

УДК: 581.1

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОТВЕТА
КАРТОФЕЛЯ СОРТА АСТАНАЛЫК НА ОСМОТИЧЕСКИЙ СТРЕССАргумбаева А.К.^{1,3} , Қали Б.Р.¹ , Абеуова Л.С.¹ , Насиев Б.Н.³ , Манабаева Ш.А.^{1,2,3*} ¹ Национальный центр биотехнологии, 010000, Казахстан, г. Астана, Кургальжинское шоссе, 13/5² Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, 010000, Казахстан, г. Астана, ул. К. Сатпаева, 2³ Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана, 090009, Казахстан, г. Уральск, ул. Жангир хана, 51

Автор для корреспонденции: *manabayeva@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Изменение климата и учащение экстремальных погодных явлений обуславливают необходимость изучения механизмов устойчивости картофеля к водному дефициту и осмотическому стрессу. Целью исследования являлась оценка физиолого-биохимических и молекулярных реакций картофеля ПЭГ сорта Астаналык на воздействие различных осмотических агентов. Растения подвергали воздействию ПЭГ-6000, сорбитола и NaCl, после чего определяли содержание хлорофилла и малонового диальдегида (МДА), активность каталазы (КАТ), а также уровни экспрессии генов *StuNAC*, *TRE* и *OST2* в листьях и корнях. Установлено, что характер стрессового ответа зависел от природы осмотического агента и типа ткани. Статистически значимое снижение содержания хлорофилла наблюдалось только при воздействии 8 % ПЭГ-6000. В этом же варианте был выявлен максимальный уровень МДА – 12,08 нмоль/г, что на 60 % превышало контрольное значение. Наиболее выраженное повышение активности КАТ отмечено при воздействии 75 мМ NaCl и составило 46,9 % по сравнению с контролем. Воздействие 8 % ПЭГ-6000 вызывало максимальную индукцию экспрессии *StuNAC*, *TRE* и *OST2*, преимущественно в корнях: уровни их экспрессии увеличивались в 3,31, 3,24 и 2,89 раза соответственно. Между экспрессией исследуемых генов и активностью КАТ была выявлена тесная положительная корреляция. Полученные результаты свидетельствуют о дифференцированном и тканеспецифичном ответе сорта Астаналык на различные осмотические агенты и могут быть использованы при комплексной оценке стрессоустойчивости картофеля.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., сорт Астаналык, *in vitro*, ПЭГ-6000, сорбитол, NaCl, хлорофилл, каталаза, малоновый диальдегид, экспрессия генов

ВВЕДЕНИЕ

Изменение климата и сокращение площадей сельскохозяйственных земель существенно усиливают нагрузку на аграрный сектор и обостряют проблему обеспечения продовольственной безопасности. Эти процессы сопровождаются усилением воздействия абиотических стрессов, которые не только повышает восприимчивость растений к болезням и вредителям, но и вызывают глубокие физиологические, биохимические и молекулярные нарушения, приводящие к снижению роста, развития и продуктивности сельскохозяйственных культур. Особенно остро данная проблема проявляется в регионах, наиболее уязвимых к климатическим изменениям и дефициту продовольствия.

В связи с этим изучение механизмов формирования устойчивости растений к абиотическим стрессам и разработка эффективных подходов к снижению их негативного влияния на урожайность являются одними из приоритетных направлений современной аграрной науки. Существенную роль в решении этих задач играют биотехнологические методы, в частности технологии культуры тканей и клеток растений (*in vitro*), которые значительно расширяют возможности селекции. Развитие молекулярной генетики, геномики и методов редактирования генома позволяет выявлять ключевые гены и регуляторные сети, определяющие стрессоустойчивость растений, и использовать полученные знания для создания высокопродуктивных генотипов, адаптированных к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Картофель (*Solanum tuberosum* L.), занимающий четвертое место в мире по объему производства после пшеницы, риса и кукурузы, относится к числу сельскохозяйственных культур, наиболее чувствительных к дефициту влаги [1]. Даже кратковременные периоды засухи способны существенно ухудшать качество клубней, тогда как недостаток воды отрицательно влияет на рост, развитие и урожайность на всех этапах онтогенеза, особенно в период клубнеобразования. В условиях водного дефицита также нередко наблюдается увеличение продолжительности вегетативного периода, что приводит к снижению хозяйственной ценности культуры [2, 3]. В связи с этим разработка эффективных подходов к повышению засухоустойчивости картофеля является одной из приоритетных задач современной селекции, направленной на обеспечение стабильной урожайности в условиях изменяющегося климата и ограниченности водных ресурсов.

Культивирование растительных тканей *in vitro* представляет собой эффективный экспериментальный подход для изучения физиологических, биохимических и молекулярных механизмов устойчивости картофеля к абиотическим стрессам [4]. Использование контролируемых условий культивирования позволяет воспроизводимо моделировать водный дефицит и оценивать реакцию растений на стрессовые воздействия на ранних этапах развития.

Одним из ключевых механизмов адаптации растений к засухе является накопление совместимых осмолитов – низкомолекулярных органических соединений, к которым

относятся сорбит, маннит, пролин, а также различные сахара и их производные. Эти соединения обладают высокой растворимостью и локализуются преимущественно в цитозоле, даже в высоких концентрациях не нарушают клеточный метаболизм. Осмолиты поддерживают осмотический баланс, способствуют сохранению тургора, стабилизируют белки и биологические мембраны, а также выполняют антиоксидантную функцию, снижая повреждающие действия активных форм кислорода, образующихся при стрессе [5].

Для экспериментального моделирования засухи в культуре тканей наиболее широко применяют полиэтиленгликоль (ПЭГ). Высокая молекулярная масса ПЭГ не позволяет молекулам проникать через клеточные стенки корней. Вещество удерживает воду в растворе и снижает его водный потенциал, создавая искусственный осмотический стресс. За счет снижения водного потенциала питательной среды ПЭГ имитирует дефицит влаги, вызывая физиологические реакции, характерные для засухи, включая подавление роста и развития растений *in vitro* [6]. Благодаря этим свойствам ПЭГ является одним из наиболее распространенных агентов для оценки засухоустойчивости генотипов и изучения механизмов адаптации растений к водному стрессу.

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о значительной вариативности генотипов картофеля в ответ на осмотический стресс, индуцированный ПЭГ, сорбитолом и NaCl, что проявляется в различиях интенсивности роста побегов и корневой системы, накоплении биомассы и степени устойчивости растений к стрессовым воздействиям [7, 8]. Однако большинство опубликованных работ сосредоточено преимущественно на изучении отдельных физиологических или морфологических показателей, тогда как комплексная оценка, объединяющая физиологические, биохимические и молекулярные показатели, остается недостаточно изученной.

Одним из ключевых последствий засухи является развитие окислительного стресса, обусловленного избыточным образованием активных форм кислорода. Это приводит к усилению перекисного окисления липидов, накоплению малонового диальдегида (МДА), деградации фотосинтетических пигментов, нарушением целостности клеточных мембран и увеличением утечки электролитов. Совокупность этих процессов приводит к снижению жизнеспособности и, в тяжелых случаях, к гибели клеток [9, 10]. Одним из наиболее информативных биохимических маркеров окислительного повреждения является малоновый диальдегид (МДА), накопление которого отражает интенсивность перекисного окисления липидов и степень повреждения клеточных мембран [11, 12].

Для комплексной оценки устойчивости растений к водному дефициту широко используют физиолого-биохимические показатели, включая содержание хлорофилла, уровень МДА и активность каталазы (КАТ). Снижение содержания хлорофилла свидетельствует о нарушении фотосинтеза, повышение уровня МДА указывает на повреждение клеточных мембран, тогда как увеличение активности КАТ демонстрирует активацию антиоксидантной системы защиты, направленной на нейтрализацию активных форм кислорода и поддержание клеточного го-

меостаза.

Изучение экспрессии генов является одним из ключевых подходов к пониманию молекулярных механизмов, регулирующих реакцию растений на изменения окружающей среды и процессы их роста и развития. Для количественной оценки экспрессии генов, определяющих устойчивость или чувствительность к засухе, широко применяется метод обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР - RT-qPCR), отличающийся высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью результатов [13-15]. Однако достоверность анализа экспрессии генов в значительной степени зависит от корректной нормализации данных, которая достигается использованием референсных генов со стабильным уровнем экспрессии независимо от экспериментальных условий [16, 17]. Несмотря на широкое применение генов *Actin*, *EF1-α* и *GAPDH* в качестве внутренних контролей, многочисленные исследования показали, что их экспрессия может варьироваться в зависимости от вида абиотического или биотического стресса [18-21]. Для картофеля установлено, что ген *EF1-α* сохраняет стабильный уровень экспрессии при солевом стрессе и заражении патогенами, что делает его одним из наиболее надежных референсных генов для RT-qPCR-анализа в данных условиях [22].

Целью данного исследования являлась сравнительная оценка физиологических и биохимических и молекулярных реакций растений картофеля сорта Астаналык на осмотический стресс, индуцированный ПЭГ, сорбитолом и NaCl в условия культуры *in vitro*. В работе были исследованы динамика накопления фотосинтетических пигментов, уровень окислительных повреждений клеточных мембран, активность ключевых антиоксидантных ферментов, а также особенности экспрессии генов, ассоциированных с механизмами устойчивости к засухе и засолению. Комплексный анализ указанных показателей позволил дифференцировать вклад осмотического, ионного и метаболического компонентов стресса в формирование адаптивных реакций картофеля и оценить перспективность использования данной экспериментальной системы для скрининга стрессоустойчивых генотипов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и условия культивирования

В качестве растительного материала использовали местный сорт картофеля Астаналык. Микроклональное размножение в культуре *in vitro* проводилось на среде Мурасиге и Скуга (MS) [23], с добавлением витаминов (PhytoTech Labs, США) и сахарозы. Культивирование проводили в стеклянных пробирках размером 25 × 150 мм при температуре 25 ± 2°C, фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) и интенсивности освещения 2500 люкс.

Индукция осмотического стресса

Для моделирования осмотического стресса использовали двухнедельные растения картофеля, выращенные в культуре *in vitro*. Проростки асептически переносили на питательную среду, дополненную одним из следующих осмотических агентов: 0,3 М сорбитолом, 75 мМ NaCl и 8% ПЭГ-6000. Осмотический потенциал ПЭГ-содержа-

ших сред оценивали по эмпирическому уравнению Мишеля и Кауфмана [24]:

$$\Psi_{\text{РЕГ}} = -(1,18 \times 10^{-2}) C - (1,18 \times 10^{-4}) C^2 + (2,67 \times 10^{-4}) CT + (8,39 \times 10^{-7}) C^2 T$$

где $\Psi_{\text{РЕГ}}$ — осмотический потенциал ПЭГ-6000 (бар), C — концентрация ПЭГ-6000, выраженная в г кг⁻¹ Н₂O, и T — температура в °С. Расчеты проводились при 25 °С. Эти концентрации соответствовали водным потенциалам -0,960, -0,589 и -0,321 МПа соответственно. Продолжительность стрессовой обработки составляла два дня, далее оценивались биохимические признаки, а также уровни экспрессии генов с использованием трех биологических повторов.

Физиологические анализы

Содержание хлорофиллов определяли спектрофотометрическим методом после экстракции 96%-ным этанолом с измерением оптической плотности (ОП) при 665 и 649 нм в соответствии с методом Lichtenthaler [25, 26].

Уровень МДА оценивали по реакции с тиобарбитуровой кислотой с регистрацией ОП при 450, 532 и 600 нм [27, 28].

Активность КАТ измеряли по скорости разложения перекиси водорода (Н₂O₂) при 240 нм [29]. Все анализы выполняли с модификациями, описанными в работе Аргумбаевой и соавт.[30].

Выделение РНК

Общую РНК выделяли из корней, стеблей и листьев проростков картофеля после 2-суточной обработки 0,3 М сорбитолом, 75 mM NaCl и 8% ПЭГ-6000. Для экстракции использовали около 100 мг свежей растительной ткани, которую гомогенизировали в 1 мл реагента TRIzol (Life Technologies, США) в соответствии с рекомендациями производителя. После центрифугирования при 12 000×g в течение 10 минут при 4°С водную фазу перенесли в новую пробирку, хлороформ и проводили разделение фаз. РНК осаждали изопропанолом, полученный осадок промывали 70% этанолом, высушивали при комнатной температуре и растворяли в обработанной DEPC воде, свободной от РНКаз и ДНКаз (0,1% DEPC). Целостность выделенной РНК оценивали методом электрофореза на 1% агарозном геле с использованием буфера TAE. Концентрацию и степень чистоты РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop (Thermo Scientific, США) по соотношению A260/280. До проведения дальнейших анализов образцы РНК хранили при температуре -80°С.

Синтез кДНК (обратная транскрипция)

Перед проведением обратной транскрипции РНК доводили до концентрации 2 мкг с использованием 0,1% DEPC-обработанной воды. Синтеза первой цепи кДНК осуществляли на матрице выделенной тотальной РНК с использованием набора «Реверта Л» (Москва, Россия) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию полученной кДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop (Thermo Scientific, США), после чего хранили при -20°С до проведения количественного анализа экспрессии генов.

Количественный ПЦР-анализ в реальном времени (RT-

PCR)

Анализ экспрессии генов проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени с использованием зондов TaqMan на приборе QuantStudio™ 5 (Thermo Scientific, США). В качестве матрицы использовали кДНК, синтезированную из проростков, подвергнутых осмотическому стрессу. Уровень экспрессии определяли для следующих генов *StuNAC*, трегалазы (*TRE*) и *OST2*, участвующих в регуляции стрессовых ответов растений. В качестве референсного гена использовали ген элонгационного фактора трансляции *EF1-α*.

Праймеры и TaqMan-зонды были синтезированы компанией Lumiprobe (Россия). Амплификацию проводили в конечном объеме 25 мкл, содержащем 5 мкл кДНК, 12,5 мкл универсальной реакционной смеси BioMaster HS-qPCR (2×) («Биолабмикс», МН020-2040, Россия), по 1,0 мкл специфического праймера для каждого анализируемого гена, 1,0 мкл соответствующего TaqMan-зонда и необходимый объем DEPC-обработанной воды. Для детекции генов-мишеней применяли зонды, меченные с флуорофором FAM и гасителем BHQ1, тогда как для детекции референсного гена *EF1-α* использовали зонд с флуорофором Cy5 и соответствующим гасителем.

Программа амплификации включала предварительную инкубацию при 50°С в течение 2 минут для активации урацил-N-гликозилазы, начальную денатурацию при 95°С в течение 5 минут, после чего выполняли 40 циклов, каждый из которых включал денатурацию при 95°С в течение 10 секунд и совмещенную стадию отжига праймеров и элонгации при 60°С в течение 60 секунд. Уровень флуоресценции регистрировали после каждого цикла. Все реакции проводили в трех биологических повторностях. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ с нормализацией по экспрессии референсного гена *EF1-α*. Ожидаемые размеры ампликонов составлял от 95 до 112 bp (таблица 1). Для контроля возможного загрязнения в анализ включали отрицательные контроли без матрицы (NTC), в которых кДНК заменяли водой, свободной от нуклеаз. Специфичность праймеров оценивали с помощью платформы PrimerDigital [31].

Статистический анализ

Влияние типа осмотического агента, его концентрации и взаимодействия этих факторов на исследуемые показатели оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программе GraphPad Prism версии 11.0.0. Различия между отдельными вариантами оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа с последующим тестом Тьюки (Tukey HSD). Уровни статистической значимости обозначали следующим образом: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Взаимосвязи между исследуемыми показателями оценивали с помощью корреляционного анализа с расчётом коэффициентов корреляции Пирсона и регрессионного анализа. Экспериментальные данные обрабатывали в программе XLSTAT (Addinsoft, Франция), интегрированной в Microsoft Excel.

Для количественной оценки снижения показателей роста при осмотическом стрессе, вызванном ПЭГ, коэффи-

Таблица 1. Последовательности праймеров для целевых и референсных генов, использованных в анализе методом RT-qPCR

Идентификатор	Название гена	Инвентарный номер в GenBank	Длина гена, пн	Последовательность праймера	Длина ампликонов, пн
<i>StuNAC</i>	NAC domain protein	AJ401151.1	1295	aggcactgtgttttatgctg FAM-ccacattggcgagccgg-tactc-BHQ1 ttattgttcttgccagcagac	108
<i>TRE</i>	Trehalase	XM_015307117.1	1653	tgatgtcacaataatgtggagc FAM-tgtcccaaacgggttcggat-gg-BHQ1 tctagaagtgccagtacaacg	95
<i>OST2</i>	Open stomata 2	XM_006366999.2	3399	gctttgaccggtgaatctc FAM-tggtgtttactctggctccac-gtg-BHQ1 tgaacctctgtagcaatcac	112
<i>EFl-α</i>	Elongation factor 1	XM_006343392	1803	agacctttgctgaataccca Cy5-tgggtcgttttgctgtgagg-gac-BHQ2 tgggtcctctgtgtcaacatt	101

циент DDI рассчитывался как дополнение к коэффициенту засухоустойчивости (DTC):

$$DDI = 1 - DTC = 1 - \left(\frac{x_{ijs}}{x_{ijc}} \right)^d_j \quad (2)$$

где DTC рассчитывается как отношение значения признака к значению признака при обработке ПЭГ. Более высокие значения DDI указывают на большее снижение измеряемого признака из-за стресса, тогда как значения, близкие к нулю, указывают на меньшее повреждение и более высокую устойчивость к стрессу [32, 33].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биохимические реакции картофеля сорта Астаналык в условиях осмотического стресса

Регрессионный анализ биохимических показателей сорта картофеля Астаналык выявил различную направленность изменений исследуемых параметров в зависимости от типа осмотического агента (рисунок 1). Для содержания хлорофилла установлена слабая положительная зависимость ($R^2 = 0,3145$), что свидетельствует на отсутствие выраженной связи между видом осмотического агента и уровнем фотосинтетических пигментов. Наименьшее содержание хлорофилла отмечено при обработке 8% ПЭГ-

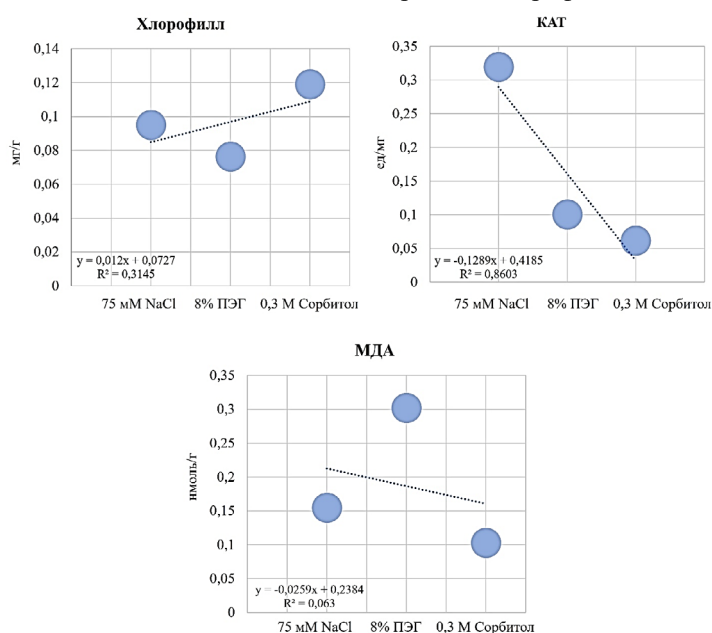


Рисунок 1. Регрессионный анализ биохимических показателей сорта картофеля Астаналык в условиях осмотического стресса, индуцированного различными агентами: содержание хлорофилла, активность КАТ, содержание МДА. Линии тренда показывают зависимость между осмотиками и значениями DDI, с соответствующими уравнениями регрессии и коэффициентами детерминации

Таблица 2. Биохимические реакции сорта картофеля «Астаналык» в условиях осмотического стресса, индуцированного разными осмотическими агентами

	Осмотические вещества	min	max	mean±SD	P-value
Хлорофилл	Контроль	33,90	38,17	36,14±0,21	
	8% ПЭГ-6000	31,96	35,78	33,38±0,21	<0.05
	0,3 М Сорбитол	26,06	37,53	31,85±0,59	>0.05
	75 mM NaCl	26,17	39,13	32,54±0,66	>0.05
КАТ	Контроль	31,31	34,98	33,41±0,19	
	8% ПЭГ-6000	32,11	41,51	37,42±0,45	>0.05
	0,3 М Сорбитол	33,37	37,84	35,74±0,22	>0.05
	75 mM NaCl	48,28	49,88	49,08±0,07	<0.01
МДА	Контроль	5,69	8,60	7,55±0,34	
	8% ПЭГ-6000	8,69	16,53	12,08±0,67	>0.05
	0,3 М Сорбитол	6,92	10,59	8,72±0,36	>0.05
	75 mM NaCl	7,37	9,73	8,87±0,25	<0.05

6000, тогда как максимальное значение было зарегистрировано при обработке 0,3 М сорбитолом.

Активность КАТ характеризовалась выраженной отрицательной линейной зависимостью ($R^2 = 0,8603$). Наиболее высокая активность фермента отмечена при обработке 75 mM NaCl, тогда как при воздействии 8% ПЭГ и 0,3 М сорбитола наблюдалось ее последовательное снижение.

Для содержания МДА установлена слабая отрицательная зависимость ($R^2 = 0,063$), свидетельствующая об отсутствии значимой линейной связи между исследуемыми вариантами обработки и уровнем липидной перекисидации. Максимальное накопление содержания МДА наблюдалось при воздействии 8% ПЭГ-6000, тогда как при обработке NaCl и сорбитолом значения показателя были ниже.

Количественная оценка биохимических показателей (таблица 2) подтвердила различный характер реакции растений на используемые осмотические агенты. Во всех вариантах осмотического стресса содержание хлорофилла снижалось по сравнению с контролем (36,14 мг/г). Минимальное значение зарегистрировано при обработке 0,3 М сорбитолом (31,85 мг/г), тогда как при воздействии 75 mM NaCl и 8% ПЭГ-6000 содержание хлорофилла составило 32,54 и 33,38 мг/г соответственно. Статистически значимое снижение относительно с контроля выявлено только при обработке ПЭГ-6000 ($p < 0,05$).

Активность каталазы возрастала во всех вариантах осмотического стресса. Наиболее выраженное увеличение фермента зарегистрировано при воздействии 75 mM NaCl (49,08 ед/мг), что достоверно превышало контрольные значения ($p < 0,01$). При обработке ПЭГ-6000 и сорбитолом активность КАТ составила 37,42 и 35,74 ед/мг соответственно, однако данные различия по сравнению с контролем были статистически незначимыми ($p > 0,05$).

Во всех вариантах наблюдалось повышение содержания МДА по сравнению с контролем (7,55 нмоль/г). Максимальное накопление содержания МДА наблюдалось при воздействии ПЭГ-6000 (12,08 нмоль/г), что свидетельствует о наиболее выраженном развитии окислительного стресса в данном варианте, хотя различия с кон-

тролем не достигли уровня статистической значимости ($p > 0,05$). При обработке 75 mM NaCl содержание МДА увеличивалось до 8,87 нмоль/г и достоверно превышало контрольный уровень ($p < 0,05$), тогда как при воздействии 0,3 М сорбитола вызывала повышение показателя до 8,72 нмоль/г без статистически значимых отличий.

Как показано на рисунке 2, воздействие исследованных осмотических агентов повышало уровень экспрессии генов *StuNAC*, *TRE* и *OST2* в корнях, листьях и стеблях растений картофеля сорта Астаналык по сравнению с контролем. Наиболее выраженная индукция экспрессии наблюдалась при использовании 8 % ПЭГ-6000, тогда как воздействие 0,3 М сорбитола и 75 mM NaCl вызывало менее выраженные изменения.

В корнях максимальное повышение экспрессии всех исследованных генов было отмечено при воздействии 8 % ПЭГ-6000. По сравнению с контролем уровень экспрессии *StuNAC* увеличился в 3,31 раза, *TRE* - в 3,24 раза, а *OST2* - в 2,89 раза. Под действием 0,3 М сорбитола экспрессия этих генов возросла соответственно в 1,93, 1,51 и 1,43 раза. Воздействие 75 mM NaCl сопровождалось более умеренным повышением экспрессии: в 1,63 раза для *StuNAC*, в 1,60 раза для *TRE* и в 1,40 раза для *OST2*.

В листьях изменения экспрессии генов были менее выраженными, чем в корнях. При воздействии 8 % ПЭГ-6000 уровень экспрессии *StuNAC*, *TRE* и *OST2* увеличился соответственно в 1,67, 1,88 и 1,86 раза по сравнению с контролем. При использовании 0,3 М сорбитола экспрессия этих генов повысилась соответственно в 1,61, 1,58 и 1,29 раза, а при воздействии 75 mM NaCl - в 1,38, 1,60 и 1,40 раза.

В стеблях наиболее выраженная индукция экспрессии также наблюдалась под действием 8 % ПЭГ-6000: уровень экспрессии *StuNAC* увеличился в 2,17 раза, *TRE* - в 3,02 раза, а *OST2* - в 2,10 раза относительно контроля. При воздействии 0,3 М сорбитола экспрессия этих генов повысилась соответственно в 1,59, 1,56 и 1,29 раза. Наименьшая индукция была отмечена при использовании 75 mM NaCl: уровень экспрессии *StuNAC*, *TRE* и *OST2* увеличился соответственно в 1,37, 1,26 и 1,23 раза.

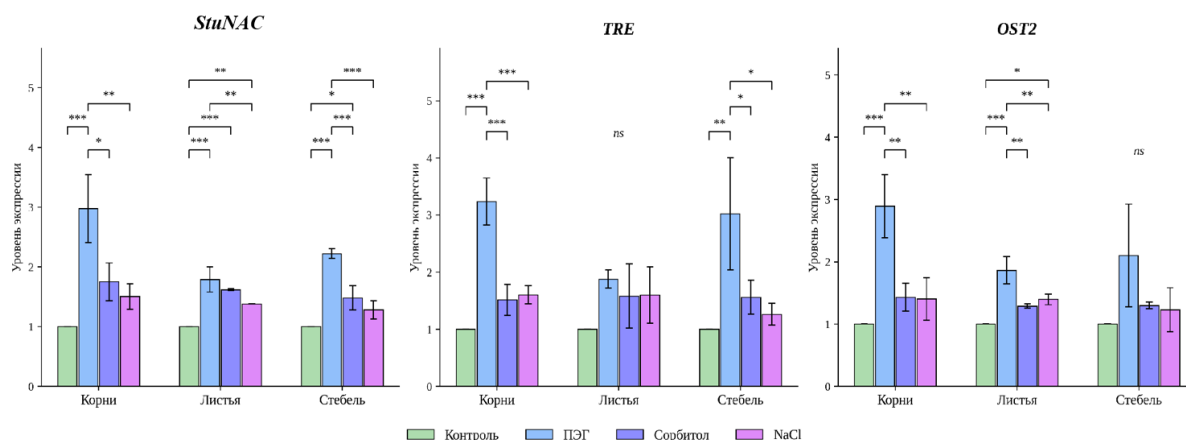


Рисунок 2. Относительный уровень экспрессии генов *StuNAC*, *TRE* и *OST2* в корнях, листьях и стебле картофеля при осмотическом стрессе, индуцированном ПЭГ-6000 (8%), сорбитолом (0,3 М) и NaCl (75 мМ). Значения экспрессии рассчитаны методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ после нормализации по гену *EF1-α*. Столбцы — среднее по трём биологическим повторностям ($n = 3$), планки погрешностей — стандартное отклонение (SD). Значимость определена однофакторным ANOVA с апостериорным тестом Tukey HSD: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ (только значимые сравнения отмечены на графике).

Как показано на рисунке 3, регрессионный анализ продемонстрировал преимущественно отрицательную зависимость уровней экспрессии генов *StuNAC*, *TRE* и *OST2* от типа применяемого осмотического агента. Во всех исследуемых органах максимальные значения экспрессии наблюдались при воздействии 8% ПЭГ-6000, тогда как при обработке 0,3 М сорбитолом и 75 мМ NaCl отмечалось постепенное снижение уровня транскрипции.

Для гена *StuNAC* наиболее выраженная линейная зависимость выявлена в листьях, где коэффициент детерминации составил $R^2 = 0,9738$, что указывает на высокую степень

соответствия экспериментальных данных линейной модели. В корнях и стеблях значения R^2 составили 0,9423 и 0,9576 соответственно, что также свидетельствует о сильной отрицательной зависимости экспрессии гена от условий осмотического воздействия.

Регрессионный анализ экспрессии гена *TRE* показал различную степень соответствия линейной модели в разных органах растения. Наиболее высокая зависимость установлена в стеблях $R^2 = 0,9626$, тогда как в листьях и корнях коэффициенты детерминации составили 0,6886 и 0,6642 соответственно. Несмотря на различия в тесноте

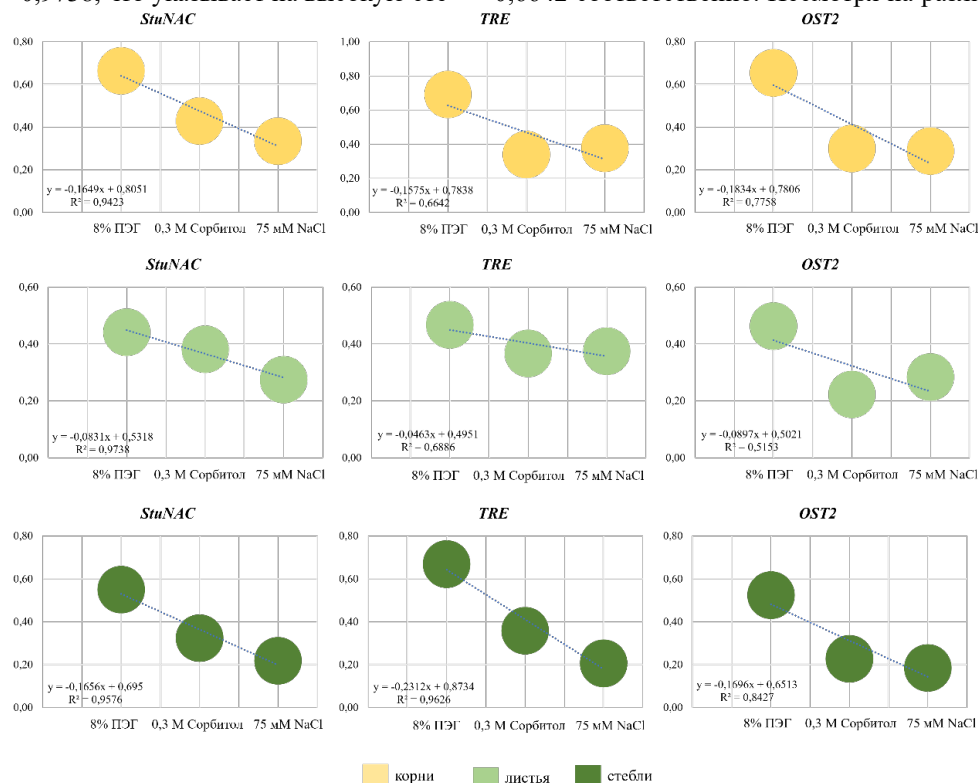


Рисунок 3. Регрессионный анализ уровней экспрессии генов в корнях, листьях и стеблях картофеля сорта Астаналык при воздействии различных осмотических веществ. Линии тренда отражают зависимость между концентрацией осмотического агента и значениями DDI, приведены уравнения регрессии и коэффициенты детерминации

связи, во всех вариантах наблюдалась единая тенденция к снижению уровня транскрипции при переходе от ПЭГ-6000 к сорбитолу и NaCl.

Для гена *OST2* также выявлена отрицательная зависимость между типом осмотического воздействия и уровнем экспрессии. Наиболее высокая достоверность линейной модели отмечена в стеблях $R^2 = 0,8427$, несколько ниже - в корнях $R^2 = 0,7758$, тогда как в листьях коэффициент детерминации составил 0,5152, что указывает на более выраженную вариабельность экспрессии данного гена в листовой ткани.

Как видно на рисунке 4, между уровнями экспрессии генов *StuNAC*, *TRE* и *OST2* выявлены сильные положительные корреляционные связи. Наиболее высокая корреляция наблюдалась между генами *TRE* и *OST2* $r = 0,964$; $p < 0,0001$, а также между *StuNAC* и *TRE* $r = 0,962$; $p < 0,0001$ и *StuNAC* и *OST2* $r = 0,942$; $p < 0,0001$. Полученные результаты свидетельствуют о согласованной регуляции исследуемых генов в ответ на осмотический стресс и их возможном участии в общих сигнальных путях адаптации к неблагоприятным условиям среды.

Активность КАТ также демонстрировала тесную положительную связь с экспрессией всех трех генов. Наиболее высокий коэффициент корреляции был установлен между *OST2* и КАТ $r = 0,980$; $p < 0,0001$, тогда как для генов *StuNAC* и *TRE* значения составили $r = 0,933$ и $r = 0,900$ соответственно $p < 0,0001$. Данные результаты указывают на взаимосвязь между активацией генов стрессового ответа и усилением антиоксидантной защиты растений.

Корреляционный анализ не выявил статистически значимых связей между содержанием МДА и экспрессией исследуемых генов. Коэффициенты корреляции между

	<i>NAC</i>	<i>TRE</i>	<i>OST2</i>	МДА	КАТ	Хлорофилл
<i>NAC</i>						
<i>TRE</i>						
<i>OST2</i>						
МДА						
КАТ						
Хлорофилл						

	<i>NAC</i>	<i>TRE</i>	<i>OST2</i>	МДА	КАТ	Хлорофилл
<i>NAC</i>	1					
<i>TRE</i>	0,962***	1				
<i>OST2</i>	0,942***	0,964***	1			
МДА	0,108	0,07	-0,039	1		
КАТ	0,933***	0,900***	0,98***	-0,152	1	
Хлорофилл	-0,279	-0,294	-0,253	0,014	-0,176	1

*** $< 0,0001$

Рисунок 4. Матрица коэффициентов корреляции Пирсона между биохимическими показателями и уровнями экспрессии генов у сорта картофеля Астаналык. Цветовая шкала отражает величину и направление корреляционной связи: красный цвет соответствует положительной корреляции (от 0 до +1), синий — отрицательной (от -1 до 0).

МДА и генами *StuNAC*, *TRE* и *OST2* составили 0,108, 0,070 и -0,039 соответственно. Аналогично слабая отрицательная связь наблюдалась между уровнем МДА и активностью КАТ $r = -0,152$, что свидетельствует об отсутствии прямой зависимости между интенсивностью перекисного окисления липидов и исследуемыми молекулярными показателями в условиях данного эксперимента.

Содержание хлорофилла характеризовалось отрицательной корреляцией с экспрессией генов *StuNAC* ($r = -0,279$), *TRE* ($r = -0,294$) и *OST2* ($r = -0,253$), а также с активностью КАТ $r = -0,176$. Наиболее выраженная отрицательная связь отмечена между хлорофиллом и экспрессией гена *TRE*, однако величина коэффициента указывает на слабый характер данной зависимости. Корреляция между содержанием хлорофилла и уровнем МДА практически отсутствовала $r = 0,014$.

Как следует рисунка 5, корреляционный анализ выявил преимущественно положительные взаимосвязи между уровнями экспрессии генов *StuNAC*, *TRE* и *OST2* в различных органах картофеля сорта Астаналык. Наиболее тесные корреляционные связи наблюдались между генами, экспрессируемыми в корнях. В частности, между экспрессией *StuNAC* и *TRE* в корнях коэффициент корреляции составил $r = 0,968$, между *TRE* и *OST2* $r = 0,963$ ($p < 0,0001$), а между *StuNAC* и *OST2* $r = 0,948$. Полученные результаты свидетельствуют о согласованной активации исследуемых генов в корневой системе в ответ на действие осмотического стресса.

Экспрессия генов в листьях характеризовалась менее выраженными корреляционными связями с экспрессией в других органах. Уровень транскрипции *StuNAC* в листьях умеренно положительно коррелировал с экспрессией генов в корнях $r = 0,497$ -0,529 и демонстрировал сильную связь с экспрессией *StuNAC*, *TRE* и *OST2* в стеблях $r = 0,795$ -0,830, $p < 0,0001$. В то же время экспрессия *TRE* в листьях не имела статистически значимых корреляций с большинством исследуемых показателей и характеризовалась слабыми отрицательными коэффициентами корреляции с экспрессией генов в корнях и стеблях $r = -0,390$ -0,029.

Для гена *OST2* в листьях установлены сильные положительные корреляции с экспрессией исследуемых генов в корнях и стеблях. Наиболее высокие значения коэффициента корреляции отмечены между экспрессией *OST2* в листьях и *TRE* в стеблях $r = 0,884$, $p < 0,0001$, а также между *OST2* в листьях и *StuNAC* в стеблях $r = 0,825$, $p < 0,0001$. Кроме того, экспрессия *OST2* в листьях положительно коррелировала с экспрессией всех трех генов в корнях ($= 0,735$ -0,873, $p < 0,0001$).

В стеблях выявлены наиболее тесные взаимосвязи между экспрессией исследуемых генов. Экспрессия *StuNAC* в стеблях сильно коррелировала с экспрессией *StuNAC*, *TRE* и *OST2* в корнях $r = 0,885$ -0,914, $p < 0,0001$, а также с экспрессией *OST2* в листьях $r = 0,825$, $p < 0,0001$. Между экспрессией *TRE* и *OST2* в стеблях также установлена сильная положительная связь $r = 0,851$, $p < 0,0001$, что указывает на согласованную регуляцию данных генов в этом органе.



Рисунок 5. Матрица коэффициентов корреляции Пирсона между экспрессии генов в корнях, листьях и стеблях картофеля сорта Астаналык при воздействии различных осмотических веществ. Цветовая шкала отражает величину и направление корреляционной связи: красный цвет соответствует положительной корреляции (от 0 до +1), синий отрицательной (от -1 до 0).

ОБСУЖДЕНИЕ

Участившиеся экстремальные погодные явления, связанные с изменением климата, повышают риск снижения продуктивности картофеля и подчеркивают необходимость изучения механизмов его адаптации к осмотическому стрессу [34]. В настоящем исследовании реакция сорта Астаналык на ПЭГ-6000, сорбитол и NaCl характеризовалась выраженной зависимостью от природы осмотического агента и ткани растения. Содержание хлорофилла изменялось относительно умеренно, причем статистически значимое снижение наблюдалось только при 8% ПЭГ-6000, что указывает на относительную стабильность фотосинтетического аппарата при кратковременном стрессе. Более выраженные изменения наблюдались для показателей окислительного статуса. Наиболее высокий уровень МДА отмечен при 8% ПЭГ-6000 и составил 12,08 нмоль/г, что на 60% превышало контроль, указывая на усиление перекисного окисления липидов. В то же время максимальное повышение активности КАТ наблюдалось при 75 мМ NaCl и составило 46,9% относительно контроля, тогда как при ПЭГ-6000 и сорбитоле увеличение составляло 12,0 и 7,0%, соответственно. Такая реакция может быть связана с сочетанием осмотического и ионного компонентов солевого стресса и согласуется с ранее описанной реакцией картофеля на NaCl [35, 36].

Наиболее выраженный транскрипционный ответ наблюдался при воздействии 8% ПЭГ-6000. В корнях экспрессия *StuNAC*, *TRE* и *OST2* увеличивалась в 3,31, 3,24 и 2,89 раза соответственно относительно контроля, тогда как в листьях изменения были менее выраженными. Более сильная реакция корней может отражать их первичную роль в восприятии изменений водного потенциала и формировании системного ответа на осмотический стресс. Повышение экспрессии *StuNAC* указывает на активацию транскрипционной регуляции стрессового ответа. Индукция *TRE* может свидетельствовать о перестройке трегалозного метаболизма, участвующего в поддержании осмотического гомеостаза; однако увеличение экспрессии *TRE* не следует напрямую интерпретировать как накопление трегалозы, поскольку трегалаза участвует в ее гидролизе. Повышение экспрессии *OST2*, кодирующего плазматическую H^+ -АТФазу, вероятно, связано с поддержанием про-

тонного градиента, мембранного потенциала и ионного гомеостаза при снижении водного потенциала.

Между уровнями экспрессии *StuNAC*, *TRE* и *OST2* была выявлена сильная положительная корреляция ($r = 0,942-0,964$; $p < 0,0001$), причем наиболее тесная связь наблюдалась между *TRE* и *OST2* ($r = 0,964$). Кроме того, активность КАТ тесно коррелировала с экспрессией всех трех генов ($r = 0,900-0,980$; $p < 0,0001$), что указывает на согласованное изменение транскрипционных и антиоксидантных компонентов стрессового ответа. Напротив, слабая корреляция уровня МДА с экспрессией генов и активностью КАТ позволяет предположить, что накопление продуктов перекисного окисления липидов не отражает напрямую интенсивность транскрипционной регуляции или антиоксидантной защиты.

Сравнение действия осмотических агентов показало, что ПЭГ-6000 вызывал наиболее выраженную индукцию экспрессии *StuNAC*, *TRE* и *OST2* и сопровождался максимальным накоплением МДА, тогда как NaCl сильнее стимулировал активность КАТ. Сорбитол вызывал менее выраженные изменения исследованных показателей. Различия в реакции картофеля на ПЭГ и сорбитол ранее отмечались при *in vitro* скрининге на устойчивость к водному дефициту [37]. Сорбитол-индуцированный стресс также сопровождается изменениями биохимических показателей картофеля [38], а его поглощение и постепенное накопление в тканях необходимо учитывать при интерпретации его действия как осмотического агента [39].

Таким образом, сорт Астаналык демонстрировал дифференциальный и тканеспецифический ответ на различные осмотические агенты. ПЭГ-6000 преимущественно активировал *StuNAC*, *TRE* и *OST2* и сопровождался наиболее высоким уровнем МДА, тогда как NaCl вызывал наиболее выраженное повышение КАТ. Полученные результаты показывают, что оценка осмотической стрессоустойчивости картофеля должна основываться на совокупности физиологических, биохимических и молекулярных показателей. Согласованное изменение *StuNAC*, *TRE* и *OST2* в сочетании с активностью КАТ и уровнем МДА может служить комплексной характеристикой стрессового ответа сорта Астаналык.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показали, что различные осмотические агенты вызывают специфические физиолого-биохимические и молекулярные реакции у сорта картофеля «Астаналык». Воздействие 8% ПЭГ-6000 индуцировало наиболее выраженные изменения исследованных показателей: снижение содержания хлорофилла, накопление МДА и максимальную индукцию экспрессии генов *StuNAC*, *TRE* и *OST2*, и преимущественно в корнях.

В свою очередь, обработка 75 мМ NaCl вызывала наиболее высокий уровень активности каталазы, свидетельствуя об активации антиоксидантной системы. Корреляционный анализ выявил тесную положительную взаимосвязь между экспрессией исследуемых генов и активностью каталазы, что указывает на согласованность транскрипционных и антиоксидантных компонентов адаптивного ответа на осмотический стресс. Полученные результаты могут быть использованы при оценке устойчивости картофеля к водному дефициту и в селекции стрессоустойчивых сортов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация: М.Ш. и Н.Б.; методология: А.А. и К.Б.; формальный анализ: А.А., К.Б.; исследование: А.А., К.Б. и Л.А.; ресурсы: М.Ш.; подготовка первоначального варианта рукописи: А.А., К.Б.; рецензирование и редактирование: М.Ш.; администрирование проекта: М.Ш.; привлечение финансирования: М.Ш. Все авторы ознакомились с опубликованной версией рукописи и одобрили ее.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование было профинансировано Министерством науки и высшего образования Республики Казахстан и выполнено в рамках грантового проекта ИРН AP23490126.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hanász A., et al. Responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) breeding lines to osmotic stress induced in vitro shoot culture // *Horticulturae*. – 2022. – Vol. 8, № 7. – P. 591.
2. Hu X.-y., et al. A comparative review of the potato industries in China and India // *Potato Research*. – 2025. – P. 1-24.
3. Sutula M., et al. Molecular mechanisms underlying defense responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) to environmental stress and CRISPR/Cas-mediated engineering of stress tolerance // *Plants*. – 2025. – Vol. 14, № 13. – P. 1983.
4. Sajid Z.A., Aftab F. Improvement of polyethylene glycol, sorbitol, mannitol, and sucrose-induced osmotic stress tolerance through modulation of the polyamines, proteins, and superoxide dismutase activity in potato // *International Journal of Agronomy*. – 2022. – Vol. 2022, № 1. – P. 5158768.
5. Azad N., et al. Physiological mechanism of salicylic

acid in *Mentha pulegium* L. under salinity and drought stress // *Brazilian Journal of Botany*. – 2021. – Vol. 44, № 2. – P. 359-369.

6. Al-Khayri J., Al-Bahrany A. Growth, water content, and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm // *Biologia Plantarum*. – 2004. – Vol. 48, № 1. – P. 105-108.

7. Barraza A., Sánchez F. Trehalases: a neglected carbon metabolism regulator? // *Plant Signaling & Behavior*. – 2013. – Vol. 8, № 7. – P. e24778.

8. Bianchi G., et al. The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia* // *Physiologia Plantarum*. – 1993. – Vol. 87, № 2. – P. 223-226.

9. Fang G., et al. Research progress on physiological, biochemical, and molecular mechanisms of potato in response to drought and high temperature // *Horticulturae*. – 2024. – Vol. 10, № 8. – P. 827.

10. Sharma A., et al. Nitric oxide-mediated regulation of oxidative stress in plants under metal stress: a review on molecular and biochemical aspects // *Physiologia Plantarum*. – 2020. – Vol. 168, № 2. – P. 318-344.

11. Han Q.Q., et al. Beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) augments salt tolerance of white clover // *Frontiers in Plant Science*. – 2014. – Vol. 5. – P. 525.

12. Singh A.K., et al. Genome-wide organization and expression profiling of the NAC transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.) // *DNA Research*. – 2013. – Vol. 20, № 4. – P. 403-423.

13. Çelik S. Gene expression analysis of potato drought-responsive genes under drought stress in potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars // *PeerJ*. – 2024. – Vol. 12. – P. e17116.

14. Kanat R., et al. Gene expression analysis for drought tolerance in early stage of potato plant development // *Biology*. – 2024. – Vol. 13, № 11. – P. 857.

15. Moon K.B., et al. Transcriptome profiling and characterization of drought-tolerant potato plant (*Solanum tuberosum* L.) // *Molecules and Cells*. – 2018. – Vol. 41, № 11. – P. 979-992.

16. 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, № 4. – P. 402-408.

17. Bustin S.A., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // *Clinical Chemistry*. – 2009. – Vol. 55, № 4. – P. 611-622.

18. Czechowski T., et al. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 139, № 1. – P. 5-17.

19. Tang X., et al. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress // *Plant Methods*. – 2017. – Vol. 13, № 1. – P. 85.

20. Brunner A.M., Yakovlev I.A., Strauss S.H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies // *BMC Plant Biology*. – 2004. – Vol. 4. – P. 14.

21. Jian B., et al. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR // BMC Molecular Biology. – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 59.
22. Nicot N., et al. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // Journal of Experimental Botany. – 2005. – Vol. 56, № 421. – P. 2907-2914.
23. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15, № 3.
24. Michel B.E., Kaufmann M.R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000 // Plant Physiology. – 1973. – Vol. 51, № 5. – P. 914-916.
25. Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents // Biochemical Society Transactions. – 1983. – Vol. 11. – P. 591-592.
26. Шлык А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – Т. 19, № 1. – С. 154-1.
27. Peng Zhen P.Z., et al. An efficient approach to identify salt tolerance of upland cotton at seedling stage. – 2014.
28. Dilnur T., et al. Association analysis of salt tolerance in Asiatic cotton (*Gossypium arboreum*) with SNP markers // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, № 9. – P. 2168.
29. Havir E.A., McHale N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves // Plant Physiology. – 1987. – Vol. 84, № 2. – P. 450-455.
30. Аргумбаева А., et al. Сравнительный анализ физиологических реакций проростков картофеля на осмотический стресс различной интенсивности // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2025. – № 3. – С. 156-164.
31. Kalendar R. Comprehensive web-based platform for advanced PCR design, genotyping, synthetic biology, molecular diagnostics, and sequence analysis // Molecular Therapy – Nucleic Acids. – 2025. – Vol. 36, № 4.
32. Fischer R., Maurer R. Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses // Australian Journal of Agricultural Research. – 1978. – Vol. 29, № 5. – P. 897-912.
33. Ltaief S., Krouma A. Functional dissection of the physiological traits promoting durum wheat (*Triticum durum* Desf.) tolerance to drought stress // Plants. – 2023. – Vol. 12, № 7. – P. 1420.
34. Wang G. Agricultural drought in a future climate: results from 15 global climate models participating in the IPCC 4th assessment // Climate Dynamics. – 2005. – Vol. 25, № 7. – P. 739-753.
35. Im J.S., et al. Salt tolerance and proline accumulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) in vitro plants to NaCl treatment // Journal of Plant Biotechnology. – 2015. – Vol. 42, № 2. – P. 129-134.
36. Murshed R., et al. Using growth parameters for in-vitro screening of potato varieties tolerant to salt stress. – 2018.
37. Gopal J., Iwama K. In vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol // Plant Cell Reports. – 2007. – Vol. 26, № 5. – P. 693-700.
38. Mawia R., et al. Impact of sorbitol-induced osmotic stress on some biochemical traits of potato in vitro // Iraqi Journal of Agricultural Sciences. – 2020. – Vol. 51, № 4. – P. 1038.
39. Wellpott K., et al. Liquid in vitro culture system allows gradual intensification of osmotic stress in *Solanum tuberosum* through sorbitol // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2024. – Vol. 157, № 1. – P. 12.

REFERENCE

- Hanász A., et al. Responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) breeding lines to osmotic stress induced in in vitro shoot culture // Horticulturae. – 2022. – Vol. 8, № 7. – P. 591.
- Hu X.-y., et al. A comparative review of the potato industries in China and India // Potato Research. – 2025. – P. 1-24.
- Sutula M., et al. Molecular mechanisms underlying defense responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) to environmental stress and CRISPR/Cas-mediated engineering of stress tolerance // Plants. – 2025. – Vol. 14, № 13. – P. 1983.
- Sajid Z.A., Aftab F. Improvement of polyethylene glycol, sorbitol, mannitol, and sucrose-induced osmotic stress tolerance through modulation of the polyamines, proteins, and superoxide dismutase activity in potato // International Journal of Agronomy. – 2022. – Vol. 2022, № 1. – P. 5158768.
- Azad N., et al. Physiological mechanism of salicylic acid in *Mentha pulegium* L. under salinity and drought stress // Brazilian Journal of Botany. – 2021. – Vol. 44, № 2. – P. 359-369.
- Al-Khayri J., Al-Bahrany A. Growth, water content, and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm // Biologia Plantarum. – 2004. – Vol. 48, № 1. – P. 105-108.
- Barraza A., Sánchez F. Trehalases: a neglected carbon metabolism regulator? // Plant Signaling & Behavior. – 2013. – Vol. 8, № 7. – P. e24778.
- Bianchi G., et al. The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia* // Physiologia Plantarum. – 1993. – Vol. 87, № 2. – P. 223-226.
- Fang G., et al. Research progress on physiological, biochemical, and molecular mechanisms of potato in response to drought and high temperature // Horticulturae. – 2024. – Vol. 10, № 8. – P. 827.
- Sharma A., et al. Nitric oxide-mediated regulation of oxidative stress in plants under metal stress: a review on molecular and biochemical aspects // Physiologia Plantarum. – 2020. – Vol. 168, № 2. – P. 318-344.
- Han Q.Q., et al. Beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) augments salt tolerance of white clover // Frontiers in Plant Science. – 2014. – Vol. 5. – P. 525.

- Singh A.K., et al. Genome-wide organization and expression profiling of the NAC transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.) // *DNA Research*. – 2013. – Vol. 20, № 4. – P. 403-423.
- Çelik S. Gene expression analysis of potato drought-responsive genes under drought stress in potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars // *PeerJ*. – 2024. – Vol. 12. – P. e17116.
- Kanat R., et al. Gene expression analysis for drought tolerance in early stage of potato plant development // *Biology*. – 2024. – Vol. 13, № 11. – P. 857.
- Moon K.B., et al. Transcriptome profiling and characterization of drought-tolerant potato plant (*Solanum tuberosum* L.) // *Molecules and Cells*. – 2018. – Vol. 41, № 11. – P. 979-992.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method // *Methods*. – 2001. – Vol. 25, № 4. – P. 402-408.
- Bustin S.A., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // *Clinical Chemistry*. – 2009. – Vol. 55, № 4. – P. 611-622.
- Czechowski T., et al. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 139, № 1. – P. 5-17.
- Tang X., et al. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress // *Plant Methods*. – 2017. – Vol. 13, № 1. – P. 85.
- Brunner A.M., Yakovlev I.A., Strauss S.H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies // *BMC Plant Biology*. – 2004. – Vol. 4. – P. 14.
- Jian B., et al. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR // *BMC Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 59.
- Nicot N., et al. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // *Journal of Experimental Botany*. – 2005. – Vol. 56, № 421. – P. 2907-2914.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 15, № 3.
- Michel B.E., Kaufmann M.R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000 // *Plant Physiology*. – 1973. – Vol. 51, № 5. – P. 914-916.
- Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents // *Biochemical Society Transactions*. – 1983. – Vol. 11. – P. 591-592.
- Shlyk A. Opreddeniye khlorofillov i karotinoidov v ekstraktakh zelenykh list'yev // *Biochemical methods in plant physiology*. Moscow: Science. – 1971. – T. 19, № 1. – C. 154-161. [in Russian]
- Peng Zhen P.Z., et al. An efficient approach to identify salt tolerance of upland cotton at seedling stage. – 2014.
- Dilnur T., et al. Association analysis of salt tolerance in Asiatic cotton (*Gossypium arboreum*) with SNP markers // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 9. – P. 2168.
- Havir E.A., McHale N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves // *Plant Physiology*. – 1987. – Vol. 84, № 2. – P. 450-455.
- Argumbayeva A., Kali B.R., Abeuova L.S., Nasiyev B.N., Manabayeva S.A. Sravnitel'nyy analiz fiziologicheskikh reaktsiy prorostkov kartofelya na osmoticheskiy stress razlichnoy intensivnosti // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. – 2025. – № 3. – C.156-164. [in Russian]
- Kalendar R. Comprehensive web-based platform for advanced PCR design, genotyping, synthetic biology, molecular diagnostics, and sequence analysis // *Molecular Therapy – Nucleic Acids*. – 2025. – Vol. 36, № 4.
- Fischer R., Maurer R. Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses // *Australian Journal of Agricultural Research*. – 1978. – Vol. 29, № 5. – P. 897-912.
- Ltaief S., Krouma A. Functional dissection of the physiological traits promoting durum wheat (*Triticum durum* Desf.) tolerance to drought stress // *Plants*. – 2023. – Vol. 12, № 7. – P. 1420.
- Wang G. Agricultural drought in a future climate: results from 15 global climate models participating in the IPCC 4th assessment // *Climate Dynamics*. – 2005. – Vol. 25, № 7. – P. 739-753.
- Im J.S., et al. Salt tolerance and proline accumulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) in vitro plants to NaCl treatment // *Journal of Plant Biotechnology*. – 2015. – Vol. 42, № 2. – P. 129-134.
- Murshed R., et al. Using growth parameters for in-vitro screening of potato varieties tolerant to salt stress. – 2018.
- Gopal J., Iwama K. In vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol // *Plant Cell Reports*. – 2007. – Vol. 26, № 5. – P. 693-700.
- Mawia R., et al. Impact of sorbitol-induced osmotic stress on some biochemical traits of potato in vitro // *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*. – 2020. – Vol. 51, № 4. – P. 1038.
- Wellpott K., et al. Liquid in vitro culture system allows gradual intensification of osmotic stress in *Solanum tuberosum* through sorbitol // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2024. – Vol. 157, № 1. – P. 12.

АСТАНАЛЫҚ КАРТОП СҰРЫПЫНЫҢ ОСМОСТЫҚ СТРЕССКЕ ЖАУАБЫНЫҢ ФИЗИОЛОГИЯЛЫҚ-БИОХИМИЯЛЫҚ ЖӘНЕ МОЛЕКУЛАЛЫҚ СИПАТТАМАСЫ

Аргумбаева А.К.^{1,3}, Қали Б.Р.¹, Абеуова Л.С.¹, Насиев Б.Н.³, Манабаева Ш.А.^{1,2,3*}

¹ Ұлттық биотехнология орталығы, Қорғалжын тасжолы, 13/5, Астана қ., 010000, Қазақстан

² Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қ. Сәтбаев көшесі, 2, Астана қ., 010000, Қазақстан

³ Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан аграрлық-техникалық университеті, Жәңгір хан көшесі, 51, Орал қ., 090009, Қазақстан

Корреспондент-автор: manabayeva@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Климаттың өзгеруі және ауа-райының күрт өзгеруі картоптың су тапшылығы мен осмотық стресске төзімділік механизмдерін зерттеу қажеттілігін тудырады. Зерттеудің мақсаты әртүрлі осмотық агенттердің әсеріне Астаналық картоп сұрыпының физиологиялық-биохимиялық және молекулалық реакцияларын бағалау болды. Өсімдіктер ПЭГ-6000, сорбитол және NaCl әсеріне ұшырады, содан кейін жапырақтар мен тамырлардағы хлорофилл мен малондальдегидтің (МДА) мөлшері, каталаза (КАТ) белсенділігі және *StuNAC*, *TRE* және *OST2* гендерінің экспрессия деңгейлері анықталды. Стресс жауабы осмотық агенттің табиғаты мен өсімдік ұлпасының түріне байланысты өзгеретіні анықталды. Хлорофилл мөлшерінің статистикалық тұрғыдан маңызды төмендеуі тек 8% ПЭГ-6000 әсерінен байқалды. Бұл жағдайда МДА мөлшері ең жоғары мәнге – 12,08 нмоль/г жетіп, бақылау деңгейінен 60%-ға жоғары болды. КАТ белсенділігінің ең айқын жоғарылауы 75 mM NaCl әсерінен байқалып, бақылаумен салыстырғанда 46,9%-ға артты. 8% ПЭГ-6000 әсері тамырларда *StuNAC*, *TRE* және *OST2* гендері экспрессиясының ең жоғары деңгейде индукциясын тудырды: олардың экспрессия деңгейлері сәйкесінше 3,31, 3,24 және 2,89 есе өсті. Зерттелген гендердің экспрессия деңгейлері мен КАТ белсенділігі арасында тығыз оң корреляция анықталды. Алынған нәтижелер картоптың Астаналық сұрыпының әртүрлі осмотық агенттерге дифференциалды және ұлпаға тән жауап беретінін көрсетеді және картоптың стресс жағдайларына төзімділігін кешенді бағалауда пайдаланылуы мүмкін.

Түйін сөздер: *Solanum tuberosum* L., Астаналық сұрыпы, *in vitro*, ПЭГ-6000, сорбитол, NaCl, хлорофилл, каталаза, малондальдегид, ген экспрессиясы

PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL, AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE RESPONSE OF POTATO CULTIVAR ASTANALYK TO OSMOTIC STRESS

Argumbayeva A.K.^{1,3}, Kali B.R.¹, Abeuova L.S.¹, Nasiev B.N.³, Manabayeva Sh.A.^{1,2,3*}

¹ National Center for Biotechnology, 13/5, Korgalzhyn Hwy., Astana 010000, Kazakhstan

² L.N. Gumilyov Eurasian National University, Satpayev st. 2, Astana 010000, Kazakhstan

³ West Kazakhstan Agro-Technical University named after Zhangir Khan, Zhangir khan street 51, Oral, 090009, Kazakhstan

Corresponding author: *manabayeva@biocenter.kz

ABSTRACT

Climate change and the increasing frequency of extreme weather events highlight the need to investigate the mechanisms underlying potato tolerance to water deficit and osmotic stress. This study aimed to evaluate the physiological, biochemical, and molecular responses of potato cultivar Astanalk to different osmotic agents. Plants were exposed to PEG-6000, sorbitol, and NaCl, after which chlorophyll and malondialdehyde (MDA) contents, catalase (CAT) activity, and the expression levels of the *StuNAC*, *TRE*, and *OST2* genes were determined in leaves and roots. The stress response varied depending on the type of osmotic agent and tissue. A statistically significant decrease in chlorophyll content was observed only under 8% PEG-6000 treatment. Under this treatment, MDA content reached its maximum value of 12.08 nmol/g, which was 60% higher than the control. The most pronounced increase in CAT activity was observed under 75 mM NaCl treatment, reaching 46.9% above the control level. Treatment with 8% PEG-6000 induced the highest expression of *StuNAC*, *TRE*, and *OST2*, particularly in roots, where their expression levels increased 3.31-, 3.24-, and 2.89-fold, respectively. A strong positive correlation was observed between the expression levels of the investigated genes and CAT activity. These results demonstrate a differential and tissue-specific response of potato cultivar Astanalk to different osmotic agents and may contribute to the comprehensive assessment of potato stress tolerance.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., cultivar Astanalk, *in vitro*, PEG-6000, sorbitol, NaCl, chlorophyll, catalase, malondialdehyde, gene expression.