

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen641977>

Оригинальное исследование



Анализ роли H^+ -АТФазы тонопласта в обеспечении роста растяжением клеток coleoptилей проростков риса, различающихся скоростью роста в условиях нормоксии и затопления

А.А. Кирпичникова, М.О. Бикташева, В.В. Емельянов, М.Ф. Шишова

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Актуальность. Одна из стратегий адаптации к затоплению у растительных организмов заключается в усилении роста с целью избежать повреждающего воздействия недостатка кислорода. К модельным объектам для изучения данного типа роста относят coleoptили проростков риса, обладающего способностью к прорастанию под водой. Длина coleoptилей служит маркером жизнеспособности при гипоксии.

Цель — сравнительный анализ роста coleoptилей и участия субъединиц В и Е вакуолярной H^+ -АТФазы в его реализации у двух сортов риса отечественной селекции, различающихся по исходной скорости удлинения (быстро растущий Кубань 3 и медленно растущий Аметист).

Материалы и методы. Исследование проведено на этилированных проростках coleoptилей риса двух сортов отечественной селекции Кубань 3 и Аметист. Детекцию субъединиц В и Е V-АТФазы в составе общей микросомальной фракции реализовывали с использованием иммуно-блотт-анализа. Интенсивность транскрипции генов, кодирующих субъединицы В и Е V-АТФазы, определяли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. Динамика роста в условиях аэрации более соответствовала изменениям субъединиц, происходящих на протеомном уровне, тогда как динамика роста при затоплении имела большее сходство с изменением транскрипции генов, кодирующих эти субъединицы. Сортные различия были выявлены только при сравнении интенсивности транскрипции, что в конечном итоге не сказывалось на динамике роста coleoptилей.

Выводы. Показано участие субъединиц В и Е V-АТФазы в обеспечении вакуолизации в процессе роста растяжением coleoptилей риса при различном содержании кислорода.

Ключевые слова: гипоксия; рис *Oryza sativa* L.; вакуолярная H^+ -АТФаза.

Как цитировать

Кирпичникова А.А., Бикташева М.О., Емельянов В.В., Шишова М.Ф. Анализ роли H^+ -АТФазы тонопласта в обеспечении роста растяжением клеток coleoptилей проростков риса, различающихся скоростью роста в условиях нормоксии и затопления // Экологическая генетика. 2025. Т. 23. № 1. С. 5–17. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen641977>

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen641977>
Original Study Article

Analysis of the role of tonoplast H⁺-ATPase in elongation growth of coleoptile cells of rice seedlings with different growth rates under normoxia and submergence

Anastasia A. Kirpichnikova, Maria O. Bikatasheva, Vladislav V. Yemelyanov, Maria F. Shishova

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Rice coleoptiles were used to investigate the importance of V H⁺-ATPase in vacuolization during elongation growth under normoxic and hypoxic conditions.

AIM of the study was to find out a link between growth intensity, protein amount of subunits B and E and transcription of genes encoding those proteins.

MATERIALS AND METHODS: The investigation was carried out on two rice varieties of domestic selection, fast-growing Kuban 3 and slow-growing Amethyst. Seedlings were grown in etiolated conditions at normoxia and submergence. Western-blot analysis was employed to evaluate amount of subunits B and E in microsomal fraction. qRT-PCR was used to distinguish differences in expression of genes encoding subunits B and E of V H⁺-ATPase.

RESULTS: The growth under aerobic conditions was more consistent with the changes in subunits B and E of V H⁺-ATPase which was determined at the proteomic level, while the hypoxic growth had a stronger correspondence with changes in *OsVHAs* gene expression. Varietal differences were revealed only when comparing the transcription intensity, which did not affect the growth dynamics of coleoptiles. Obtained data suggested the existence of differences in the regulation of the enzyme at the transcriptional and proteomic levels during coleoptile elongation.

CONCLUSIONS: The importance of the B and E subunits of V-ATPase involvement in vacuolization during the growth process of rice coleoptiles under different oxygen level was demonstrated.

Keywords: hypoxia; rice *Oryza sativa* L.; vacuolar H⁺-ATPase.

To cite this article

Kirpichnikova AA, Bikatasheva MO, Yemelyanov VV, Shishova MF. Analysis of the role of tonoplast H⁺-ATPase in elongation growth of coleoptile cells of rice seedlings with different growth rates under normoxia and submergence. *Ecological genetics*. 2025;23(1):5–17. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen641977>

АКТУАЛЬНОСТЬ

Способность к интенсивному росту можно рассматривать в качестве альтернативы изменению поведения животных, направленному на избегание повреждающего действия внешних стрессовых факторов. У растительных организмов, ведущих прикрепленный образ жизни, именно под синдромом «избегания» (low-oxygen escape syndrome, LOES) понимают одну из стратегий адаптации к затоплению [1]. Этот тип ответной ростовой реакции можно наблюдать у разных видов гидрофитных растений [2]. К их числу относят и широко востребованную сельскохозяйственную культуру — рис посевной (*Oryza sativa* L.), который обладает способностью прорасти и быстро расти в условиях затопления, преодолевая таким образом недостаток кислорода. При прорастании наблюдается ускорение роста такого ювенильного органа, как coleoptиль [3–5]. Этот видоизмененный лист злаков, замкнутый в трубку, имеет достаточно широкий спектр защитных реакций при подземном прорастании [6]. Наличие более длинной coleoptили снижает или даже предотвращает повреждающее действие таких стрессовых факторов, как недостаток влаги, резкое понижение температур (заморозки), гербициды и даже грызуны [7–9]. У проростков риса эта защитная реакция приобретает совершенно особую форму. Гипотеза, которая была предложена еще в 1970-е годы, предполагает, что coleoptиль за счет интенсификации роста и быстрого достижения поверхности воды выполняет роль дыхательной трубки для плавания — «шноркеля» [10]. Эта гипотеза до сих пор сохранила свою актуальность [6, 11].

Рост coleoptилей осуществляется преимущественно за счет уникального для растительных клеток роста растяжением — многократного полярного (вертикального) удлинения. Этот процесс является кратковременным, и его интенсивность обеспечивается вектором осмотического давления при резком повышении эластичности клеточных стенок. Механизмы реализации и регуляции роста растяжением легли в основу теории кислого роста, до сих пор актуальной, несмотря на то что была сформулирована почти полвека назад [12, 13]. В условиях нормоксии считается доказанным роль ауксина в активации H^+ -АТФазы плазмалеммы, что приводит к закислению клеточных стенок и, тем самым, активирует ряд механизмов, обеспечивающих удлинение клетки.

В то же время рост растяжением сопровождается интенсивной вакуолизацией. Однако представления о механизмах этого процесса еще во многом отрывочны. Не вызывает сомнения резкое усиление транспорта воды и осмотически активных соединений через тонопласт — вакуолярную мембрану. Определяющая роль в генерации мембранного потенциала на тонопласте принадлежит H^+ -АТФазе вакуолярного типа (V-типа; КФ 3.6.1.3), широко распространенной в эукариотических клетках [14, 15]. Этот протон-транспортирующий мультисубъединичный фермент хорошо известен участием в адаптации растений

к различным стрессорным воздействиям и даже получил название «эко-фермент» [16]. Показано, что состав изоформ, входящих в структуру вакуолярной H^+ -АТФазы, имеет тканеспецифичность [16, 17]. Однако участие этой помпы в процессах роста, особенно в условиях недостатка кислорода, еще во многом неизвестны. Изменения могут быть связаны с регуляцией как на транскрипционном, так и на пост-трансляционном уровнях.

Цель исследования — сравнительный анализ интенсивности роста, экспрессии генов, кодирующих субъединицы В и Е, а также их представленность в мембранах клеток coleoptилей проростков риса двух сортов, различающихся по интенсивности роста в условиях нормальной аэрации и при затоплении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследований

Эксперименты проводили на coleoptилях 3-, 5- и 7-суточных проростков риса (*Oryza sativa* L.). Данные временные точки соответствуют началу, интенсификации и завершению роста coleoptилей соответственно. Эти сроки были отобраны на предварительном этапе исследования. В работе использовали семена двух сортов риса отечественной селекции, отобранные ранее: медленно растущий Аметист и быстро растущая Кубань 3 [5]. Семена поверхностно стерилизовали 50% раствором гипохлорита натрия в течение 15 мин, 10 раз промывали стерильной водой и замачивали в горячей воде (55°C) на 1 ч. Далее по 50 семян проращивали в гидропонных условиях на стеклянных мостках (контрольные растения) или создавали условия затопления в банках объемом 750 мл, как описано ранее [5]. Использовали 4% питательный раствор Кнопа [18]. Уровень измеряли с помощью анализатора растворенного кислорода «Эксперт-009» (Эконикс-Эксперт, Россия). Содержание кислорода в гипоксическом растворе не превышало 0,5–0,6 мг/л. Посуду и растворы для работы с растениями предварительно стерилизовали.

Для измерения длины coleoptилей проростки раскладывали в чашки Петри, сканировали с помощью HP ScanJet G2710 и оцифровывали изображения в программе ImageJ (версия 1.8.0_172) [5]. Для анализа использовали все проросшие растения из 50 посеянных.

Получение общей микросомальной фракции клеток coleoptилей риса

Общую микросомальную фракцию получали из клеток coleoptилей проростков сортов Аметист и Кубань 3 при температуре 4°C. Навеску растительного материала (около 1 г) гомогенизировали в среде, состоящей из 330 М сахарозы, 50 мМ Tris-HCl, 5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 5 мМ аскорбиновой кислоты и 5 мМ дитиотреитола (pH 7.8) [19]. Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 100 g на центрифуге (MPW-350R, Польша), после чего последовательно увеличивали скорость

и центрифугировали 5 мин при 3000 g для отделения тяжелых клеточных элементов (ядра, фрагменты клеточных стенок), затем в течение 15 мин при 17 000 g для осаждения митохондрий. Полученный осадок гомогенизировали в среде, содержащей 300 мМ раствор сахарозы на 10 мМ буфере Tris–Mes (pH 7,2). Супернатант центрифугировали при 100 000 g на центрифуге Beckman Avanti J–30I (США) в течение 60 мин. Осадок (общая микросомальная фракция) гомогенизировали в среде, содержащей 300 мМ раствор сахарозы на 10 мМ буфере Tris–Mes (pH 7,2).

Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле

Разделение белков проводили методом денатурирующего электрофореза в 10% полиакриламидном геле [20]. Перед нанесением проб на электрофорезные гели пробы выравнивали по содержанию белка, которое определяли методом Брэдфорда [21]. Белок из общей микросомальной фракции клеточных мембран осаждали 20% трихлоруксусной кислотой и растворяли в загрузочном буфере. На дорожку геля наносили 20 мкг белка. Для контроля разделения белков на геле использовали маркеры молекулярной массы PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Электрофоретическое разделение белков проводили в буфере Tris–глицин (25 мМ Tris, 192 мМ глицин, 0,1% додецилсульфат натрия, pH 8,3) в системе Mini-PROTEAN (Bio-RAD, США) при 4°C.

Оценка содержания субъединиц В и Е Н⁺-АТФазы тонопласта в составе общей микросомальной фракции клеток колеоптилей риса с помощью иммуноблот-анализа

После завершения электрофореза гели промывали трансфер-буфером. Далее проводили блот-перенос на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-RAD, 0,45 мкм) системы Mini-PROTEAN (Bio-RAD) в течении 1 ч при 100 В и 250 мА по протоколу производителя. После переноса мембрану помещали в блокировочный буфер на 1 ч. Далее в течение ночи мембрану инкубировали в блокировочном

буфере, содержащем первичные кроличьи антитела, специфичные для субъединиц В (AS09 503) и Е (AS07 213) Н⁺-АТФазы тонопласта (Agrisera, Швеция). После этого проводили отмычку мембраны 5 раз по 5 мин в 25 мл блокировочного буфера. Вторичные поликлональные козлиные противокроличьи антитела, меченые пероксидазой хрена (AS09 602, Agrisera), растворяли в 25 мл блокирующего буфера с молоком. Мембрану, помещенную в раствор со вторичными антителами, держали при 37°C 1 ч на качалке. После промывки мембраны, пятна субъединиц Н⁺-АТФазы тонопласта на нитроцеллюлозной мембране проявляли с помощью 3,3-диаминбензидина, растворенного в фосфатно-солевом буфере (pH 5,8). После окрашивания мембрану сканировали. С помощью компьютерной программы PhotoM измеряли оптическую плотность и площадь пятен, отражающую интенсивность взаимодействия субъединиц Н⁺-АТФазы тонопласта с антителами. После чего эти параметры перемножали и выравнивали относительно контрольных (нормоксических) значений на 3-и сутки прорастания, принимая их за единицу.

Дизайн праймеров и проведение количественной ПЦР с детекцией в реальном времени

Для подбора праймеров использовали базы данных аннотированного генома риса (The Rice Annotation Project, RAP, <https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) и программное обеспечение VectorNTI Advanced v.11. Праймеры подбирали в соответствии с условиями проведения ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I (Евроген, Россия). Параметры праймеров: температура плавления 58–65°C; длина 20–30 нуклеотидов; образование шпильчатых структур и димеров в паре праймеров с dG >–1 ккал/моль; GC-состав 40–60%. Для всех последовательностей интереса были подобраны специфичные праймеры. Специфичность праймеров проверяли при помощи алгоритма BLASTn NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Последовательности праймеров приведены в таблице 1. Праймеры синтезировали в компании BioBeagle (Россия, <https://biobeagle.com/>).

Таблица 1. Праймеры к генам интереса и сравнения

Table 1. Primers for genes of interest and comparison

Ген	Локус	Праймеры (5'–3')	Длина продукта, п. н.
<i>OsVHA-B1</i>	Os06t0568200	GTGAGGTATCAGCAGCCCGAGAA CCCGTAAGATCAGGAGTTGGATGTG	187
<i>OsVHA-B2</i>	Os01t0711000	CAATCCCAAGTGAACGAACATACCCT TCTGAGCAGCAATTTTCATTGTGTGG	143
<i>OsVHA-E1</i>	Os01t0659200	CCAAGCAGATCCAGCAGATGGTG TTGAACCTCTCTCGGCGGA	91
<i>OsVHA-E2</i>	Os05t0480700	AGCAGATCCAGCAGATGGTCAGG TGATCCTCCGCTTCTCCGACTC	132
<i>OsTUB4</i>	Os01g0805900	GAACCATTTGATTCTGCCACCA CGGTACTGCTGGGAGCCACG	171

Получение кДНК

РНК выделяли из coleoptiles проростков риса (в контрольном варианте удаляли листья, при гипоксии листья внутри coleoptila не растут) на соответствующие сроки прорастания (3, 5 и 7 дней) с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. ДНКазную обработку проводили с помощью ДНКазы (Thermo Fisher Scientific, США, 5 ед./образец) по протоколу производителя. Очищенную РНК растворяли в стерильной воде и хранили при температуре -80°C до анализа.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для синтеза кДНК брали 2 мкг РНК. Полученную кДНК разливали на аликвоты и хранили при температуре -80°C до анализа.

Анализ экспрессии генов, кодирующих субъединицы В и Е H^+ -АТФазы тонопласта

Для проведения количественной ПЦР с детекцией в реальном времени использовали Bio-Rad CFX96 REAL-TIME System (США, в ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ) и набор детекции для ПЦР 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Амплификацию проводили по следующей программе: 95°C — 5 мин; 95°C — 15 с; 60°C — 30 с; 72°C — 30 с; всего было 45 циклов. Регистрацию флуоресценции интеркалирующего красителя SYBR Green проводили в конце каждого цикла. Для получения относительного количества транскриптов из пороговых циклов амплификации (C_t) использовали метод $2^{-\Delta C_t}$, а для получения степени изменения относительного количества транскриптов каждого гена — метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [22]. Данные по количественной оценке анализируемого гена представлены в относительных единицах, рассчитанных при сравнении с уровнем экспрессии гена β -тубулина 4 (*OsTub4*). Изменение уровня экспрессии генов интереса рассчитывали относительно

контрольных (нормоксических) значений на 3-и сутки прорастания, принимая их за единицу.

Статистическая обработка

Все эксперименты проводили в 4–8-кратной биологической и 3-кратной аналитической повторности за исключением иммуноблота, который повторяли в 3-кратной биологической повторности. Статистическую обработку данных проводили с помощью GraphPad Prism 8.0.1 для Windows. На рис. 1–3 приведены средние значения величин и их стандартные ошибки. Значения с разными буквами достоверно различаются при $p < 0,05$ (взвешенное среднее Тьюки).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Coleoptiles проростков риса сорта Кубань 3 в условиях нормоксии отличались интенсивным началом роста (на 3-и сутки достигали 10 мм), двукратным увеличением длины к 5-м суткам и дальнейшим прекращением удлинения на 7-е сутки (рис. 1). Coleoptiles риса второго исследуемого сорта — Амелист — характеризовались гораздо меньшим удлинением, которое составило в среднем около 50% от такового у сорта Кубань 3 как на 3-и, так и на 5-е сутки. Позднее рост не компенсировался большей продолжительностью, а также заканчивался к 7-м суткам. Тем самым у обоих сортов характер роста был идентичен, но амплитуда такового у Амелиста была практически в 2 раза меньшей. Прорастание в условиях затопления приводило к изменению динамики роста. Следует отметить значительное ингибирование ростовых процессов на самом начальном этапе прорастания (к 3-м суткам) coleoptiles сорта Кубань 3. Еще более интересен факт последующей интенсификации удлинения, в результате которой на 5-е сутки прорастания в гипоксии длина сравнялась с детектированной в контроле. Отметим также продолжение, хоть и незначительное, роста на 7-е сутки

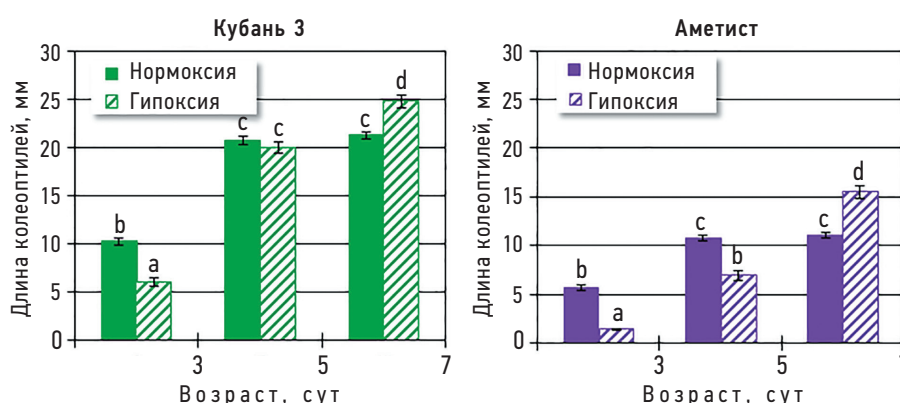


Рис 1. Рост coleoptiles проростков риса двух сортов (быстро растущий сорт Кубань 3; медленно растущий сорт Амелист) в условиях нормоксии и гипоксии. Значения с разными буквами (a–d) достоверно различаются (взвешенное среднее Тьюки, $p < 0,05$).

Fig 1. The growth of rice seedlings coleoptiles of two varieties (fast-growing variety Kuban 3; slow-growing variety Amethyst) under normoxia and hypoxia. Values with different letters (a–d) are significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$).

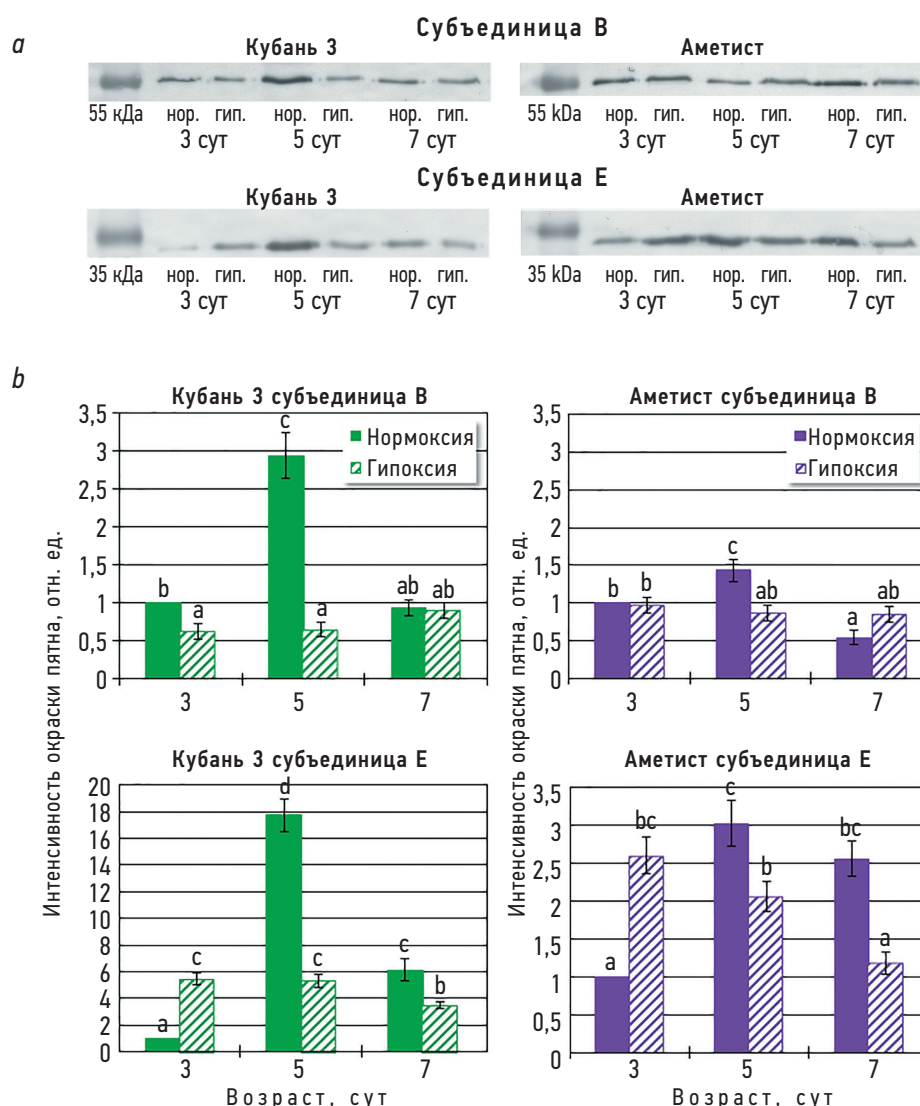


Рис 2. Изменение содержания белков субъединиц В и Е H^+ -АТФазы в составе микросомальной фракции клеток coleoptiles проростков риса двух сортов (быстро растущий сорт Кубань 3; медленно растущий сорт Аметист) в условиях нормоксии и гипоксии: *a* — вестерн-блот гибридизация проб белка микросомальной фракции с антителами против субъединиц В и Е. 35 и 55 кДа — маркеры молекулярного веса; нор. — нормоксия, гип. — гипоксия. Отсканированные изображения характерных блотов; *b* — относительное изменение содержания белков. Значения с разными буквами (а–d) достоверно различаются (взвешенное среднее Тьюки, $p < 0,05$).

Fig 2. Alteration in the content of proteins of B and E subunits of H^+ -ATPase tonoplast in the microsomal fraction of coleoptile cells of rice seedlings of two varieties (fast-growing variety Kuban 3; slow-growing variety Amethyst) under normoxia and hypoxia: *a*, western blot hybridization of microsomal fraction protein samples with antibodies against B and E subunits. 35 and 55 kDa, molecular weight markers; nor., normoxia, hyp., hypoxia; Scanned images of typical blots; *b*, relative change in protein content. Values with different letters (a–d) are significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$).

при недостатке кислорода. Для coleoptiles проростков сорта Аметист также отмечено более чем двукратное торможение роста по сравнению с нормоксией. В дальнейший период с 3-х до 5-х суток рост усиливался и продолжался до 7-х суток. Тем не менее финальная длина coleoptiles Аметиста в конечной временной точке эксперимента была почти на 40% меньше.

Для последующего анализа представленности двух субъединиц вакуолярной H^+ -АТФазы из клеток coleoptiles проростков риса получали общую микросомальную фракцию мембран, в которую входит тонопласт. Для данной серии экспериментов за единицу принимали

количество белка изоформ интереса, анализируемых по интенсивности взаимодействия со специфичными антителами, на 3-и сутки развития в условиях нормоксии. Выявленные закономерности представлены на рис. 2. В coleoptiles обоих сортов риса была детектирована субъединица В H^+ -АТФазы с молекулярной массой 55 кДа и субъединица Е с молекулярной массой около 31 кДа (рис. 2, *a*). В условиях нормальной аэрации содержание субъединицы В резко возрастало (более чем в 2,5 раза) к 5-м суткам выращивания проростков сорта Кубань 3 (рис. 2, *b*). В ходе последующего развития (на 7-е сутки) оно возвращалось к исходному значению.

Для coleoptiles проростков сорта Аметист детектирована близкая динамика содержания субъединицы В, но ее амплитуда была значительно слабее, а к 7-м суткам — ниже исходной точки (меньше единицы). Совершенно иными были изменения при проращивании проростков в условиях затопления. В мембранах клеток coleoptiles риса сорта Кубань 3 на 3-и сутки содержание субъединицы В было существенно меньше контрольного варианта.

Далее была отмечена слабая тенденция к повышению, но значение так и не достигало единицы. Низкий уровень белка субъединицы В в составе эндомембран был детектирован и для coleoptiles сорта Аметист, причем на всех протестированных сроках они были близки к единице.

В целом сходная тенденция была выявлена и для субъединицы Е (рис. 2). В условиях достаточного снабжения кислородом в мембранах coleoptiles риса сорта

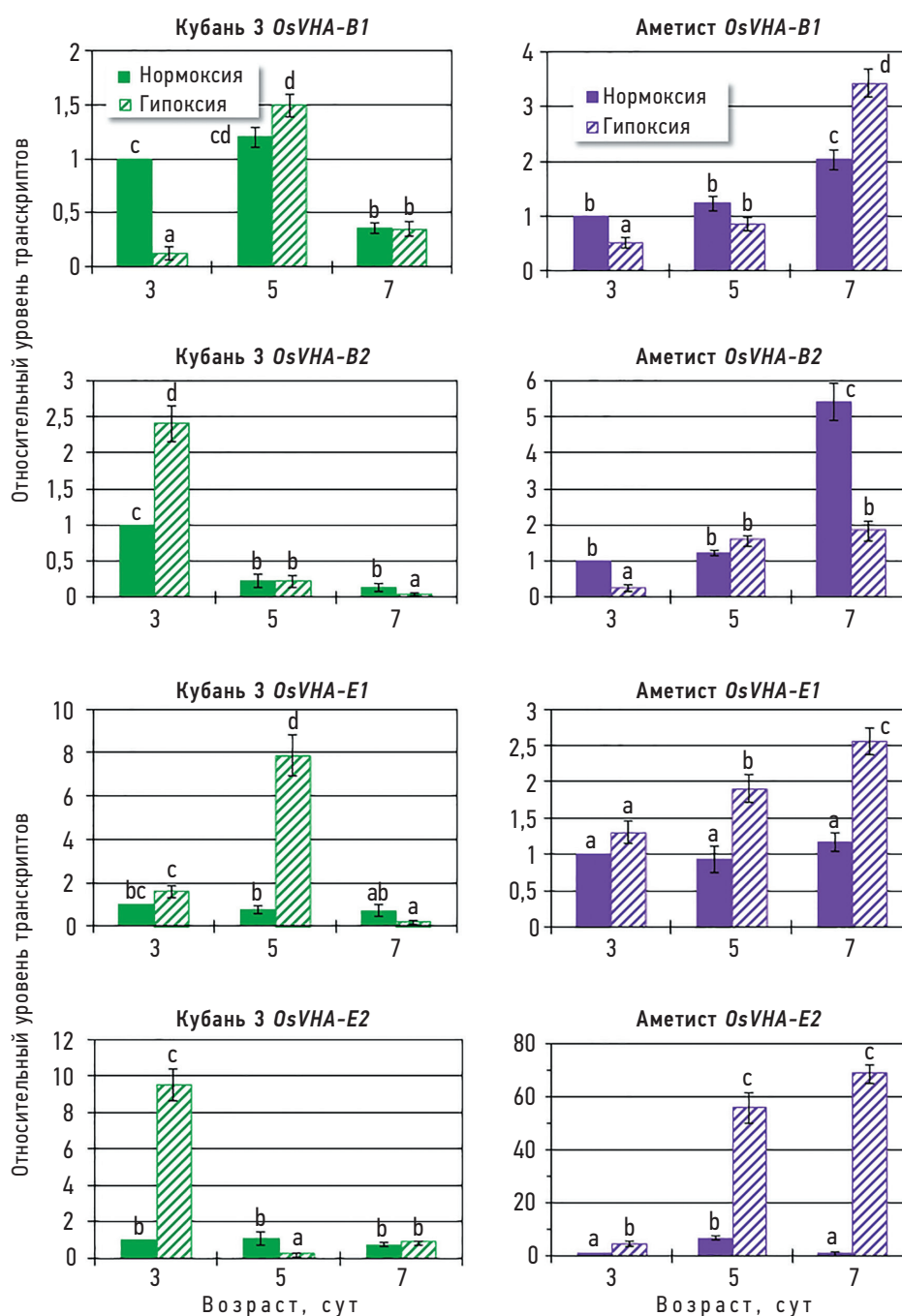


Рис 3. Изменение относительного уровня накопления транскриптов генов *OsVHA-B1*, *OsVHA-B2* и *OsVHA-E1*, *OsVHA-E2* в coleoptiles проростков риса двух сортов (быстро растущий сорт Кубань 3; медленно растущий сорт Аметист) в условиях нормоксии и гипоксии. Значения с разными буквами (a–d) достоверно различаются (взвешенное среднее Тьюки, $p < 0.05$).

Fig 3. Changes in the relative level of accumulation of *OsVHA-B1*, *OsVHA-B2*, *OsVHA-E1*, and *OsVHA-E2* gene transcripts in coleoptiles of rice seedlings of two varieties (fast-growing variety Kuban 3; slow-growing variety Amethyst) under normoxia and hypoxia conditions. Values with different letters (a–d) are significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$).

Кубань 3 максимальное содержание белков интереса было выявлено на 5-е сутки развития, которое потом снижалось, но все равно шестикратно превышало такое на 3-и сутки. Для сорта Аметист также была отмечена сходная нелинейная динамика содержания, но гораздо менее выраженная. Однако при затоплении изменение содержания субъединицы Е было отличным от такового под действием нормоксии, а также от данных, полученных для субъединицы В. Отметим, что на 3-и сутки развития недостаток кислорода повышал содержание изоформы Е в мембранах клеток колеоптилей проростков сорта Кубань 3. При этом на 5-и сутки содержание не изменялось и даже немного снижалось на заключительном временном интервале. Близкая тенденция была показана и для клеток колеоптилей проростков сорта Аметист. Таким образом, полученные данные об изменении изоферментного состава вакуолярной H^+ -АТФазы соответствовали динамике роста колептилей в условиях нормоксии, однако значительно отличались от выявленной в условиях затопления.

В завершении проведенного нами исследования была проанализирована экспрессия генов, кодирующих субъединицы В и Е в аналогичных условиях прорастания: нормоксии и гипоксии (рис. 3). Можно видеть, что накопление транскриптов гена *OsVHA-B1* у сорта Кубань 3 имело нелинейную динамику с достижением максимума на 5-е сутки, причем при затоплении увеличение было наиболее значимым при переходе от 3-х к 5-м суткам развития. В клетках колеоптилей сорта Аметист характер изменений был совершенно иным: транскрипты накапливались постепенно и их уровень достигал максимума на 7-е сутки независимо от снабжения кислородом. Однако величина этих изменений также была выше при затоплении. Значительные отличия были выявлены при анализе транскрипции гена *OsVHA-B2*. Накопление транскриптов снижалось с возрастом проростков сорта Кубань 3, причем оно было более выраженным в условиях недостатка кислорода. А у проростков сорта Аметист динамика была прямо противоположной и достигала максимума на 7-е сутки и в условиях нормоксии.

Обратимся теперь к гену *OsVHA-E1*. Отметим, что существенных изменений при нормальной аэрации не наблюдалось у обоих протестированных сортов. Однако в условиях гипоксии в клетках колеоптилей наибольшее накопление транскриптов фиксировали на 5-е сутки у проростков сорта Кубань 3 и на 7-е сутки у проростков сорта Аметист. Особенно следует отметить динамику экспрессии гена *OsVHA-E2*. Отсутствие изменения транскриптов в ходе развития проростков сорта Кубань 3 в контроле менялось кардинальным образом при затоплении: максимум отмечен на 3-и сутки, причем он почти в 9 раз превосходил таковой при нормоксии. У проростков сорта Аметист было зарегистрировано небольшое нелинейное изменение (максимум на 5-е сутки) накопления транскриптов в нормальных условиях, а в случае затопления

содержание таковых постепенно увеличивалось с длительностью эксперимента и достигало 70-кратного повышения у 7-суточных проростков. Полученные данные указывают на то, что выявленные изменения экспрессии генов, кодирующих изоформы субъединиц В и Е вакуолярной H^+ -АТФазы имели динамику отличную от результатов, полученных в ходе бот-анализа.

ОБСУЖДЕНИЕ

Вакуолярная H^+ -АТФаза представляет собой наиболее распространенный протон-транспортирующий фермент внутриклеточных мембран растительной клетки [23, 24]. Ее идентифицировали на мембранах эндоплазматического ретикула, аппарата Гольджи, эндовезикулярной сети, но основная доля локализации H^+ -АТФазы — тонопласт. Перечисленные компартменты отличаются более кислым рН, что делает незаменимой роль данного протонного насоса в обеспечении их функциональной активности. К числу важнейших процессов растительной клетки, в реализации которых принимает участие $V-H^+$ -АТФаза тонопласта, можно отнести генерацию электрохимического потенциала ионов водорода на вакуолярной мембране и поддержание цитоплазматического рН-гомеостаза [17, 24].

Хорошо известно, что действие эндогенных и экзогенных факторов на растительные организмы начинается с понижения рН. Данная реакция столь часто детектируется у разных видов растений, в разных тканях и специализированных клетках, что позволяет рассматривать изменение цитоплазматического уровня H^+ и в качестве сигнала, и в качестве вторичного посредника в трансдукции разнообразных сигнальных каскадов [25]. Этот феномен неоднократно был продемонстрирован и в условиях недостатка кислорода [26, 27]. Закисление цитозоля при гипо- и аноксии происходит по нескольким причинам. Основная причина — низкая концентрация АТФ, снижающая активность протонных насосов плазматической мембраны и тонопласта [27]. Уровень АТФ в клетке истощается в течение 1–2 мин после переключения на анаэробный метаболизм [28]. Другим важным источником H^+ является гидролиз АТФ и других нуклеозидтрифосфатов (НТФ) [27, 28], поскольку фосфат, пирогосфат и нуклеозидмонофосфат обладают большей ацидофицирующей активностью, чем НТФ. Возможные источники протонов — утечка из вакуоли, а также накопление интермедиатов и продуктов анаэробного метаболизма, преимущественно лактата [27, 29]. В тканях устойчивых растений ацидоз развивается медленнее и менее интенсивен [30, 31], что может быть связано с большей стимуляцией спиртового брожения вместо молочного [29] и с наличием альтернативных метаболических путей, обеспечивающих реокисление НАД(Ф)Н без аккумуляции токсичных анаэробных метаболитов [1, 29]. В результате гликолиз, переходящий в анаэробные пути, обеспечивает производство АТФ,

которая используется для поддержания активности протонных насосов плазматической мембраны и тонопласта. Биохимический рН-стат, состоящий из челнока карбоксилирующих/декарбоксилирующих ферментов, также участвует в регуляции рН [30]. Закисление цитоплазмы при действии аноксии было свойственно и клеткам колеоптилей риса [32]. Этот ювенильный орган, у способного к прорастанию при затоплении риса, резко увеличивается в длину, чтобы обеспечить «доставку» кислорода к затопленным тканям проростка. Тем самым поддерживается жизнеспособность растения риса, которое при восстановлении нормальной аэрации продолжает свое развитие [33]. При затоплении рост колеоптиля сквозь толщу воды более продолжителен, чем на воздухе, а следовательно, происходит его большее удлинение [34], что согласуется с нашими данными (рис. 1). Показано, что величина колеоптиля может указывать на большую жизнеспособность растений риса и обеспечивается на генетическом уровне [5, 35].

В нашем исследовании был выполнен сравнительный анализ двух сортов риса Кубань 3 (быстро растущий) и Аметист (медленно растущий) отечественной селекции, различающихся исходной интенсивностью роста колеоптилей при нормоксии. Максимальная длина у обоих сортов зафиксирована на 5-е сутки и далее рост останавливался (рис. 1). Полученные в дальнейшем результаты указывают на то, что даже при индуцированном гипоксией изменении динамики роста (продолжении роста до 7 сут), исходные различия по интенсивности удлинения между сортами сохранялись. Возникает вопрос, будут ли сохранены и все механизмы, обеспечивающие рост в столь кардинально различающихся по содержанию кислорода условиях. Рост растяжением сопровождается интенсивной вакуолизацией. Следовательно, можно ожидать, что и роль маркерного для вакуолярной системы протон-транспортирующего фермента может динамично меняться.

По своей субъединичной организации и по принципу ротационного катализа V H^+ -АТФаза тонопласта эволюционно родственна АТФ-синтазам F типа [36]. В ее состав входят 13 субъединиц, организованных в два домена: V_0 и V_1 [24, 37]. В настоящее время накоплены сведения о функциональном значении различных субъединиц и о возможных механизмах их регуляции [16, 24]. Однако практически ничего неизвестно о возможном участии субъединиц V - H^+ -АТФазы в обеспечении роста растяжением ни в условиях нормоксии, ни при затоплении.

Тем не менее для изоформ субъединицы VHA -Е, играющей важнейшую роль в ассоциации доменов V_1 и V_0 вакуолярной АТФазы, описано тканеспецифичное накопление на этапе эмбриогенеза арабидопсиса [38]. Было высказано предположение, что основная изоформа VHA -Е 1 относится к группе белков домашнего хозяйства и, по-видимому, участвует в обеспечении роста. Напротив, изоформа VHA -Е2 была идентифицирована исключительно в пыльце и возможно участвует в регуляции роста пыльцевой трубки [16, 39]. Ряд отрывочных данных

позволяет заключить, что субъединица VHA -В, известная как нуклеотид-связывающая, но утратившая каталитическую функцию, имеет достаточно выраженное регуляторное значение благодаря способности связываться с цитоскелетом и ферментом гликолиза альдолазой [40, 41]. В то же время показано, что экспрессия генов, кодирующих эту субъединицу пшеницы, в арабидопсисе приводило к удлинению корней на фоне солевого стресса [42]. На основании приведенных выше данных именно эти субъединицы были выбраны для дальнейшего анализа.

Применение специфичных антител позволило оценить динамику содержания обеих субъединиц в микросомальной фракции, полученной из клеток колеоптилей риса (рис. 2). Можно видеть, что в ходе аэробного развития пул субъединицы В менялся нелинейно и имел максимум на 5-е сутки развития, когда удлинение было максимальным. Изменения для сорта Кубань 3 были значительно более выражены по сравнению с сортом Аметист. Интересно отметить, что и для субъединицы Е была выявлена та же закономерность. Особенно сильно (почти в 18 раз) усиливалось ее накопление у сорта Кубань 3 на 5-е сутки развития.

Недостаток кислорода при затоплении кардинальным образом менял выявленную динамику. В целом можно заключить, что содержание субъединицы В практически оставалось неизменным, независимо от сорта риса. Рассматривая субъединицу Е, следует отметить небольшое увеличение ее представленности по сравнению с таковым на начальном этапе развития (3-е сутки). В дальнейшем изменений не отмечено ни у колеоптилей быстро растущего сорта Кубань 3, ни у медленно растущего сорта Аметист. Из полученных данных можно заключить, что вовлечение вакуолярной H^+ -АТФазы в обеспечение роста клеток колеоптилей при разном уровне снабжения кислородом различалось. Энергетическое голодание приводило к отсутствию ожидаемого накопления субъединиц В и Е не только на 5-е, но и на 7-е сутки развития при затоплении, когда рост еще активно продолжался.

Тем самым особое значение приобретает анализ изменения экспрессии генов, кодирующих эти субъединицы. Следует отметить, что VHA -В и VHA -Е кодируются малым семейством из 2 генов (*OsVHA-B2*, *OsVHA-B2* и *OsVHA-E1*, *OsVHA-E2*). Показано, что динамика накопления продуктов транскрипции этих генов сильно отличалась от динамики содержания кодируемых белков (рис. 3). В условиях нормоксии в абсолютном большинстве случаев уровень экспрессии практически не менялся независимо от сорта и периода развития колеоптиля. Исключение составляет изменение экспрессии *OsVHA-E2* с максимумом на 5-е сутки развития и *OsVHA-B2* с максимумом на 7-е сутки. Причем оба исключения относятся к проросткам риса сорта Аметист. Однако при подводном прорастании для большинства генов было продемонстрировано усиление экспрессии на 5-е и/или 7-е сутки, что может указывать на их участие в регуляции стресс-индуцированного роста. В этом

варианте исключение составили гены *OsVHA-B2* и *OsVHA-E2*, но для проростков риса сорта Кубань 3. Выявленные различия можно объяснить несколькими причинами. Так, например, для изоформ VHA-E уже было показано несоответствие между накоплением РНК-продукта и концентрацией кодируемого белка [43]. Отмечалась также возможность нескоординированной регуляции субъединиц А и В V-АТФазы на транскрипционном уровне при затоплении [44]. Важное значение может иметь и временной фактор. Для генов субъединицы Е, транскрипция которых была детектирована только спустя 72 ч после начала затопления [45]. Тем не менее представленные результаты указывают на различия в регуляции экспрессии генов, кодирующих субъединицы В и Е в ходе развития двух сортов риса, различающихся по нативной способности к росту, в условиях нормоксии и гипоксии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, следует отметить, что на колеоптилях риса получены результаты, указывающие на различия, возникающие на экспрессионном и протеомном уровне для двух субъединиц (В и Е) вакуолярной H^+ -АТФазы в ходе роста растяжением клеток колеоптилей риса в норме и при затоплении. Тем не менее полного соответствия в характере изменения роста, представленности указанных субъединиц в составе эндомембран и интенсивность экспрессии кодирующих их генов не выявлено. Данный феномен может быть обусловлен различиями в регуляции на транскрипционном и пост-трансляционном уровнях.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности продолжения исследования функциональной значимости различных субъединиц H^+ -АТФазы вакуоли в реализации роста растяжением, а также по выявлению механизмов временной координации регуляции работы протон-транспортирующего фермента на транскрипционном и протеомном уровнях.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Благодарности. Авторы выражают благодарность А.Д. Бертовой и А.В. Кондратьевой за помощь в проведении предварительных экспериментов. Исследования выполнены с использованием оборудования Ресурсного центра Санкт-Петербургского государственного университета «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Voesenek L.A.C.J., Bailey-Serres J. Flood adaptive traits and processes: An overview // *New Phytol.* 2015. Vol. 206, N 1. P. 57–73. doi: 10.1111/nph.13209
2. Bailey-Serres J., Lee S.C., Brinton E. Waterproofing crops: Effective flooding survival strategies // *Plant Physiol.* 2012. Vol. 160, N 4. P. 1698–1709. doi: 10.1104/pp.112.208173

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Личный вклад каждого автора: А.А. Кирпичникова — выращивание растительного материала, получение микросомальной фракции, блот-анализ, анализ полученных данных, написание текста; М.О. Бикташева — выращивание растительного материала, сбор и обработка материалов, анализ экспрессии генов; В.В. Емельянов — блот-анализ, анализ полученных данных, обзор литературы, написание текста статьи, внесение окончательной правки; М.Ф. Шишова — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, обзор литературы, подготовка текста статьи, привлечение финансирования.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00096, <https://rscf.ru/project/22-14-00096/>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ADDITIONAL INFO

Acknowledgments. The authors thanks A.D. Bertova and A.V. Kondratieva for assistance in carrying out preliminary experiments. The research was performed using equipment of the Research Park “Center for Molecular and Cell Technologies” at Saint Petersburg State University.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study. Personal contribution of each author: A.A. Kirpichnikova, growing the plant material, isolation of the microsomal fraction, Western blot analysis, analysis of the obtained data, writing the text; M.O. Biktasheva, growing the plant material, collecting and processing materials, gene expression analysis; V.V. Yemelyanov, Western blot analysis, analysis of the obtained data, writing the main part of the text, literature review; M.F. Shishova, concept and design of the study, analysis of the obtained data, writing the main part of the text, literature review, making final edits, funding acquisition.

Funding source. This research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 22-14-00096, <https://rscf.ru/en/project/22-14-00096/>.

Competing interests. The authors declare no conflict of interests.

3. Ismail A.M., Ella E.S., Vergara G.V., Mackill D.J. Mechanisms associated with tolerance to submergence during germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*) // *Ann Bot.* 2009. Vol. 103, N 2. P. 197–209. doi: 10.1093/aob/mcn211
4. Su X., Wu H., Xiang J., et al. Evaluation of submergence tolerance of different rice genotypes at seedling emergence stage

- under water direct seeding // OALibJ. 2022. Vol. 9, N 5. ID e8706. doi: 10.4236/oalib.1108706
5. Богданова Е.М., Бертова А.Д., Кирпичникова А.А., и др. Показатели роста и устойчивости к дефициту кислорода у coleoptiles *Oryza sativa* L. из коллекции Федерального научного центра риса // Сельскохозяйственная биология. 2023. Т. 58, № 3. С. 538–553. doi: 10.15389/agrobiol.2023.3.538rus EDN: XOZZKM
6. Кирпичникова А.А., Кудоярова Г.Р., Емельянов В.В., Шишова М.Ф. Особенности роста растяжением клеток coleoptiles злаков в норме и при затоплении // Экологическая генетика. 2023. Т. 21, № 4. С. 401–417. doi: 10.17816/ecogen623901 EDN: QWDPWQ
7. O'Sullivan P.A., Weiss G.M., Friesen D. Tolerance of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to trifluralin deep-incorporated in the autumn or spring // Weed Res. 1985. Vol. 25, N 4. P. 275–280. doi: 10.1111/j.1365-3180.1985.tb00645.x
8. Brown P.R., Singleton G.R., Tann C.R., Mock I. Increasing sowing depth to reduce mouse damage to winter crops // Crop Prot. 2003. Vol. 22, N 4. P. 653–660. doi: 10.1016/S0261-2194(03)00006-1
9. Rebetzke G.J., Zheng B., Chapman S.C. Do wheat breeders have suitable genetic variation to overcome short coleoptiles and poor establishment in the warmer soils of future climates? // Funct Plant Biol. 2016. Vol. 43, N 10. P. 961–972. doi: 10.1071/FP15362
10. Kordan H.A. Patterns of shoot and root growth in rice seedlings germinating under water // J Appl Ecol. 1974. Vol. 11, N 2. P. 685–690. doi: 10.2307/2402218
11. Shiono K., Koshida A., Iwasaki K., et al. Imaging the snorkel effect during submerged germination in rice: Oxygen supply via the coleoptile triggers seminal root emergence underwater // Front Plant Sci. 2022. Vol. 13. ID 946776. doi: 10.3389/fpls.2022.946776
12. Arsuffi G., Braybrook S.A. Acid growth: an ongoing trip // J Exp Bot. 2018. Vol. 69, N 2. P. 137–146. doi: 10.1093/jxb/erx390
13. Kirpichnikova A., Chen T., Teplyakova S., Shishova M. Proton pump and plant cell elongation // Biol Commun. 2018. Vol. 63, N 1. P. 32–42. doi: 10.21638/spbu03.2018.105
14. Merzendorfer H., Graf R., Huss M., et al. Regulation of proton translocating V-ATPases // J Exp Biol. 1997. Vol. 200, N 2. P. 225–235. doi: 10.1242/jeb.200.2.225
15. Dettmer J., Hong-Hermesdorf A., Stierhof Y.-D., Schumacher K. Vacuolar H⁺-ATPase activity is regulated for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2006. Vol. 18, N 3. P. 715–730. doi: 10.1105/tpc.105.037978
16. Seidel T. The plant V-ATPase // Front Plant Sci. 2022. Vol. 13. ID 931777. doi: 10.3389/fpls.2022.931777
17. Кирпичникова А.А., Чэнь Т., Романюк Д.А., и др. Особенности регуляции вакуолярной H⁺-АТФазы растительных клеток // Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер. 3. Биология. 2016. № 2. С. 149–160. doi: 10.21638/11701/spbu03.2016.212 EDN: WIQTGD
18. Yemelyanov V.V., Lastochkin V.V., Chirkova T.V., et al. Indoleacetic acid levels in wheat and rice seedlings under oxygen deficiency and subsequent reoxygenation // Biomolecules. 2020. Vol. 10, N 2. ID 276. doi: 10.3390/biom10020276
19. Шишова М.Ф., Танкелюн О.В., Рудашевская Е.Л., и др. Изменение транспортной активности протонных насосов клеток coleoptiles на ранних этапах развития проростков кукурузы // Онтогенез. 2012. Т. 43, № 6. С. 413–424. EDN: PDDSEV
20. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227, N 5259. P. 680–683. doi: 10.1038/227680a0
21. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal Biochem. 1976. Vol. 72, N 1–2. P. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
22. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{−ΔΔCT} method // Methods. 2001. Vol. 25, N 4. P. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
23. Schumacher K., Krebs M. The V-ATPase: Small cargo, large effects // Curr Opin Plant Biol. 2010. Vol. 13, N 6. P. 724–730. doi: 10.1016/j.pbi.2010.07.003
24. Wang C., Xiang Y., Qian D. Current progress in plant V-ATPase: From biochemical properties to physiological functions // J Plant Physiol. 2021. Vol. 266. ID 153525. doi: 10.1016/j.jplph.2021.153525
25. Raghavendra A.S., Ye W., Kinoshita T. Editorial: pH as a signal and secondary messenger in plant cells // Front Plant Science. 2023. Vol. 14. ID 1148689. doi: 10.3389/fpls.2023.1148689
26. Felle H.H. pH: Signal and messenger in plant cells // Plant Biol. 2001. Vol. 3, N 6. P. 577–591. doi: 10.1055/s-2001-19372
27. Felle H.H. pH regulation in anoxic plants // Ann Bot. 2005. Vol. 96, N 4. P. 519–532. doi: 10.1093/aob/mci207
28. Drew M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia // Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1997. Vol. 48. P. 223–250. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.223
29. Chirkova T., Yemelyanov V. The study of plant adaptation to oxygen deficiency in Saint Petersburg University // Biol Commun. 2018. Vol. 63, N 1. P. 17–31. doi: 10.21638/spbu03.2018.104
30. Kulichikhin K.Y., Aitio O., Chirkova T.V., Fagerstedt K.V. Effect of oxygen concentration on intracellular pH, glucose-6-phosphate and NTP content in rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum aestivum*) root tips: *In vivo* ³¹P-NMR study // Physiol Plant. 2007. Vol. 129, N 3. P. 507–518. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00819.x
31. Yemelyanov V.V., Chirkova T.V., Lindberg S.M., Shishova M.F. Potassium efflux and cytosol acidification as primary anoxia-induced events in wheat and rice seedlings // Plants. 2020. Vol. 9, N 9. ID 1216. doi: 10.3390/plants9091216
32. Greenway H., Kulichikhin K.Y., Cawthray G.R., Colmer T.D. pH regulation in anoxic rice coleoptiles at pH 3.5: Biochemical pH-stats and net H⁺ influx in the absence and presence of NOFormula // J Exp Bot. 2012. Vol. 63, N 5. P. 1969–1983. doi: 10.1093/jxb/err395
33. Narsai R., Secco D., Schultz M.D., et al. Dynamic and rapid changes in the transcriptome and epigenome during germination and in developing rice (*Oryza sativa*) coleoptiles under anoxia and re-oxygenation // Plant J. 2017. Vol. 89, N 4. P. 805–824. doi: 10.1111/tpj.13418
34. Nghi K.N., Tondelli A., Valè G., et al. Dissection of coleoptile elongation in japonica rice under submergence through integrated genome-wide association mapping and transcriptional analyses // Plant Cell Environ. 2019. Vol. 42, N 6. P. 1832–1846. doi: 10.1111/pce.13540
35. Pucciariello C. Molecular mechanisms supporting rice germination and coleoptile elongation under low oxygen // Plants. 2020. Vol. 9, N 8. ID 1037. doi: 10.3390/plants9081037
36. Gruber G., Wiczorek H., Harvey W.R., Muller V. Structure-function relationship of A-, F- and V-ATPases // J Exp Biol. 2001. Vol. 204, N 15. P. 2597–2605. doi: 10.1242/jeb.204.15.2597
37. Sze H., Schumacher K., Muller M.L., et al. A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase // Trends Plant Sci. 2002. Vol. 7, N 4. P. 157–161. doi: 10.1016/s1360-1385(02)02240-9

38. Dettmer J., Schubert D., Calvo-Weimar O., et al. Essential role of the V-ATPase in male gametophyte development // *Plant J.* 2005. Vol. 41, N 1. P. 117–124. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2004.02282.x
39. Dettmer J., Liu T.-Y., Schumacher K. Functional analysis of *Arabidopsis* V-ATPase subunit VHA-E isoforms // *Eur J Cell Biol.* 2010. Vol. 89, N 2–3. P. 152–156. doi: 10.1016/j.ejcb.2009.11.008
40. Chen S.-H., Bubb M.R., Yarmola E.G., et al. Vacuolar H⁺-ATPase binding to microfilaments: regulation in response to phosphatidylinositol 3-kinase activity and detailed characterization of the actin-binding site in subunit B // *J Biol Chem.* 2004. Vol. 279, N 9. P. 7988–7998. doi: 10.1074/jbc.M305351200
41. Lu M., Ammar D., Ives H., et al. Physical interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump // *J Biol Chem.* 2007. Vol. 282, N 34. P. 24495–24503. doi: 10.1074/jbc.M702598200

REFERENCES

1. Voesenek LACJ, Bailey-Serres J. Flood adaptive traits and processes: An overview. *New Phytol.* 2015;206(1):57–73. doi: 10.1111/nph.13209
2. Bailey-Serres J, Lee SC, Brinton E. Waterproofing crops: Effective flooding survival strategies. *Plant Physiol.* 2012;160(4):1698–1709. doi: 10.1104/pp.112.208173
3. Ismail AM, Ella ES, Vergara GV, Mackill DJ. Mechanisms associated with tolerance to submergence during germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*). *Ann Bot.* 2009;103(2):197–209. doi: 10.1093/aob/mcn211
4. Su X, Wu H, Xiang J, et al. Evaluation of submergence tolerance of different rice genotypes at seedling emergence stage under water direct seeding. *OALibJ.* 2022;9(5):e8706. doi: 10.4236/oalib.1108706
5. Bogdanova EM, Bertova AD, Kirpichnikova AA, et al. Growth and viability of coleoptiles under oxygen deficiency in *Oryza sativa* L. From the collection of the federal rice research center. *Agricultural Biology.* 2023;58(3):538–553. doi: 10.15389/agrobiology.2023.3.538rus EDN: XOZZKM
6. Kirpichnikova AA, Kudoyarova GR, Yemelyanov VV, Shishova MF. The peculiarities of cell elongation growth of cereal coleoptiles under normal and flooding conditions. *Ecological genetics.* 2023;21(4):401–417. doi: 10.17816/ecogen623901 EDN: QWDPWQ
7. O'Sullivan PA, Weiss GM, Friesen D. Tolerance of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to trifluralin deep-incorporated in the autumn or spring. *Weed Res.* 1985;25(4):275–280. doi: 10.1111/j.1365-3180.1985.tb00645.x
8. Brown PR, Singleton GR, Tann CR, Mock I. Increasing sowing depth to reduce mouse damage to winter crops. *Crop Prot.* 2003;22(4):653–660. doi: 10.1016/S0261-2194(03)00006-1
9. Rebetzke GJ, Zheng B, Chapman SC. Do wheat breeders have suitable genetic variation to overcome short coleoptiles and poor establishment in the warmer soils of future climates? *Funct Plant Biol.* 2016;43(10):961–972. doi: 10.1071/FP15362
10. Kordan HA. Patterns of shoot and root growth in rice seedlings germinating under water. *J Appl Ecol.* 1974;11(2):685–690. doi: 10.2307/2402218
11. Shiono K, Koshida A, Iwasaki K, et al. Imaging the snorkel effect during submerged germination in rice: Oxygen supply via the coleoptile triggers seminal root emergence underwater. *Front Plant Sci.* 2022;13:946776. doi: 10.3389/fpls.2022.946776
12. Arsuffi G, Braybrook SA. Acid growth: an ongoing trip. *J Exp Bot.* 2018;69(2):137–146. doi: 10.1093/jxb/erx390
13. Kirpichnikova A, Chen T, Teplyakova S, Shishova M. Proton pump and plant cell elongation. *Biol Commun.* 2018;63(1):32–42. doi: 10.21638/spbu03.2018.105
14. Merzendorfer H, Graf R, Huss M, et al. Regulation of proton translocating V-ATPases. *J Exp Biol.* 1997;200(2):225–235. doi: 10.1242/jeb.200.2.225
15. Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof Y-D, Schumacher K. Vacuolar H⁺-ATPase activity is regulated for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2006;18(3):715–730. doi: 10.1105/tpc.105.037978
16. Seidel T. The plant V-ATPase. *Front Plant Sci.* 2022;13:931777. doi: 10.3389/fpls.2022.931777
17. Kirpichnikova AA, Chen T, Romanyuk DA, et al. Peculiar features of plant cell vacuolar H⁺-ATPase regulation. *Biological Communications.* 2016;(2):149–160. doi: 10.21638/11701/spbu03.2016.212 EDN: WIQTGD
18. Yemelyanov VV, Lastochkin VV, Chirkova TV, et al. Indoleacetic acid levels in wheat and rice seedlings under oxygen deficiency and subsequent reoxygenation. *Biomolecules.* 2020;10(2):276. doi: 10.3390/biom10020276
19. Shishova MF, Tankelyun OV, Rudashevskaya EL, et al. Alteration of transport activity of proton pumps in coleoptile cells during early development stages of maize seedlings. *Russian Journal of Developmental Biology.* 2012;43(6):413–424. EDN: PDDSEV
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–683. doi: 10.1038/227680a0
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1–2):248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods.* 2001;25(4):402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
23. Schumacher K, Krebs M. The V-ATPase: Small cargo, large effects. *Curr Opin Plant Biol.* 2010;13(6):724–730. doi: 10.1016/j.pbi.2010.07.003
24. Wang C, Xiang Y, Qian D. Current progress in plant V-ATPase: From biochemical properties to physiological functions. *J Plant Physiol.* 2021;266:153525. doi: 10.1016/j.jplph.2021.153525

25. Raghavendra AS, Ye W, Kinoshita T. Editorial: pH as a signal and secondary messenger in plant cells. *Front Plant Science*. 2023;14:1148689. doi: 10.3389/fpls.2023.1148689
26. Felle HH. pH: Signal and messenger in plant cells. *Plant Biol*. 2001;3(6):577–591. doi: 10.1055/s-2001-19372
27. Felle HH. pH regulation in anoxic plants. *Ann Bot*. 2005;96(4): 519–532. doi: 10.1093/aob/mci207
28. Drew MC. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1997;48:223–250. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.223
29. Chirkova T, Yemelyanov V. The study of plant adaptation to oxygen deficiency in Saint Petersburg University. *Biol Commun*. 2018;63(1):17–31. doi: 10.21638/spbu03.2018.104
30. Kulichikhin KY, Aitio O, Chirkova TV, Fagerstedt KV. Effect of oxygen concentration on intracellular pH, glucose-6-phosphate and NTP content in rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum aestivum*) root tips: *In vivo* ^{31}P -NMR study. *Physiol Plant*. 2007;129(3):507–518. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00819.x
31. Yemelyanov VV, Chirkova TV, Lindberg SM, Shishova MF. Potassium efflux and cytosol acidification as primary anoxia-induced events in wheat and rice seedlings. *Plants*. 2020;9(9):1216. doi: 10.3390/plants9091216
32. Greenway H, Kulichikhin KY, Cawthray GR, Colmer TD. pH regulation in anoxic rice coleoptiles at pH 3.5: Biochemical pH-stats and net H^+ influx in the absence and presence of NOFormula. *J Exp Bot*. 2012;63(5):1969–1983. doi: 10.1093/jxb/err395
33. Narsai R, Secco D, Schultz MD, et al. Dynamic and rapid changes in the transcriptome and epigenome during germination and in developing rice (*Oryza sativa*) coleoptiles under anoxia and re-oxygenation. *Plant J*. 2017;89(4):805–824. doi: 10.1111/tpj.13418
34. Nghi KN, Tondelli A, Valè G, et al. Dissection of coleoptile elongation in japonica rice under submergence through integrated genome-wide association mapping and transcriptional analyses. *Plant Cell Environ*. 2019;42(6):1832–1846. doi: 10.1111/pce.13540
35. Pucciariello C. Molecular mechanisms supporting rice germination and coleoptile elongation under low oxygen. *Plants*. 2020;9(8):1037. doi: 10.3390/plants9081037
36. Gruber G, Wiczorek H, Harvey WR, Muller V. Structure-function relationship of A-, F- and V-ATPases. *J Exp Biol*. 2001;204(15): 2597–2605. doi: 10.1242/jeb.204.15.2597
37. Sze H, Schumacher K, Muller ML, et al. A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H^+ -ATPase. *Trends Plant Sci*. 2002;7(4):157–161. doi: 10.1016/s1360-1385(02)02240-9
38. Dettmer J, Schubert D, Calvo-Weimar O, et al. Essential role of the V-ATPase in male gametophyte development. *Plant J*. 2005;41(1):117–124. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2004.02282.x
39. Dettmer J, Liu T-Y, Schumacher K. Functional analysis of *Arabidopsis* V-ATPase subunit VHA-E isoforms. *Eur J Cell Biol*. 2010;89(2–3): 152–156. doi: 10.1016/j.ejcb.2009.11.008
40. Chen S-H, Bubb MR, Yarmola EG, et al. Vacuolar H^+ -ATPase binding to microfilaments: regulation in response to phosphatidylinositol 3-kinase activity and detailed characterization of the actin-binding site in subunit B. *J Biol Chem*. 2004;279(9):7988–7998. doi: 10.1074/jbc.M305351200
41. Lu M, Ammar D, Ives H, et al. Physical interaction between aldolase and vacuolar H^+ -ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump. *J Biol Chem*. 2007;282(34):24495–24503. doi: 10.1074/jbc.M702598200
42. Wang L, He X, Zhao Y, et al. Wheat vacuolar H^+ -ATPase subunit B cloning and its involvement in salt tolerance. *Planta*. 2011;234(1):1–7. doi: 10.1007/s00425-011-1383-2
43. Hanitzsch M, Schnitzer D, Seidel T, et al. Transcript level regulation of the vacuolar H^+ -ATPase subunit isoforms VHA-A, VHA-E and VHA-G in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Membr Biol*. 2007;24(5–6):507–518. doi: 10.1080/09687680701447393
44. Löw R, Rockel B, Kirsch M, et al. Early salt stress effects on the differential expression of vacuolar H^+ -ATPase genes in roots and leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol*. 1996;110(1):259–265. doi: 10.1104/pp.110.1.259
45. Golldack D, Dietz K-J. Salt-induced expression of the vacuolar H^+ -ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific. *Plant Physiol*. 2001;125(4):1643–1654. doi: 10.1104/pp.125.4.1643

ОБ АВТОРАХ

Анастасия Алексеевна Кирпичникова;

ORCID: 0000-0001-5133-5175; eLibrary SPIN: 9960-9527;

e-mail: nastin1972@mail.ru

Мария Олеговна Бикташева; ORCID: 0009-0000-9263-7815;

e-mail: togepi03@mail.ru

Владислав Владимирович Емельянов, канд. биол. наук, доцент; ORCID: 0000-0003-2323-5235; eLibrary SPIN: 9460-1278; e-mail: bootika@mail.ru

***Мария Федоровна Шишова,** д-р биол. наук, профессор; адрес: Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9; ORCID: 0000-0003-3657-2986; eLibrary SPIN: 7842-7611; e-mail: mshishova@mail.ru

AUTHORS' INFO

Anastasia A. Kirpichnikova;

ORCID: 0000-0001-5133-5175; eLibrary SPIN: 9960-9527;

e-mail: nastin1972@mail.ru

Maria O. Biktasheva; ORCID: 0009-0000-9263-7815;

e-mail: togepi03@mail.ru

Vladislav V. Yemelyanov, Cand. Sci. (Biology), Assistant Professor; ORCID: 0000-0003-2323-5235; eLibrary SPIN: 9460-1278; e-mail: bootika@mail.ru

***Maria F. Shishova,** Dr. Sci. (Biology), Professor; address: 7/9 Universitetskaya emb., Saint Petersburg, 199034, Russia; ORCID: 0000-0003-3657-2986; eLibrary SPIN: 7842-7611; e-mail: mshishova@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author