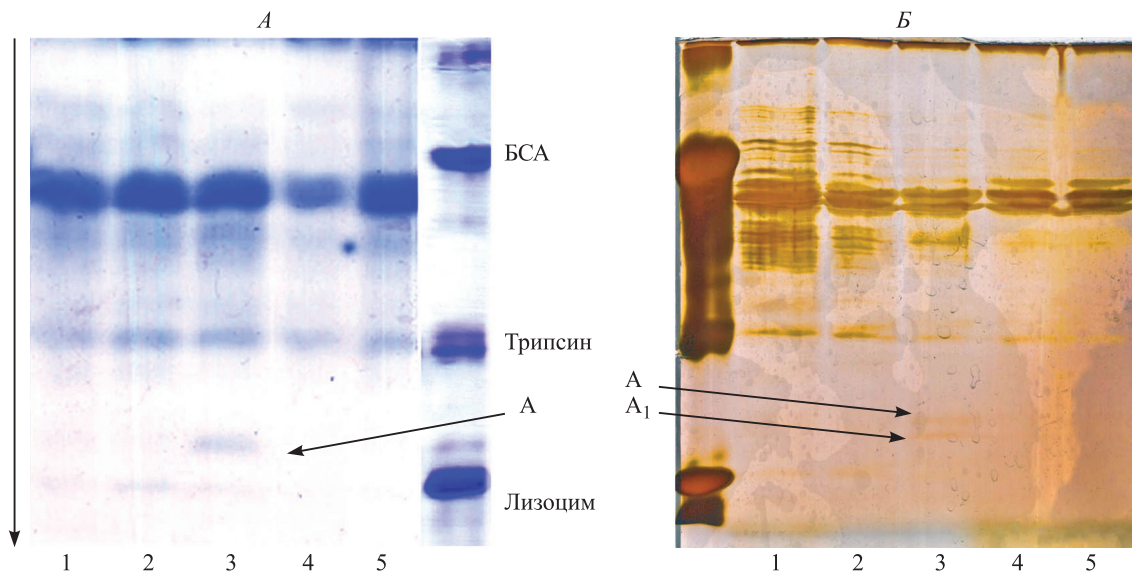


Рис. 1. Белковый спектр растений вейгелы. Обозначения: гель *A* проявлен с использованием Кумаси R-250, гель *B* – с использованием азотнокислого серебра. 1 – 174 мМ NaCl, 10 сут инкубации, 1-й пассаж; 2 – 0.075 мМ Cu²⁺, 10 сут инкубации, 1-й пассаж; 3 – контроль; 4 – 174 мМ NaCl, адаптированные растения, 3-й пассаж, 15 сут; 5 – 0.075 мМ Cu²⁺, адаптированные растения, 3-й пассаж, 15 сут. Вертикальная стрелка указывает направление тока при ЭФ; стрелка *A*₁ указывает местоположение белка, отличающего контрольные растения от опытных.

ми пассажами *in vitro* достоверны ($P < 0.01$)), т. е. по мере адаптации уровень пролина становится ниже контроля, приближаясь к таковому в условиях открытого грунта. Это является дополнительным (к ферментативному анализу) свидетельством в пользу того, что в результате трехкратного пассирования на селективных средах происходит адаптация растений к солевому и медному стрессам.

Пероксидаза. Первой реакцией на стресс у живых организмов является увеличение содержания активных форм кислорода (АФК), что приводит к изменению уровня активности ферментов, участвующих в процессе детоксикации перекисных и других соединений (Полесская, 2007). Одним из антиоксидантных ферментов является пероксидаза (ПО). Она выполняет в клетке две функции, первой из которых является окисление вещества с участием пероксида водорода, второй – оксидазная, когда фермент катализирует окисление фенольных субстратов без участия H₂O₂. Некоторые авторы отмечают увеличение активности фермента у опытных растений (Baysal Furtana, Tipirdamaz, 2010; Сошникова и др., 2013 и др.). В обсуждаемом эксперименте ПО у растений, переживших быстрый стресс (10 сут на полудетальной концентрации стрессовых агентов), через месяц инкубации на контрольной среде (1-й пассаж) выявлено достоверное увеличение удельной активности

фермента: в 1.4 раза на соли и в 1.9 раз на меди (различия с контролем достоверны ($P < 0.05$)). К концу эксперимента (120 сут) активность ПО у медеустойчивых растений снизилась почти в 2 раза, до уровня контроля, однако у солеустойчивых микроклонов удельная активность ПО была достоверно выше и не снизилась по сравнению с 1-м пассажем (табл. 1).

Изменение активности пероксидазы отчасти связано с изменением ее изоферментного спектра (рис. 2).

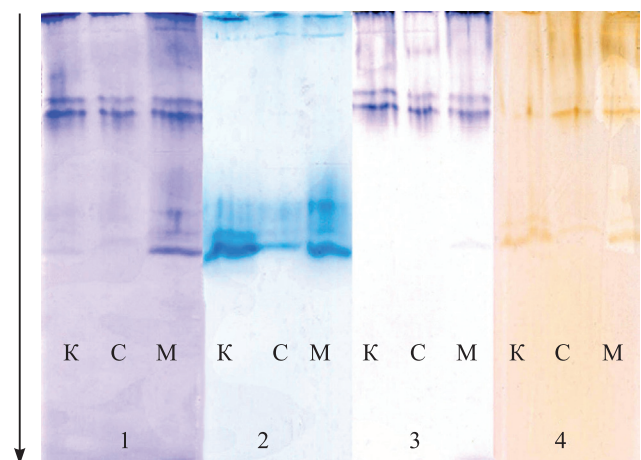


Рис. 2. Изоферментный спектр пероксидазы. Обозначения: 1 и 2 – 1-й и 3-й пассажи, субстрат – 1-нафтол в фосфатном буфере; 3 и 4 – 1-й и 3-й пассажи, субстрат – бензидин; к – контроль, с – соль, м – медь. Стрелкой указано направление движения тока при электрофорезе.

Таблица 1. Удельная активность ферментов в контрольных и опытных растениях вейгелы в 1-м и 3-м пассажах

Фермент	Пассаж	Контроль	Соль	Медь
Пероксидаза, ФЕ/мг	1	0.65 ± 0.13	0.94 ± 0.13 a	1.25 ± 0.13 aq^*
	3	0.72 ± 0.04	0.97 ± 0.09 a	0.63 ± 0.17
Гл.-6-Ф-ДГ, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	14.56 ± 2.46	5.72 ± 1.06 a	3.92 ± 0.71 a^*
	3	8.02 ± 3.11	8.56 ± 3.77	8.86 ± 2.48
NADH-ДГ, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	17.83 ± 2.01 $*$	24.62 ± 3.32 a	18.39 ± 3.63 q
	3	33.64 ± 5.56	27.38 ± 3.97	20.01 ± 5.14
Изоцитратлиаза, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	8.15 ± 0.90 $*$	9.09 ± 1.74 $*$	16.37 ± 1.81 aq^*
	3	44.25 ± 8.64	40.87 ± 7.54	44.28 ± 11.43
МДГ, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	27.29 ± 2.95 $*$	24.18 ± 2.46 $*$	11.75 ± 2.50 aq^*
	3	335.10 ± 39.47	237.10 ± 22.04 a	231.20 ± 21.69 a
Малик-энзим, ФЕ/мг × 10 ⁻³	1	80.40 ± 11.48 $*$	81.09 ± 8.44 $*$	98.95 ± 7.01 $*$
	3	39.86 ± 3.13	15.25 ± 3.19 a	11.36 ± 2.61 a

Примечания. * Различия с третьим пассажем достоверны ($P < 0.05$); a – различия с контролем достоверны ($P < 0.05$); q – различия с солью достоверны ($P < 0.05$).

Использование нескольких способов окрашивания изоформ ПО показало, что два субстрата по-разному выявляют спектр фермента. Так, использование 1-нафтола и бензидина позволяет выявить после 1-го пассажа одинаковый изоферментный спектр в катодной зоне геля (R_f 0.190–0.222), но в зоне с R_f от 0.444 до 0.524 выявляются дополнительные фракции ПО при окрашивании 1-нафтолом, которые при взаимодействии с бензидином проявляются только у растений на медном стрессе.

После 3-го пассажа в геле, обработанном 1-нафтолом, исчезают зоны с R_f 0.190–0.222, присутствующие в спектре при окрашивании с бензидином. Это объясняется, скорее всего, специфичностью отдельных изоформ ПО по отношению к определенному субстрату. Можно предположить, что весь набор изоформ фермента позволяет растениям наиболее полно осуществлять реакцию разложения перекисных соединений в ходе приспособления к долговременным стрессовым условиям среды.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. Реакция, катализируемая ферментом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (гл.-6-Ф-ДГ), является ключевой в пентозофосфатном цикле на первом, окислительном, этапе. При этом происходит восстановление молекулы $NADP^+$ до NADPH. Фермент является аллостерическим, т. е. при снижении уровня $NADPH^+$ активность энзима снижается, а глюкозо-6-фосфат утилизируется в гликолизе (Krüger, von Schaewen, 2003). Снижение активности фермента в процессе онтогенеза у контрольных растений в 1.8 раз к

концу 120 сут объясняется, вероятно, образованием листьев с нормально развитыми устьицами в связи с взрослением растений. Некоторые авторы показали, что снижение активности гл.-6-Ф-ДГ наряду с активностью NADPH-оксидазы является протекторным при защите растения от повреждающих стрессов (Pugin et al., 1997). В результате влияния быстрого стресса (1-й пассаж) активность фермента значительно падает по сравнению с контролем: в 2.5 раза на соли и в 3.7 раза у растений, выдержанных на меди. Ранее нами показано, что у сахарной свеклы *in vitro* в условиях водного дефицита K_M снижается в 1.3 раза, что, возможно, связано с изменением структуры активного центра в связи с повышением сродства фермента к субстрату (Землянухина и др., 2009). Однако к концу эксперимента (120 сут, 3-й пассаж) активность гл.-6-Ф-ДГ в опытных растениях выходит на уровень контроля. Окислительный стресс – это эволюционно закрепленный отклик организма на неблагоприятное воздействие окружающей среды (Hauschild, von Schaewen, 2003). Активность NADPH-оксидазы и образование АФК зависят от быстрого образования NADPH в цитозоле, которое требует усиления метаболизма углеводов. Однако в растительных клетках в условиях стресса наблюдается снижение активности целого ряда циклов (пентозофосфатного, шикиматного, гликолиза и др.) из-за снижения содержания углеводов, медленно поступающих в ткани. Показано, что в устойчивых к патогену *Phytophthora nicotianae* листьях табака наблю-

Таблица 2. Изоферментные спектры пероксидазы, NADH-дегидрогеназы, малатдегидрогеназы, малик-энзима, изоцитратдегидрогеназы в контрольных (к) растениях вейгелы цветущей на солевом (с) и на медном стрессе (м)

Относительная электро-форетическая подвижность, R_f	Пероксидаза*			NADH-дегидрогеназа			Малат-дегидрогеназа			Малик-энзим			Изоцитрат-дегидрогеназа		
	к	с	м	к	с	м	к	с	м	к	с	м	к	с	м
0.031										-	+	-			
0.032	+	+	+												
0.044													-/+	-/+	-/+
0.057										+	+	+			
0.124										+	+	-			
0.149							+	+	+						
0.159							+	+	+						
0.188				+	+	+									
0.190	+/-	+/-	+/-												
0.221				+	-	+									
0.222	+/-	+/-	+/-												
0.264							+	+	+						
0.278							+	+	+						
0.444	+	+	+												
0.492	+	+	+												
0.524	+	+	+												

Примечание. * Гель проявлен с помощью 1-нафтола; разделительный знак «/» указывает номер пассажа: 1-й или 3-й.

даются более ранние отклики на стресс, а эти процессы, в свою очередь, стимулируют синтез цитозольной гл.-6-Ф-ДГ (КФ 1.1.1.49) *de novo*, подтверждая защитную роль фермента (Scharte et al., 2009).

У высших растений пентозофосфатный цикл является главным источником поддержания уровня NADPH при протекании свободнорадикальных процессов в биосинтезе и процессах ассимиляции в цитозоле. Именно поэтому у высших растений в цитозоле присутствует только окислительная ветвь пентозофосфатного цикла (Eicks et al., 2002), в которой образуются С5-сахарофосфаты.

Показано (Wendt et al., 2000), что изоферменты гл.-6-Ф-ДГ делятся на 2 класса: первый включает изозимы со сниженной активностью для избегания бесполезных взаимодействий с циклом Кальвина в хлоропластах, второй – понижает окислительно-восстановительный потенциал, но увеличивает устойчивость к NADPH. Последний необходим в строме в течение темновой фазы фотосинтеза для поддержания ферредоксин-зависимых реакций. Увеличение глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной активности у опытных растений до контрольных значений свидетельствует о нормализации клеточных процессов в процессе адаптации при длительных солевом и медном стрессах.

NADH-дегидрогеназа. Наружные митохондриальные дегидрогеназы окисляют NADH и NADPH. Эти два фермента имеют разную чувствительность к ингибиторам, поэтому, по мнению некоторых авторов, они представляют собой два разных фермента (Rasmusson et al., 2008). Так как мы не определяли субклеточную локализацию NADH-дегидрогеназы, называемую альтернативной дегидрогеназой, то, скорее всего, определяемый фермент представляет собой совокупность кальцийзависимых дегидрогеназ в клетке.

Нами показано, что в онтогенезе (120 сут культивирования в условиях *in vitro*) контрольных растений происходит возрастание активности фермента почти в 1.9 раза (различия с контролем достоверны ($P < 0.05$)). У растений в условиях солевого стресса активность фермента возрастает к концу 1-го пассажа примерно в 1.4 раза (различия с контролем достоверны ($P < 0.05$)), но к концу эксперимента уровень NADH-дегидрогеназы достоверно не отличается от контроля. У растений, культивируемых с ионами меди, на протяжении всего эксперимента не наблюдалось достоверных различий с контролем (табл. 2). За период исследования выявлено две изоформы фермента с R_f 0.188 и 0.221 как в контрольных, так и в опытных вариантах. Полученные результаты согласуются с выводом

о достижении высокого уровня адаптации растений вейгелы.

Считается, что в подобных процессах могут участвовать так называемые «гены ферментативного сопротивления» (Taler et al., 2004).

Изоцитратлиаза (ИЦЛ) считается главным ферментом глиоксилатного цикла (Землянухин и др., 1986; Епринцев и др., 2013), участвующим в глюконеогенезе и локализованным в глиоксисомах. Изоцитратлиаза также принимает участие в биосинтезе серина и глицина, образовании щавелевой кислоты в клетках высших растений (Землянухин А. А., Землянухин Л. А., 1995).

Однако в работе (Igamberdiev, Eprintsev, 2016) показано, что при старении растений активируется внеглиоксисомальный изофермент ИЦЛ, утилизирующий липиды мембран и белки отмирающих клеток. Таким образом, в настоящее время доказано, что существуют две формы фермента: глиоксисомальная и цитоплазматическая, причем последняя работает при более низком рН (6.5) и активируется ионами Mn^{2+} . Цитозольная форма ИЦЛ действует независимо от глиоксилатного цикла и участвует в превращении органических кислот, ее активность увеличивается к 7-м суткам прорастания семян и остается далее на постоянном уровне (Eprintsev et al., 2015). В проведенном эксперименте активность изоцитратлиазы в процессе онтогенеза растений вейгелы (120 сут) возрастала в 5.4 раза (различия достоверны ($P < 0.05$)), при этом прирост стеблей в высоту составлял до 11 см. Известно, что при культивировании растений на искусственных питательных средах обеспечивается миксотрофное питание, причем гетеротрофное – в присутствии эндогенной сахарозы, а автотрофное – за счет процессов фотосинтеза. В условиях *in vitro* создается 100%-я влажность, функционирование устьиц останавливается, меняется газовый состав внутри культивационных сосудов (увеличивается содержание этилена), что является причиной ускорения онтогенетического взросления листьев у культивируемых растений (Деменко и др., 2010; Машкина и др., 2011). Именно онтогенетическими процессами, на наш взгляд, обусловлено столь значительное возрастание активности ИЦЛ у 120-дневных растений вейгелы. К концу эксперимента удельная активность ИЦЛ у опытных и контрольных вариантов сравнивалась, однако в конце 1-го пассажа она различалась. Так, засоление не оказало влияния на активность фермента по сравнению с контролем, а воздействие ионов меди в 1.8 раза

увеличило активность фермента по сравнению с солевым вариантом (различия с солью достоверны ($P < 0.05$)). Эти изменения связаны с различием влияния двух стрессовых агентов и обратимы по мере адаптации растений в процессе длительного стресса.

Изоцитратдегидрогеназа. Еще один фермент, участвующий в окислительном декарбоксилировании изоцитрата (кроме ИЦЛ), – NADP-зависимая изоцитратдегидрогеназа (ИДГ). Считается, что NADP-зависимая ИДГ локализована в основном в цитозоле (около 90 %), т. е. цитозоль – основной источник образования 2-оксоглутарата (Igamberdiev, Eprintsev, 2016). Главной функцией фермента является образование NADPH, который необходим для восстановительных анаболических процессов (Нельсон, Кокс, 2014). Однако в нашем эксперименте в 1-м пассаже активности фермента не обнаружено. Лишь в конце 3-го пассажа обнаружилась незначительная активность ИДГ, не превышающая значение 6.8×10^{-3} ФЕ/мг у всех обследованных растений. Результаты подтверждаются проведением ЭФ в 7.5%-м ПААГ: после 1-го пассажа активности изоформ фермента не выявлено, лишь после 3-го появляется единственная зона активности ИДГ в области R_f 0.044.

Малатдегидрогеназный комплекс. Цикл трикарбоновых кислот – ключевой этап клеточного дыхания, одной из ступеней которого является превращение малата с помощью малатдегидрогеназного комплекса. Малат – одна из наиболее накапливаемых кислот в растениях, принимающая участие в хелатировании ионов тяжелых металлов (Gupta et al., 2013), в реакции замыкающих клеток устьиц и многих других процессах. Малатдегидрогеназа (МДГ) выполняет важную функцию в поддержании соотношения NADH/NAD, сохраняя NADH на низком уровне (Igamberdiev, Eprintsev, 2016).

Некоторыми авторами показано, что функционирование МДГ-комплекса в условиях засоления приобретает большое значение. Утилизация малата в клетках идет с помощью двух малатдегидрогеназ и двух малик-ферментов (Eprintsev, Fedorina, 2006). Наиболее изучен фермент NAD-зависимая оксидоредуктазная МДГ (КФ 1.1.1.37), катализирующая превращение малата в оксалоацетат. Нами изучена активность данного фермента в реакции утилизации оксалоацетата в присутствии NADH. Фермент именуется далее малатдегидрогеназа. Вторым изучаемым ферментом комплекса был малик-энзим (КФ 1.1.1.39) – NAD-зависимый фермент,

катализирующий превращение малата в пируват (Eprintsev, Fedorina, 2006). Растения вейгелы, как и большинство растений, относятся к C_3 -типу (основному типу фотосинтеза). Поскольку цель нашей работы – получение адаптированных к засолению и повышенному содержанию ионов тяжелых металлов (Cu^{2+}) растений вейгелы, следовало зарегистрировать возможные изменения в активности малатдегидрогеназы при длительном стрессе.

Наши результаты показывают, что в растениях вейгелы при длительном стрессе МДГ постоянно представлена четырьмя изоформами с R_f 0.149, 0.159, 0.264 и 0.278, соотношение между которыми на протяжении эксперимента не менялось. То же относится и к малик-энзиму, изоферментный спектр которого представлен двумя изоформами с R_f 0.062 и 0.131 у всех растений на протяжении всего эксперимента. Вполне вероятно, что в течение острой фазы эксперимента (10 сут) происходят изменения в количестве изоформ МДГ, но после месяца восстановления этих признаков не отмечено. Однако наблюдаются отличия в активности ферментов. Так, удельная активность МДГ в контрольных растениях достоверно выше (различия с контролем достоверны ($P < 0.05$)) по сравнению с растениями, подвергнутыми солевому стрессу, а в растениях на среде с полулетальной концентрацией меди активность фермента снижается по сравнению с контролем в 2.3 раза (различия достоверны как по отношению к солевым, так и к контрольным растениям ($P < 0.05$)). По мере адаптации к концу 3-го пассажа удельная активность МДГ значительно возрастает как у контрольных, так и у опытных растений: в 12.3 раза в контроле, в 9.8 раза у солеустойчивых и в 19.7 раза у медеустойчивых растений, при этом различия между опытными и контрольными растениями сохраняются и они достоверны ($P < 0.05$).

Если активность МДГ значительно увеличивается по мере адаптации растений, то активность малик-энзима, наоборот, уменьшается: в 2 раза у контрольных растений, в 5.3 раза у солеустойчивых и в 8.7 раза у медеустойчивых. Причем активность у опытных растений по сравнению с контрольными после 1-го пассажа достоверно не отличалась. Долговременная адаптация сказалась на последнем этапе, в конце 120 суток инкубации. Известно, что малик-энзим поддерживает обходной путь окисления малата при наличии высоких концентраций оксалоацетата, а также, возможно, при неблагоприятных условиях среды (Eprintsev, Fedorina, 2006).

Таким образом, показано, что активность МДГ и малик-фермента в процессе онтогенеза пробирочных растений изменяется противоположным образом. Так, удельная активность МДГ у контрольных и опытных растений достоверно значительно возрастает, хотя и по-разному, в ответ на стрессы разной природы, а активность малик-энзима, наоборот, достоверно падает.

Тяжелые металлы приводят к образованию АФК, следствием чего является увеличение активности фермента антиоксидантной защиты ПО, денатурации белков, усиление перекисного окисления липидов (Терлецкая, 2012). Считается, что растения на антропогенно загрязненных тяжелыми металлами территориях вырабатывают защитные механизмы, включая хелатирование ионов такими органическими кислотами, как малат, оксалат, цитрат и др., выделяющимися корнями. Механизм включает также компартментацию ионов в вакуолях, выделение корнями специальной слизи, содержащей кроме органических кислот белки связывания.

Кластерный анализ результатов. На основании результатов опытов по определению активностей шести ферментов и содержания белка в образцах при выращивании вейгелы в условиях *in vitro* в присутствии соли и меди можно построить дендрограмму кластерных расстояний между вариантами эксперимента (рис. 3).

По изменению активности ферментов и содержанию белка наиболее отличаются от контрольных растения, выращенные на меди.

Дендрограммы кластерных расстояний между ферментами, построенные на основании изменения их активностей при разных способах выращивания *in vitro*, показаны на рис. 4, А–В. В процессе длительной адаптации к стрессам наиболее специфично поведение ферментов малатдегидрогеназы и малик-энзима как в контрольных, так и в опытных растениях. В контро-

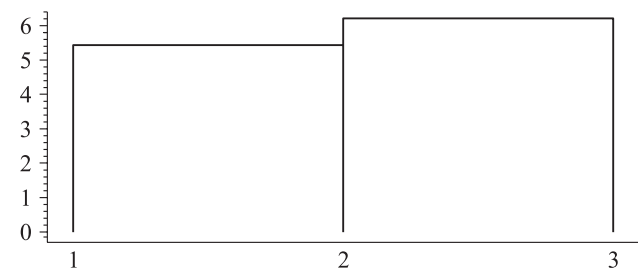


Рис. 3. Дендрограмма кластерных расстояний между вариантами эксперимента, построенная по активностям шести ферментов при разных способах выращивания вейгелы в условиях *in vitro*. Обозначения: 1 – контроль, 2 – соль, 3 – медь.

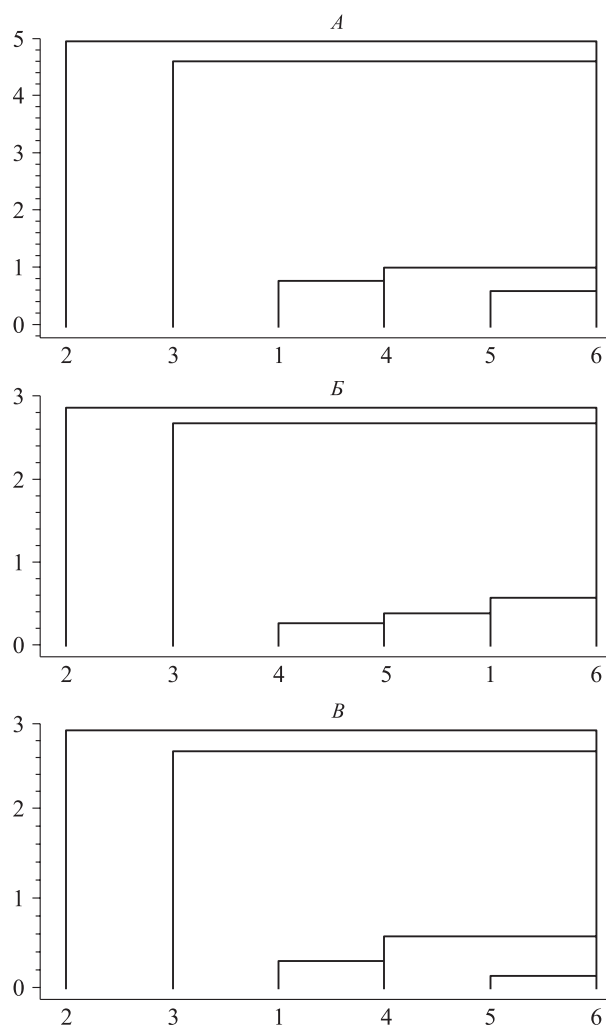


Рис. 4. Дендрогаммы кластерных расстояний между вариантами эксперимента, построенные по активностям ферментов при разных способах выращивания вейгелы в условиях *in vitro*. Обозначения: А – контроль, Б – соль, В – медь; 1 – глюкозо-6-Ф-ДГ; 2 – малатдегидрогеназа; 3 – малик-энзим; 4 – NADH-дегидрогеназа; 5 – изоцитратлиаза; 6 – пероксидаза.

ле отмечается кластеризация глюкозо-6-Ф-ДГ с изоцитратлиазой, пероксидазы – с NADH-дегидрогеназой. В опытных образцах фермент NADH-дегидрогеназа образует кластер с изоцитратлиазой, а глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа – с пероксидазой, что соотносится с результатами

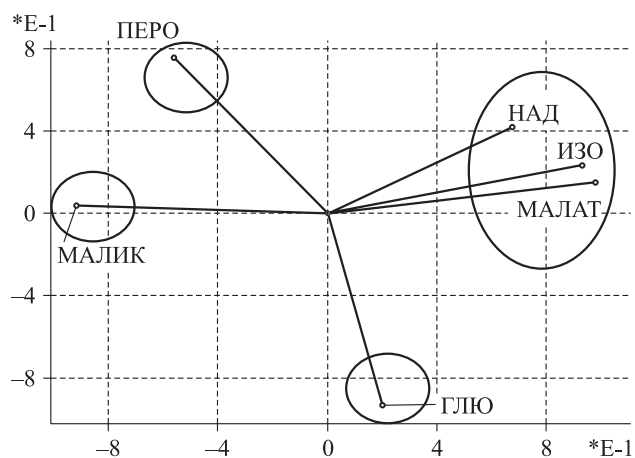


Рис. 5. Проекция нагрузок (ось X – 1-й фактор, ось Y – 2-й фактор) в факторном анализе адаптационного поведения ферментов при долговременном стрессе в условиях *in vitro* (120 сут). Обозначения: перо – пероксидаза, изо – изоцитратлиаза, малат – малатдегидрогеназа, малик – малик-энзим, над – NADH-дегидрогеназа, глю – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

колебаний активностей ферментов в течение периода адаптации (см. табл. 1).

Факторный анализ результатов. Факторный анализ позволил выявить компактную систему из четырех основных факторов, отражающих 98.68 % дисперсии системы фермент–тип эксперимента (вместо исходного шестимерного пространства свойств).

Исследуемые ферменты образуют хорошо различимые группировки (исходные переменные проецируются на один из четырех главных факторов), что позволяет интерпретировать результаты, не используя «вращение» факторов (рис. 5, проекции на плоскости 1-го и 2-го факторов).

Семантический смысл выделенных факторов позволяет найти группировки ферментов по наибольшим нагрузкам основных факторов (табл. 3). После исследования табл. 3 можно дать следующие интерпретации четырех факторов, оказывающих влияние на характер изменения активностей ферментов в ходе онтогенеза и адаптации.

Таблица 3. Группировка ферментов и вариантов эксперимента по факторам

Вариант групп	Номер фактора			
	1	2	3	4
Ферменты	Малик-энзим, МДГ, Гл.-6-Ф-ДГ, изоцитратлиаза	Гл.-6-Ф-ДГ, NADH-ДГ	Изоцитратлиаза, МДГ, NADH-ДГ	Пероксидаза
Варианты эксперимента	Контроль	Соль, 3-й пассаж	Соль, 1-й пассаж, контроль	Медь, 1-й и 3-й пассажи

Первым фактором являются функции ферментов. Так, NADH-малатдегидрогеназа и NAD-малик-энзим являются ферментами цикла трикарбоновых кислот, функционирующими в митохондриях, как и фермент NADH-дегидрогеназа, действующий на митохондриальной мембране.

Внеглиоксисомальная изоцитратлиаза локализована в цитоплазме и влияет на сохранение баланса потоков сукцината и изоцитрата, связывая ЦТК через глиоксилат с метаболизмом глицина и серина (Eprintsev et al., 2015). Фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа функционирует в пентозофосфатном цикле. Пероксидаза является внецикловым энзимом, принимающим участие в регуляции окислительно-восстановительного баланса клетки.

Вторым фактором является действие солевого стресса, при этом ферменты по-разному реагируют на стрессовое влияние на разных этапах адаптации.

Так, активность ПО в сравнении с контролем возрастает примерно в 1.3 раза, повышенная активность сохраняется на протяжении всего опыта. Активность гл.-6-Ф-ДГ в 1-м пассаже снижается в 2.5 раза, а к концу 3-го поднимается до уровня контроля. NADH-ДГ в 1-м пассаже повышается в 1.4 раза, а к концу эксперимента сравнивается с контролем. На активности ИЦЛ не сказывается влияние соли ни на одном из этапов исследования. На активность МДГ и МЭ соль оказывает влияние только при долгосрочном стрессе: на 1-м пассаже разницы между опытными и контрольными растениями не обнаруживается, влияние сказывается к концу эксперимента. При этом, хотя активность МДГ возрастает почти в 10 раз за 120 сут, она ниже в 1.4 раза в сравнении с контролем. Активность МЭ, наоборот, снижается в 5.3 раза, оставаясь ниже контрольных значений в 3-м пассаже в 2.6 раза. Малат занимает центральное место в метаболизме растений, поэтому малатдегидрогеназный ферментативный комплекс играет столь значительную роль в реакциях адаптации к стрессовым влияниям.

Третьим фактором являются условия *in vitro*, оказывающие влияние на онтогенетические процессы, происходящие в культуре ткани. Так, по мере онтогенетического взросления в контрольных растениях увеличивается активность NADH-дегидрогеназы (в 1.9 раз), изоцитратлиазы (в 5.4 раза) и малатдегидрогеназы (в 12.3 раза). Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы снижается в 1.8 раза, малик-эн-

зима – в 2 раза. Активность пероксидазы остается на постоянном уровне.

Четвертым фактором является влияние ионов меди, относящейся к тяжелым металлам, обладающим высокой токсичностью. Ионы меди способны накапливаться, вызывая самые различные нарушения жизнедеятельности. Активность пероксидазы во время 1-го пассажа при медном стрессе увеличивается в 1.9 раза, снижаясь до уровня контроля по мере адаптации. Фермент гл.-6-Ф-ДГ показывает наиболее значительное снижение активности (в 3.7 раза) в 1-м пассаже, сравниваясь с контролем к концу эксперимента. Активность NADH-ДГ не зависит от влияния ионов меди ни на одном из этапов эксперимента, а активность ИЦЛ, наоборот, возрастает в 2 раза в 1-м пассаже, снижаясь до контрольных значений к 120 сут. Ионы меди ингибируют активность МДГ на первом этапе в 2.4 раза, что не отмечено при действии соли. Негативное действие металла сказывается и к концу эксперимента: удельная активность малатдегидрогеназы снижается в 14 раз и более по сравнению с контролем. Сопряженный фермент малик-энзим, как и при действии соли, на начальных этапах адаптации оказался не подвержен действию стрессового фактора. К концу эксперимента его активность падала в 2–8 раз как в опытных, так и в контрольных вариантах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате долговременного ступенчатого процесса получены онтогенетически зрелые, хорошо укорененные микроклоны растений вейгелы цветущей, адаптированные к условиям засоления и присутствию тяжелых металлов (медь).

Выводы в пользу получения адаптированных растений подкреплены изучением содержания свободного пролина: в ходе эксперимента его количество у опытных растений становится ниже контрольных, приближаясь к таковым у растений *in vivo*.

Изучение шести ферментов разных метаболических циклов выявило существенное различие в их стрессовом отклике на разных этапах адаптации. Так, активность пероксидазы у растений, растущих на селективной среде с ионами меди, возрастает на первом этапе, но к концу эксперимента (120 сут) сравнивается с контролем. Наименьшие изменения отмечаются в активности NADH-дегидрогеназы, что говорит о достаточном пуле свободного NADH⁺ в клетке.

Ферменты МДГ-комплекса, NADH-зависимая малатдегидрогеназа и NAD-малик-энзим утилизируют субстраты в противоположном направлении: активность МДГ значительно возрастает, а малик-энзима падает. Активность аллостерического фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в значительной степени зависит от уровня NADP, который при действии стресса может снижаться, становясь, таким образом, физиологически значимым фактором. Результаты данной работы показывают снижение активности энзима как при действии стресса, так и в онтогенезе растений.

Кластерный анализ по изменению активности всех изученных ферментов и содержанию белка позволил установить, что наиболее отличаются от контрольных растения, выращенные на меди. Факторный анализ выявил, что активность ферментов в ходе длительной адаптации в условиях *in vitro* зависит от ряда факторов: различия функций ферментов, их связи с функционированием в разных метаболических циклах; разной природы стрессовых факторов (соль, медь); условий культивирования *in vitro*.

Для детекции адаптации древесных растений можно предложить изучение удельных активностей двух ферментов, активность которых у опытных и контрольных вариантов достоверно выравнивается к концу эксперимента. Это глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и изоцитратлиаза. Совокупность физиолого-биохимических реакций ферментов на изменения окружающей среды создает возможности для адаптации растений к стрессовым условиям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Деменко В. И., Шестибратов К. А., Лебедев В. Г. Укоренение – ключевой этап размножения растений *in vitro* // Изв. ТСХА. 2010. Вып. 1. С. 73–85.
- Епринцев А. Т., Сальников А. В., Хаба А. М., Зайчикова М. В. Изоферменты изоцитратлиазы и их роль у организмов разного уровня организации // Усп. совр. биол. 2013. Т. 133. № 6. С. 531–544.
- Землянухин А. А., Землянухин Л. А. Метаболизм органических кислот растений. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1995. 152 с.
- Землянухин А. А., Землянухин Л. А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1996. 188 с.
- Землянухин А. А., Землянухин Л. А., Епринцев А. Т., Игамбердиев А. У. Глиоксилатный цикл растений. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1986. 148 с.
- Землянухина О. А., Калаев В. Н., Воронина В. С. Микрклональное размножение вейгелы приятной и вейгелы пестролистной *Kosteriana variegata* // Вестн. ВГУ. Сер.: Хим., биол., фармация. 2016. № 1. С. 72–75.
- Землянухина О. А., Черкасова Н. Н., Жужжалова Т. П. Метаболическая адаптация растений сахарной свеклы *in vitro* к условиям водного дефицита // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. Сб. науч. тр. Воронеж, 2009. Вып. 11. С. 96–102.
- Кузнецов Вл. В., Шевякова Н. И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиол. раст. 1999. Т. 48. № 2. С. 321–336.
- Кулаичев А. П. Методы и средства комплексного анализа данных. Учеб. пособ. Изд. 4-е. М.: ФОРУМ – ИНФРА-М, 2006. 512 с.
- Левитес Е. В. Генетика изоферментов растений. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1986. 145 с.
- Машкина О. С., Буторина А. К., Табацкая Т. М. Карельская береза (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl.) как модель для изучения генетической и эпигенетической изменчивости при формировании узорчатой древесины // Генетика. 2011. Т. 47. № 8. С. 1073–1080.
- Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. Биоэнергетика и метаболизм. Т. 2. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. 636 с.
- Панкова Е. И., Конюшкова М. В. Влияние глобального потепления климата на засоленность почв аридных регионов // Бюл. Почвенного ин-та им. В. В. Докучаева. 2013. Вып. 71. С. 3–15.
- Полесская О. Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: М.: КДУ, 2007. 140 с.
- Практическая химия белка / под ред. А. Дарбре. М.: Мир, 1989. 623 с.
- Сошникова Т. Н., Радюкина Н. Л., Королькова Д. В., Носов А. В. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salsuginea* при окислительном стрессе // Физиол. раст. 2013. Т. 60. № 1. С. 47–60.
- Терлецкая Н. В. Неспецифические реакции зерновых злаков на абиотические стрессы *in vivo* и *in vitro*. Алматы: ИП Н. А. Волкова, 2012. 208 с.
- Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant Soil. 1973. V. 39. P. 205–207.
- Baysal Furtana G., Tipirdamaz R. Physiological and antioxidant response of three cultivars of cucumber *Cucumis sativus* L. to salinity // Turk. J. Biol. 2010. V. 34. P. 287–296.
- Eicks M., Maurino V., Knappe S., Flügge U. I., Fischer K. The plastidic pentose phosphate

- translocation represent a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants // *Plant Physiol.* 2002. V. 128. P. 512–522.
- Eprintsev A. T., Fedorin D. N., Salnikov A. V., Igamberdiev A. U.* Expression and properties of the glyoxysomal and cytosolic forms of isocitrate lyase in *Amaranthus caudatus* L. // *J. Plant Physiol.* 2015. V. 181. P. 1–8.
- Eprintsev A. T., Fedorina O. S.* Function of malate dehydrogenase complex of maize mesophyll and bundle sheath cells under salt stress conditions // *J. of Stress Physiology & Biochemistry.* 2006. V. 2. N. 2. P. 4–9.
- Gupta N., Gaurav S. S., Kumar A.* Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a review // *Am. J. Plant. Sci.* 2013. V. 4. P. 21–37.
- Hauschild R., von Schaewen A.* Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activity in potato *Solanum tuberosum* L. // *Plant Physiol.* 2003. V. 133. P. 47–62.
- Igamberdiev A. U., Eprintsev A. T.* Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants // *Frontiers in Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 1–15.
- Krüger N. J., von Schaewen A.* The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organization // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003. V. 6. P. 236–246.
- Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 // *Nature.* 1970. V. 227. N. 5259. P. 680–685.
- Pugin A., Frachisse J. M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R., Guern J.* Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells. Involvement of plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway // *Plant Cell.* 1997. V. 9. P. 2077–2091.
- Rasmusson A. G., Geisler D. A., Møller I. M.* The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria // *Mitochondrion.* 2008. V. 8. P. 47–60.
- Scharte J., Schön H., Tjaden Z., Weis E., Schaewen A. von.* Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. N. 19. P. 8061–8066.
- Taler D., Galperin M., Cohen Y., Kenigsbuch D.* Plant eR genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 172–184.
- Wendt U. K., Wenderoth I., Tegeler A., von Schaewen A.* Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato *Solanum tuberosum* L. // *Plant J.* 2000. V. 23. P. 723–733.

BIOCHEMICAL ADAPTATION OF *Weigela florida* «VARIEGATA» Bunge A. D. C. MICROCLONES TO SALT- AND COPPER INDUCED STRESS

O. A. Zemlyanukhina, V. N. Kalaev, V. S. Voronina, A. T. Eprintsev

Voronezh State University

Universitetskaya Ploshchad', 1, Voronezh, 394006 Russian Federation

E-mail: oz54@mail.ru, dr_huixs@mail.ru, vs_voronina86@mail.ru, bc366@bio.vsu.ru

Microclones of perennial shrub *Weigela florida* «*Variegata*» were prepared, adapted to the conditions of salinity and increased copper ions proportion during the three-step *in vitro* experiment. The process and the degree of adaptation were studied by determining the concentration of total soluble cell protein, free proline, specific enzyme activities and isozyme spectra of peroxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADH dehydrogenase, isocitrate lyase, malate dehydrogenase, and malic enzyme. In the course of long-term adaptation (120 days, 3 passages), the level of proline in experimental plants is reduced to values below the constitutive parameters in the control. Plants that are grown on copper have the most differences from control ones for changes in enzyme activities and protein content. Malate dehydrogenase and malic enzyme behavioral model are most specific during the long-term adaptation to stress as in control and experienced plants. According to the metabolic response adaptation is the multifactorial process. The first factor is the function of enzymes, their participation in various metabolic cycles: CTC (malate dehydrogenase complex), oxidative branch of the pentose-phosphate cycle (glucose-6-phosphate dehydrogenase), electron transport chain (NADH dehydrogenase), connection with CTC via glyoxylate with metabolism of glycine and serine (extra-glyoxysomal isocitrate lyase), and antioxidant enzyme peroxidase. The second and fourth factors are the conditions of influence of salt stress and copper stress, respectively. The metabolic responses of the enzymes are dissimilar at different stages of adaptation under the action of stresses of unequal nature. The third factor is the conditions of *in vitro* cultivation, which affect ontogenetic processes. Thus, in the process of ontogenetic mature in the control plants the activity of NADH dehydrogenase (1.9-fold), isocitrate lyase (5.4-fold) and malate dehydrogenase (12.3-fold) increase, of activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (1.8-fold) and malic enzyme (2-fold) decrease. The activity of peroxidase remains at a constant level. We would like to highlight the idea that specific activities of only two representative enzymes such as isocitrate lyase and glucoso-6-phosphate dehydrogenase are sufficient to determine the processes necessary for normal adaptation of woody plants.

Keywords: *microclones, weigela, enzymes, proline, adaptation, salt resistance, copper resistance.*

How to cite: Zemlyanukhina O. A., Kalaev V. N., Voronina V. S., Eprintsev A. T. Biochemical adaptation of *Weigela florida* «*Variegata*» Bunge A. D. C. microclones to salt- and copper induced stress // *Sibirskij Lesnoj Zurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2017. N. 6: 89–101 (in Russian with English abstract).