



ЧАСТЬ

II

**ОБЩЕСТВО
ФИЗИОЛОГОВ
РАСТЕНИЙ РОССИИ**

**ГОДИЧНОЕ
СОБРАНИЕ**

**СБОРНИК
МАТЕРИАЛОВ
(В ДВУХ ЧАСТЯХ)
ВСЕРОССИЙСКОЙ
НАУЧНОЙ
КОНФЕРЕНЦИИ С
МЕЖДУНАРОДНЫМ
УЧАСТИЕМ И
ШКОЛЫ МОЛОДЫХ
УЧЕНЫХ**

**МЕХАНИЗМЫ
УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ
И МИКРООРГАНИЗМОВ К
НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ
УСЛОВИЯМ СРЕДЫ**

Иркутск,
10 - 15 июля 2018 г.



**Federal Agency for Scientific Organizations
Russian Academy of Sciences
Siberian Branch of Russian Academy of Sciences
Russian Society of Plant Physiologists
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of SB RAS
K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS**

*Annual Meeting
Society of Plant Physiologists of Russia*

**Mechanisms of resistance of plants and
microorganisms to unfavorable
environmental**

**Book of Proceedings (in two parts)
of the All-Russian Scientific Conference with International
Participation and Schools of Young Scientists
(Irkutsk, July 10–15, 2018)**

PART II

Irkutsk-2018

Федеральное агентство научных организаций
Российская академия наук
Сибирское отделение Российской академии наук
Общество физиологов растений России
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН



*Годичное собрание
Общества физиологов растений России*

Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды

**Сборник материалов (в двух частях)
Всероссийской научной конференции
с международным участием и школы молодых ученых
(Иркутск, 10–15 июля 2018 г.)**

ЧАСТЬ II

Иркутск-2018

УДК 581.1:581.5: 579.26

ББК 28.58:28.4

М55

Печатается по решению Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук

Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды: Сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых, Иркутск, 10–15 июля 2018 г. – Иркутск : Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2018. – В 2-х частях. Часть II. – 576 с.

ISBN 978-5-94797-324-2

Mechanisms of resistance of plants and microorganisms to unfavorable environmental: Book of Proceedings of the Annual Meeting Society of Plant Physiologists of Russia, All-Russian Scientific Conference with International Participation and Schools of Young Scientists, Irkutsk, July 10–15, 2018. – In 2 parts. Part II. – 576 p.

В сборнике представлены материалы Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды», состоявшейся 10–15 июля 2018 г. в г. Иркутске. В данном издании приведены новейшие результаты российских и зарубежных ученых, посвященные современным исследованиям механизмов физиолого-биохимических защитных реакций организмов на воздействие абиотических и биотических факторов, а также изучению этих механизмов на генетическом уровне. Приводятся данные по влиянию техногенного загрязнения на физиологические процессы растений и микроорганизмов. Большое внимание уделяется вопросам биотехнологии с использованием растений и микроорганизмов.

Книга предназначена для специалистов в области физиологии и биохимии стресса, молекулярной биологии, генетики и экологии, а также для студентов и аспирантов биологических специальностей высших учебных заведений.

Издание сборника осуществлено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18-04-20032_г.

Ответственный редактор: д.б.н., проф. В.К. Войников

Редакционная коллегия: д.б.н. О.И. Грабельных, к.б.н. Т.В. Копытина, д.б.н. Л.Е. Макарова, д.б.н. Т.П. Побежимова, к.б.н. И.В. Федосеева, к.б.н. М.В. Иванова

Рецензенты: д.б.н., проф. И.Э. Илли

к.б.н. А.А. Батраева

© Коллектив авторов, 2018

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, 2018

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 2018

© Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2018

ISBN 978-5-94797-324-2

**СЕКЦИЯ 2.
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМОВ**

ЗНАЧЕНИЕ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ В ПЕРЕСТРОЙКАХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА *ARABIDOPSIS THALIANA*

В.И. Бельков, Е.Ю. Гарник, Ю.М. Константинов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *anvad.irk@rambler.ru*

Аннотация. Работа посвящена анализу данных о структуре суперкомплексов тилакоидной мембраны *Arabidopsis thaliana*. Рассматривается механизм перемещения подвижного участка светособирающих антенн, сформированных белками ЛНСII (state transitions), и обсуждается возможная роль сигналов, опосредуемых фоторецепторами синего и красного/дальнекрасного света (криптохромами и фитохромами) в регуляции этого процесса.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, фоторецепторы, хлоропласты, светособирающий комплекс II, фотосинтетический аппарат

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-886-888

Первичное построение фотосинтетического аппарата происходит при прорастании растений в процессе фотоморфогенеза и регулируется пигмент-белковыми комплексами, фоторецепторами [Han et al., 2017]. Большую роль в этом процессе играют фоторецепторы красного/дальнекрасного (фитохромы PHYA и PHYB) и синего (криптохромы CRY1 и CRY2) света. Сигналы, опосредуемые фоторецепторами, влияют на работу фотосинтетического аппарата растений. Установлено, что фотосистема I (ФСI) чувствительна к красному и дальнекрасному свету, в то время как фотосистема II (ФСII) – к синему. Возбужденные молекулы фитохромов и криптохромов способны взаимодействовать с ядерными транскрипционными факторами семейства PIF (phytochrom interaction factor), изменяя экспрессию ядерных генов группы LHC (light-harvesting complex) [Klein et al., 2007; Ma et al., 2016; Kreslavski et al., 2017].

Мобильный светособирающий комплекс ЛНСII локализован на мембране тилакоидов и способен взаимодействовать лишь с одной фотосистемой в зависимости от условий освещенности, что в литературе описывается как state transitions [Goldschmidt-Clermont, Bassi, 2015]. Физиологический смысл этого процесса заключается во временном перераспределении белков антенн светособирающих комплексов в хлоропластах при нарушении скорости потока электронов по электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) вследствие более активной работы одной из фотосистем. Процесс state transitions состоит из двух посменных стадий (Стадии 1 и Стадии 2). При Состоянии 1 локализованные в мембране белки светособирающего комплекса ЛНСII (светособирающая антенна), связанные с ФСII, подвергаются фосфорилированию протеинкиназой STN7 [Longoni et al., 2015]. При фосфорилировании ЛНСII этот комплекс белков отсоединяется от ФСII и переносится на ФСI, повышая ее способность к светоабсорбции (Состояние 2). В результате этого достигается более равномерное распределение электронов по ЭТЦ при данных условиях освещенности [Caffari et al., 2014].

Механизм, приводящий к state transitions, непосредственно связан с передачей внутриклеточных сигналов. Установлено, что в регуляции этого процесса участвуют сигналы, поступающие при изменении редокс-состояния пула пластохинонов хлоропластов (PQ-пула). PQ-пул располагается между ФСI и комплексом цитохромов b6/f, имеет окисленное состояние в темноте и восстанавливается на свету, получая электроны преимущественно от ФСII [Caffari et al., 2014; Garab, 2014]. Когда ФСII

работает более активно, чем ФСІ, пул пластохинонов становится восстановленным за счет загруженности электрон-транспортной цепи хлоропластов (ЭТЦ). В результате образуется сигнал, который передается на мембраносвязанную киназу – state transition 7 (STN7) [Chi et al., 2013]. После чего STN7 отделяется от мембраны и фосфорилирует ЛНСІІ, связанный с ФСІІ. Как только PQ-пул возвращается в окисленное состояние и STN7 деактивируется, комплекс ФСІ-ЛНСІІ распадается под действием протеинфосфатазы PPH1/TAP38, что приводит к возвращению системы к Состоянию 1 (и взаимодействию ЛНСІІ с ФСІІ) [Dietzel et al., 2008; Chi et al., 2013].

Таким образом, в реальной ситуации каждая из фотосистем объединена с соответствующим светособирающим комплексом (ЛНСІ, ЛНСІІ), причем если ЛНСІ всегда присоединен к ФСІ, то в случае ЛНСІІ часть антенны может мигрировать от ФСІІ к ФСІ в зависимости от условий освещенности.

Объединение основных белков реакционного центра фотосистемы (core, С) с внешней антенной светособирающего комплекса называется суперкомплексом [Gao et al., 2018].

Известно о структуре внешних антенн светособирающих комплексов, их физическом расположении и устройстве относительно реакционных центров. Комплекс ЛНСІІ у арабидопсиса состоит из тримеров, которые соединяются с ФСІІ посредством мономерных субъединиц [Nosek et al., 2017]. Выделяют 2 основных типа тримеров белков ЛНС, взаимодействующих с основными белками фотосистемы (core): S (strong affinity) и M (medium affinity). Определена структура суперкомплексов следующих типов: C2S, C2M, C2S2, C2SM, C2S2M, C2S2M2 [Pagliano et al., 2014]. Выявление суперкомплексов дает возможность наблюдать перемещение мобильной части ЛНСІІ в процессе state transitions.

Остается открытым вопрос: принимают ли участие фоторецепторы в регуляции state transitions. Поскольку нет никаких данных о структуре суперкомплексов у мутантов *phyA*, *phyB*, *cry1*, *cry2* при state transitions, проведение соответствующих исследований поспособствует пониманию роли внутриклеточных сигналов, передаваемых с участием фоторецепторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00800.

Литература

Caffarri S., Tibiletti T., Jennings R., Santabarbara S. A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning // *Current Protein and Peptide Science*. – 2014. – V. 15. – P. 296–331.

Chi W., Sun X., Zhang L. Intracellular signaling from plastid to nucleus // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2013. – V. 64. – P. 10.1–10.24.

Dietzel L., Brautigam K., Pfannschmidt T. Photosynthetic acclimation: state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry – functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants // *FEBS Journal*. – 2008. – V. 275. – P. 1080–1088.

Gao J., Wang H., Yuan Q., Feng Y. Structure and function of the photosystem supercomplexes // *Frontiers in Plant Science*. – 2018 – V. 9. – Article No. 357. – P. 1–7.

Garab G. Hierarchical organization and structural flexibility of thylakoid membranes // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. – V. 1837. – P. 481–494.

Goldschmidt-Clermont M., Bassi R. Sharing light between two photosystems: mechanism of state transitions // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2015. – V. 25. – P. 71–78.

Han X., Tohge T., Laior P. et al. Phytochrome A and B regulate primary metabolism in *Arabidopsis* leaves in response to light // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – V. 8. – Article 1394.

Klein T., Kindgren P., Benedict C. et al. Genome-wide gene expression analysis reveals a critical role for CRYPTOCHROME1 in the response of *Arabidopsis* to high irradiance // *Plant Physiology*. – 2007. – V. 144. – P. 1391–1406.

Kreslavski V., Kosobryukhov A., Schmitt F-J. et al. Photochemical activity and the structure of chloroplasts in *Arabidopsis thaliana* L. deficient in phytochrome A and B // *Protoplasma*. – 2017 – V. 254. – P. 1283–1293.

Longoni P., Douchi D., Cariti F. et al. Phosphorylation of the light-harvesting complex II isoform Lhcb2 is central to state transitions // *Plant Physiology*. – 2015. – V. 169. – P. 2874–2883.

Ma D., Li X., Guo Y. et al. Cryptochrome 1 interacts with PIF4 to regulate high temperature-mediated hypocotyl elongation in response to blue light // *PNAS*. – 2016. – V. 113, No. 1. – P. 224–229.

Nosek L., Semchonok D., Boekema E. et al. Structural variability of plant photosystem II megacomplexes in thylakoid membranes // *The Plant Journal*. – 2017. – V. 89. – P. 104–111.

Pagliano C., Nield J., Marsano F. et al. Proteomic characterization and three-dimensional electron microscopy study of PSII-LHCII supercomplexes from higher plants // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. – V. 1837. – P. 1454–1462.

SIGNIFICANCE OF PHOTORECEPTORS IN STATE TRANSITIONS IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

V.I. Belkov, E.Yu. Garnik, Yu.M. Konstantinov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, anvad.irk@rambler.ru

Abstract. The thesis is devoted to analysis of data concerning supercomplexes thylakoid membrane structure of *Arabidopsis thaliana*. The mechanism of redislocation of the mobile part of the light-absorbing antennas formed by LHCII proteins (state transitions) is considered, and the possible role of signals mediated by photoreceptors of blue and red/far-red light (cryptochromes and phytochromes) in the regulation of this process is discussed.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, photoreceptors, chloroplasts, light-harvesting complex II, photosynthetic apparatus

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ И СТРЕССОВЫЕ БЕЛКИ АРАБИДОПСИСА, У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ «ВНЕШНЕЙ» NADH-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ (*NDB2*)

Г.Б. Боровский¹, М.Б. Бороздина², А.И. Катышев¹, Н.Е. Коротаева¹, И.В. Федосеева¹, А.В. Федяева¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, borovskii@sifibr.irk.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

Аннотация. Впервые проведено исследование влияния гиперэкспрессии гена *ndb2* у арабидопсиса на экспрессию генов и содержание белков энергорассеивающих систем митохондрий, стрессовых белков и других генов. Оказалось, что уровень экспрессии ряда генов семейств *aox*, *ucp*, *ndb*, *nda* и *hsp* существенно возрастает с увеличением экспрессии *ndb2*. Часть изменений в экспрессии генов сказывалась на уровне соответствующих белков. Изменилось также количество АФК, генерируемых в клетке, в контрольных условиях и после гипертермии.

Ключевые слова: арабидопсис, стрессовые белки, митохондрии, внешняя NADH-дегидрогеназа *ndb2*, экспрессия генов

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-889-892

Кодируемая геном *ndb2* арабидопсиса NAD(P)H-дегидрогеназа является одним из компонентов альтернативного дыхательного пути, играющего существенную роль в таких физиологических процессах как термогенез, регуляция уровня активных форм кислорода (АФК) и энергетического баланса в клетках растений [Park et al., 2012]. У арабидопсиса компоненты энергорассеивающих митохондриальных систем кодируются несколькими небольшими семействами генов, такими как гены NAD(P)H-дегидрогеназ II типа (*nda1-2*, *ndb1-4* и *ndc1*), альтернативных оксидаз (*aox1a-d*, *aox2*) и разобщающих белков (*ucp1-3*) [Park et al., 2012]. NAD(P)H-дегидрогеназы II типа могут быть локализованы на внешней (NDB1-4) или внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны (NDA1-2, NDC1), в соответствии с этим, они подразделяются на внешние и внутренние NDII. Согласно данным литературы, для эффективного окисления NAD(P)H митохондриального матрикса и цитозоля достаточно экспрессии генов *nda2*, *ndb2* и *aox1*, которая меняется координированно в различных условиях, в то время как экспрессия генов *ndc1* и *nda1* изменяется при этом противоположным образом. Экспрессия генов *ucp1* и *ucp2* не координирована в большинстве случаев с экспрессией генов NDII и альтернативной оксидазы [Elhafez et al., 2006]. Суммируя имеющиеся на текущий момент литературные данные, можно утверждать, что гены *aox1a*, *ndb2*, *nda2* играют наиболее значимую роль в клетках растений арабидопсиса в различных стрессовых условиях.

Трансгенные растения арабидопсиса с гиперэкспрессией *ndb2* были получены нами с использованием конструкции, описанной ранее [Савчин и др., 2017]. С помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) был исследован уровень экспрессии целевого гена в полученных нами трансгенных растениях арабидопсиса. В двух линиях трансформированных растений количество транскрипта гена *ndb2* примерно в 2 раза превышало соответствующие показатели в контрольных растениях (рис. 1).

Первоочередный интерес представляло выяснение возможной координации экспрессии генов, кодирующих компоненты альтернативного пути дыхания, в растениях арабидопсиса в контрольных условиях. Было показано, что при увеличении

уровня экспрессии гена *ndb2* в растениях арабидопсиса наблюдается достоверное увеличение экспрессии генов, кодирующих одну из внутренних NAD(P)H дегидрогеназ *nda2*, альтернативные оксидазы *aox1a*, *aox1d*, *aox1b* и разобщающие белки *ucp1*, *ucp2*, *ucp3* (рис. 2). Если увеличение экспрессии генов *nda2* и *aox1a* было ожидаемо, то возрастание экспрессии генов *aox1d*, *aox1b* и *ucp1-3* при повышении экспрессии гена *ndb2* показано впервые.

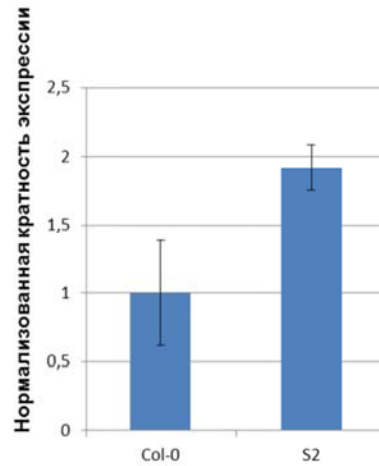


Рис. 1. Сравнительный анализ количества мРНК гена *ndb2* в контрольных и трансгенных растениях с повышенной экспрессией данного гена.

С точки зрения связи альтернативных путей транспорта электронов с устойчивостью, важно также, что в контрольных условиях гиперэкспрессия гена *ndb2* вызывает рост количества транскриптов отдельных стрессовых генов, кодирующих белки теплового шока (*hsp17.6b* – в 9 раз, *hsp17.7* – в 3 раза, *hsp101* – в 3,5 раза), что также продемонстрировано впервые (данные не представлены).

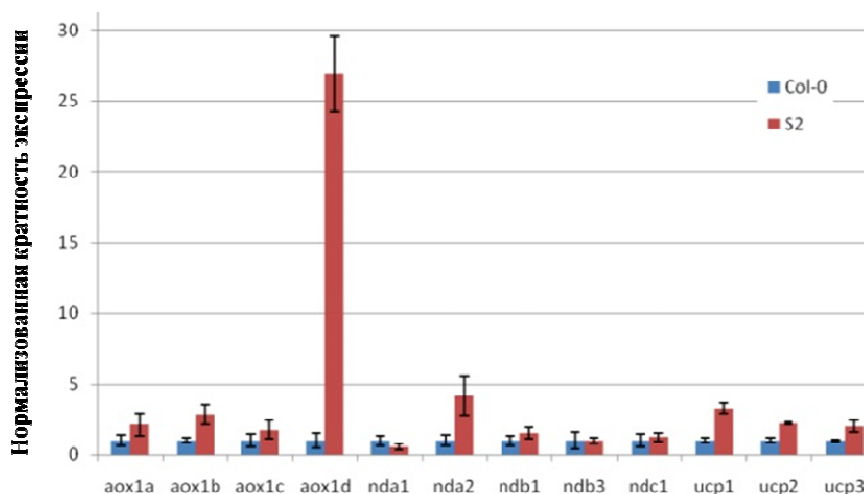


Рис. 2. Сравнительный анализ количества мРНК генов, кодирующих альтернативные NADH-дегидрогеназы, альтернативные оксидазы и разобщающие белки, в контрольных растениях и растениях-гиперэкспрессорах *ndb2*.

Интересно было исследовать, влияет ли изменение экспрессии *ndb2* на экспрессию генов, кодирующих компоненты основного дыхательного пути

митохондрий. Гены, кодирующие отдельные субъединицы дыхательных комплексов, представлены как в ядерном, так и в митохондриальном геномах. Количество транскриптов ядерных генов, кодирующих субъединицы митохондриальных дыхательных комплексов (CA2, Nd-F, *sdh1-1*, MPP-beta, CytC2, *CoxVc*, *CoxX2-1* и *Atp3*), в контрольных условиях в растениях линии арабидопсиса с повышенной экспрессией *ndb2* достоверно не изменялось (данные не представлены). В то же время в исследуемых растениях был увеличен уровень экспрессии ряда митохондриальных генов, таких как *nadb*, *cox1*, *matR*, *orf153a* и *cob* (данные не представлены).

Также был проведен предварительный анализ изменений в содержании некоторых митохондриальных (NDB и AOX) и стрессовых (HSP101, HSP17.7, HSP70) белков у растений-гиперэкспрессоров *ndb2*. Данные показали изменения в содержании некоторых исследованных белков по сравнению с диким типом растений арабидопсиса в контрольных условиях и после теплового шока (рис. 3). Мы полагаем, что это может быть связано со сниженным уровнем генерации АФК в растениях с гиперэкспрессией *ndb2* (данные не представлены) и привести к изменениям в базовой и индуцированной устойчивости к различным стрессам.

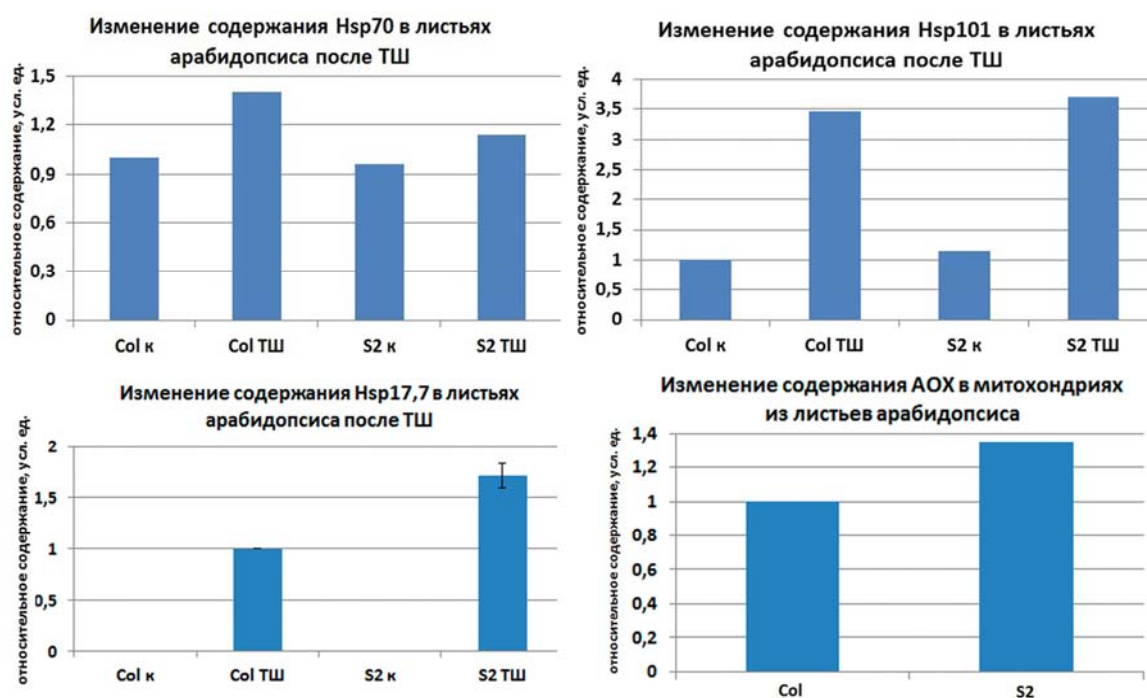


Рис. 3. Сравнительный анализ содержания белков Hsp70, Hsp101 и Hsp17,7 в контрольных условиях и после теплового шока (45 °С, 1 час), а также белка альтернативной оксидазы (АОХ) в гиперэкспрессорах *ndb2* (S2) и растениях исходного типа (Col) по данным вестерн-блоттинга.

Исследования роли генов NDI с использованием трансгенных растений со сниженной или повышенной экспрессией начаты относительно недавно [Smith et al., 2011; Wallstrom et al., 2014]. В работе [Smith et al., 2011] показано, что снижение экспрессии гена *ndb4* в трансгенных растениях арабидопсиса приводит к повышению экспрессии генов *ndb2* и *aox1a*, что, в свою очередь, приводит к снижению уровня генерации активных форм кислорода в клетках растений и повышенной устойчивости к солевому стрессу.

Снижение уровня генерации АФК вследствие высокого уровня экспрессии гена *ndb2* позволяет сделать вывод о том, что это белок может играть важную роль и в

реализации клеточных механизмов ответа на воздействие других стрессовых факторов. Показанная нами координация экспрессии *ndb2* с генами семейств *aox* и *ucp* в контрольных условиях демонстрирует значительное влияние активности наружной NADH-дегидрогеназы на активность других энергорассеивающих систем митохондрий растений, а также вероятное воздействие уровня экспрессии данного гена на генерацию АФК и устойчивость клеток к температурному стрессу.

Работа была поддержана грантами РФФИ 17-54-45090 и DST INT/RUS/RFBR/P-260. Работа выполнена с использованием коллекций ЦКП «Биоресурсный Центр» СИФИБР СО РАН и приборов ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

Савчин Д.В., Кузмицкая П.В., Урбанович О.Ю., Федосеева И.В., Боровский Г.Б. Создание трансгенных растений *Nicotiana tabacum* с геном *ndb2 Arabidopsis thaliana* для изучения ответа на стресс // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бiял. навук. – 2017. – № 1. – С. 54–61.

Elhafez D., Murcha M.W., Clifton R., Soole K.L., Day D.A., Whelan J. Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis*: intraorganelle location and expression // Plant Cell Physiology. – 2006. – V. 47. – P. 43–54.

Park B.S., Kim S.-I., Song J.T., Seo H.S. Arabidopsis SIZ1 positively regulates alternative respiratory bypass pathways // BMB Reports. – 2012. – V. 45. – P. 342–347.

Smith C., Barthet M., Melino V., Smith P., Day D., Soole K. Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress // Plant Cell Physiology. – 2011. – V. 52. – P. 1222–1237.

Wallstrom S.V., Florez-Sarasa I., Araujo W.L., Escobar M.A., Geisler D.A., Aidemark M., Lager I., Fernie A.R., Ribas-Carbo M., Rasmusson A.G. Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport // Plant Cell Physiology. – 2014. – V. 55. – P. 881–896.

EXPRESSION OF GENES, CODING MITOCHONDRIAL AND HEAT SHOCK PROTEINS OF ARABIDOPSIS IN TRANSGENIC PLANTS WITH HYPEREXPRESSION OF "EXTERNAL" NADH-DEHYDROGENASE (*NDB2*)

G.B. Borovskii¹, M.B. Borozdina², A.I. Katyshev¹, N.E. Korotaeva¹, I.V. Fedoseeva¹, A.V. Fedyayeva¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, borovskii@sifibr.irk.ru

²Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Abstract. For the first time the effect of overexpression of the *ndb2* gene in *Arabidopsis* on the expression of genes and proteins of other energy-dissipation mitochondrial systems, heat shock proteins and other genes were studied. It turned out that the expression level of a number of genes of the families *aox*, *ucp*, *ndb* and *nda* increased significantly, as did the expression of a number of *hsp* genes. Part of the changes in gene expression affected the level of the corresponding proteins. The amount of ROS generated in the cell under control conditions and after hyperthermia also changed.

Keywords: *arabidopsis*, *stress proteins*, *mitochondria*, *external NADH-dehydrogenase ndb2*, *gene expression*

ВЛИЯНИЕ КАРТОФЕЛЯ СОРТА «СКАРЬ», ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ГЕНОМ *GOX* ИЗ *PENICILLIUM FUNICULOSUM*, НА РАЗМНОЖЕНИЕ НЕПАТОГЕННОЙ БЕСПЛАЗМИДНОЙ БАКТЕРИИ *ESHERICHIA COLI* И ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* И *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS*

К.З. Гамбург, В.А. Быбин, Г.Б. Боровский, Ю.А. Маркова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, gamburg@sifibr.irk.ru

Аннотация. Трансгенные растения картофеля с геном *GOX* ингибировали размножение клеток непатогенной бактерии (*Esheria coli*) и фитопатогенных бактерий (*Pectobacterium carotovorum* и *Clavibacter michiganensis*). Патогенные бактерии были способны использовать вещества растения – хозяина в качестве дополнительного источника питания, что ускоряло размножение их клеток, в отличие от непатогенной бактерии, а наличие гена *GOX* у трансгенов препятствовало этому. *C. michiganensis* не передвигалась из части стебля с корнями, погруженной в бактериальную суспензию, в ту часть стебля, которая с ней не контактировала.

Ключевые слова: картофель, глюкозооксидаза, ген *GOX*, бактерии, *Clavibacter michiganensis*, *Esheria coli*, *Pectobacterium carotovorum*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-893-897

Первичной реакцией на воздействие патогенов на растения является резкий временный подъем содержания активных форм кислорода (в том числе и H_2O_2), который используется как сигнал для включения защитных механизмов [Baker and Orlandi, 1995]. Однако способность растений противостоять патогенезу за счет собственного синтеза H_2O_2 оказывается недостаточной. Увеличить интенсивность ее содержание можно за счет включения в геном растения генов синтеза H_2O_2 от других организмов, обладающих интенсивной ее продукцией. Такими организмами являются некоторые грибы, у которых для этого существует фермент – глюкозооксидаза и соответствующий ген для ее синтеза (ген *GOX*) (<https://ru.wikipedia.org/wiki/>). Этот ген под контролем конститутивных промоторов (CaMV S35, figwort mosaic virus 35S), включенный в геном растений, заставлял их продуцировать H_2O_2 в количествах, значительно превышающих собственные возможности растений [Wu et al., 1995, 1997; Савчин и др., 2012; Selvakumar et al., 2013]. Эти авторы показали, что трансформированные растения картофеля лучше противостояли грибным и бактериальным патогенам. Однако влияние трансформированных растений на сами бактерии и грибы пока изучено недостаточно.

Изучение взаимодействия бактерий и растений значительно удобнее проводить с использованием культуры *in vitro* [Orlikowska et al., 2017]. Поэтому мы провели изучение влияния культивируемых *in vitro* растений картофеля с геном *GOX* на бактерии.

Пробирочные растения были получены из клубней картофеля линии СК1, не подвергавшейся трансформации, линии РВ1, трансформированной пустым вектором и линий L17.2, M10.4, M7.3 и M8.3 с разной интенсивностью экспрессии гена *GOX*. Эти клубни были любезно предоставлены Институтом генетики и цитологии Академии Наук Беларуси. Получение трансгенных растений, их выращивание и размножение *in vitro* описаны в нашей предыдущей публикации [Grabelnych et al., 2017]. Изучалось влияние картофеля на бактерии *Esheria coli* (штамм XL1-Blue), *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum* (штамм B1247) и *Clavibacter michiganensis* subsp.

sepedonicus (штамм Ас1405), полученные из ВКМ ИБФМ РАН, г. Пущино.

Для оценки влияния растений на бактерии в лунки 96-луночных полистирольных планшетов вносили по 150 мкл бактериальной суспензии и 1 отрезок стебля картофеля длиной 3-4 мм, которые инкубировали в темноте при 26 °С 24-48 ч. Измерения плотности бактериальных суспензий и активности глюкозооксидазы проводились с использованием планшетного фотометра и спектрофотометра при длинах волн 595 (600) или 630 нм. Оценка активности глюкозооксидазы проводилась путем внесения в пенициллиновый флакон 4 мл бидистиллированной воды, 1 листа и 1 мл реактива, содержащего 50 мМ йодида калия, 1% крахмала, 200 мМ D-глюкозы и растительных объектов. В результате окисления глюкозы глюкозооксидазой образуется пероксид водорода, который окисляет йодид калия, что приводит к окрашиванию крахмала в синий цвет. Флаконы выдерживали на качалке при 23 °С 2 ч, после чего измеряли интенсивность окрашивания при 600 нм на спектрофотометре. Каждая линия использовалась в количестве 10-12 пробирочных растений. В таблицах приведены средние арифметические значения и стандартные отклонения. Опыты были проведены 2-3 раза.

Таблица 1.

Активность GOX в листьях растений перед началом опыта ($E_{600} \times 1000$)

	СК1	PBI	L17.2	M10.4	M8.3	M7.3	Среда*
	226±69	247±24	640±638	980±646	1692±944	2180±586	221±39
-среда	5	26	419	759	1471	1959	0
min – max	175-249	203-283	222-2486	251-2603	335-2295	853-2695	158-273

*среднее±стандартное отклонение

Данные табл. 1 показывают, что линии СК1 и PBI не обладали активностью GOX, а трансгенные линии имели эту активность. При этом линии M7.3 и M8.3 проявляли наибольшую активность. Следует отметить, что индивидуальные растения каждой линии значительно различались по способности окрашивать крахмал.

В таблице 2 видно, что линии, не имеющие гена глюкозооксидазы (СК1 и PBI), не угнетали размножение клеток бактерии *E. coli* по сравнению с контролем, что согласуется с данными по отсутствию у них активности глюкозооксидазы (табл. 1), тогда как линии, способные к образованию H₂O₂, угнетали.

Таблица 2.

Влияние отрезков стебля трансгенного картофеля на рост бактериальной суспензии *E. coli*. Поглощение при 660 нм x 1000

	СК1	PBI	L17.2	M7.3	M8.3	M10.4	Контроль
E_{600}	335±25	282±14	183±53	133±42	73±27	49±24	298±20
%	112	95	62	44	25	17	100

Использованный штамм *E. coli* не патогенен для картофеля. Поэтому следующий опыт был проведен с фитопатогенной бактерией *P. carotovorum*.

Таблица 3.

Влияние отрезков стебля трансгенного картофеля на рост бактериальной суспензии *P. carotovorum*. Поглощение при 660 нм x 1000

	СК1	PBI	L17.2	M7.3	M8.3	Контроль
E_{600}	621±92	588±50	543±70	383±50	458±83	414±14
%	150	142	131	92	113	100

Установлено (табл. 3), что контрольные линии (СК и РВ), не имеющие ген глюкозооксидазы, и линия L17.2 со слабой ее активностью оказывали стимулирующее влияние на размножение этого патогена, вероятно, за счет выделения из отрезков стебля картофеля питательных компонентов. У линий М7.3 и М8.3 с наиболее активной глюкозооксидазой такая стимуляция отсутствовала.

Далее, были проведены опыты с другой фитопатогенной бактерией – *S. michiganensis*, которая вызывает кольцевую гниль клубней картофеля и является карантинным патогеном для Иркутской области. Данные табл. 4 показывают, что линии СК1 и РВ1 оказывали стимулирующее действие на размножение этой бактерии, а линии с включенным в геном *GOX* устраняли эту стимуляцию.

Таблица 4.

Влияние отрезков стеблей картофеля разных трансгенных линий на размножение *S. michiganensis*

	СК1	РВ1	L17.2	М7.3	М8.3	М10.4	Контроль
E_{600}	500±70	439±72	468±82	546±76	480±82	338±66	374±17
%	134	117	125	100	94	90	100

Данные табл. 4 показывают, что линии СК1 и РВ1 оказывали стимулирующее действие на размножение этой бактерии, а линии с включенным в геном *GOX* устраняли эту стимуляцию.

Испытание антибактериальной активности трансгенов в 96-луночном планшете происходило на средах, благоприятных для роста бактерий в присутствии 3% глюкозы. Но среда МПА неблагоприятна для растительных объектов, а глюкоза неблагоприятна для роста трансгенных растений (наши не опубликованные данные). Поэтому в пенициллиновые флаконы вносили 5 мл среды для роста картофеля и верхушки пробирочных растений картофеля длиной около 7 см. 12 флаконов с растениями одной линии помещали в стерильный поликарбонатный контейнер (Sigma-Aldrich) и культивировали при освещении 16 ч/сут и 23 °С. Через 13 дней в каждый флакон вносили по 20 мкл бактериальной суспензии и еще через 7 дней отбирали по 150 мкл среды и вносили в лунки планшета.

Через 7 дней после внесения бактерии в пенициллиновые флаконы пробы по 8.5 мкл из суспензий в пенициллиновых флаконах наносились в чашки Петри на поверхность агаровой среды для размножения бактерий и инкубировались в темноте при 26 °С 1 сут и затем фотографировались. Наиболее активно шло размножение в пробах, взятых от линий СК1 и РВ1, у которых активность *GOX* отсутствовала (табл. 6). Можно видеть, что наибольшее увеличение содержания наблюдалось во флаконах с растениями линий СК1 и РВ1. В флаконах с растениями, содержащими ген *GOX*, содержание бактерий было меньше, особенно у линии М8.3 с наиболее интенсивной экспрессией этого гена. Таким образом, подавление размножения бактерии может происходить и в среде для культивирования картофеля *in vitro*, не содержащей глюкозу.

Таблица 5.

Содержание бактерии *S. michiganensis* в жидкой среде по окончании совместного культивирования *in vitro* с растениями картофеля. (Растения удалены, объем суспензии доведен до 7 мл, поглощение измерено при 630 нм в кювете толщиной 3 мм)

	$E_{630} \times 1000$				
	СК1	РВ1	L17.2	М10.4	М8.3
Среднее	4599±2223	3772±1454	2794±2053	1158±871	519±404
min - max	1664-8764	1830-7678	515-6700	267-2963	116-1204

При завершении опыта через 20 сут после внесения бактерии во флаконы от верхушек растений были взяты отрезки стебля и помещены на поверхность агаризованной питательной среды для бактерий в чашках Петри для проверки присутствия в них бактерии. Данные по зараженности отрезков стеблей от каждого из растений были сопоставлены с содержанием бактерии во флаконе, в котором находилась нижняя часть этого растения с корнями (Рисунок). В целом, можно сказать, что зараженность отрезков и зараженность среды в большинстве случаев не совпадали. Чем определяется наличие заражения в одних отрезках и его отсутствие в большинстве других, пока не ясно. Но отсутствие заражения в большинстве отрезков позволяет предположить, что передвижения бактерии вверх из части стебля, погруженной в среду, в большинстве случаев не происходило. Число не зараженных отрезков больше у трансгенных линий с геном глюкозооксидазы.

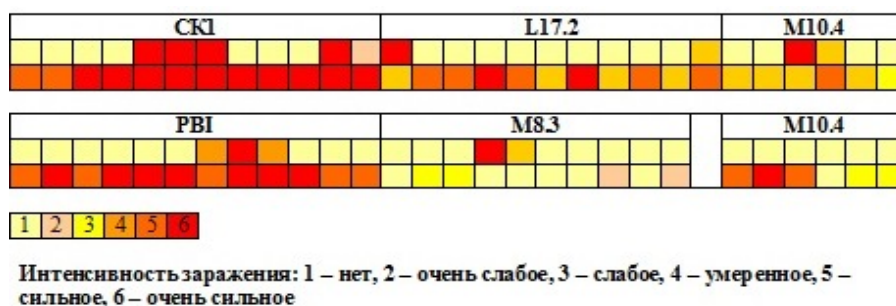


Рисунок. Результаты оценки зараженности бактерией *C. michiganensis* отрезков стеблей картофеля (верхняя строка) и культуральной жидкости из флаконов (нижняя строка) после 20 дней кокультивирования (по данным визуального просмотра).

В представленной работе отчетливо показано, что трансгенные растения, благодаря присутствию у них гена *GOX*, способны ингибировать размножение непатогенной бактерии (*E. coli*) и фитопатогенных бактерий (*P. carotovorum* и *C. michiganensis*).

Установлено, что патогенные бактерии способны использовать компоненты растения в качестве дополнительного источника питания, что приводит к стимулированию их роста. Этот эффект отсутствовал у *GOX*-трансгенных растений. Интересно отметить, что бактерия кольцевой гнили клубней картофеля не передвигалась из части стебля с корнями, погруженной в бактериальную суспензию, в ту часть стебля, которая с ней не контактировала.

Работа была поддержана проектом РФФИ № 16-54-00070. Работа выполнена с использованием ЦКП «Биоресурсный Центр» СИФИБР СО РАН и приборов ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

- Савчин Д.В., Панюш А.С., Картель Н. А. Создание и анализ трансгенных растений картофеля и табака с геном *GOX Penicillium funiculosum* // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. Серыя Біялагічных Навук. – 2012. – № 4. – С. 16–19.
- Baker C.J., Orlandi E.W. Active oxygen species in plant pathogenesis // Annu Rev Phytopathol. –1995. – V. 33. – P. 299–321.
- Grabelnych O.I., Borovik O.A., Lyubushkina I.V., Gamburg K.Z., Fedyaeva A.V., Fedoseeva I.V., Stepanov A.V., Rikhvanov E.G., Sauchyn D.V., Urbanovich O.Yu., Borovskii G.B. Biological effects of potato plant transformation with glucose oxidase gene and their resistance to hyperthermia // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2017. – V. 13, No. 1. – P. 5–14.

Orlikowska T., Nowak K., Reed B. Bacteria in the plant tissue culture environment // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2017. – V. 128. – P. 487–508.

Selvakumar P., Arvinth S., Maruthasalam S., Chin H.L. Disease resistance conferred by constitutive expression of a fungal glucose oxidase gene in transgenic tobacco plants // Asian J. of Plant Science. 2013. – V. 12, No 3. – P. 128–136.

Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Elaine E.B., Fitzsimmons K.C., Shah DM. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants // Plant Cell. – 1995. – V. 7. – P. 1357–1368.

Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Leon J., Fitzsimmons K.C., Levine E.B., Raskin I., Shah D.M. Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants // Plant Physiol. – 1997. – V. 115. – P. 427–435.

EFFECTS OF POTATO (SKARB VARIETY) TRANSFORMED WITH *GOX* GENE FROM *PENICILLIUM FISTULOSUM* ON THE GROWTH OF NONPATHOGENIC *ESHERICHIA COLI* AND PHYTOPATHOGENIC *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* AND *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* BACTERIA

K.Z. Gamburg, V.A. Bybin, G.B. Borovskii, Yu.A. Markova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, gamburg@sifibr.irk.ru

Abstract. Transgenic potato plants with *GOX* gene inhibited cell propagation of the nonpathogenic *E. coli* and phytopathogenic *P. carotovorum* and *C. michiganensis* bacteria. Propagation of pathogenic bacteria was stimulated with some substances of the host plants, but the presence of *GOX* gene decreased this effect. *C. michiganensis* did not move from lower rooted stem part immersed in bacterium suspension into the upper part which did not contacted with it.

Keywords: potato; glucosooxidase; *GOX* gene, bacteria; *Clavibacter michiganensis*, *Esherichia coli*, *Pectobacterium carotovorum*

ВЛИЯНИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ГЕНА *GOX* ИЗ *PENICILLIUM FUNICULOSUM* В ГЕНОМ КАРТОФЕЛЯ СОРТА СКАРБ НА ЕГО УСТОЙЧИВОСТЬ К ДЛИТЕЛЬНОМУ ОХЛАЖДЕНИЮ

К.З. Гамбург¹, О.И. Грабельных^{1,2}, О.А. Боровик¹, Г. Б. Боровский¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, gamburg@sifibr.irk.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

Аннотация. Представленная работа содержит данные по влиянию включения гена глюкозооксидазы (*gox*) в геном картофеля на его устойчивость к длительному (10 дней) охлаждению. Эта генетическая трансформация приводила к значительному увеличению устойчивости, зависящему от интенсивности экспрессии гена *gox*. Активность глюкозооксидазы существенно не изменялась после 10 дней воздействия при 1 °С. У трансгенных линий отмечали увеличение содержания сахаров после охлаждения. Содержание отдельных дегидринов в трансгенных линиях было выше.

Ключевые слова: картофель, глюкозооксидаза, устойчивость к холоду

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-898-902

Картофель считается холодостойкой культурой в том смысле, что низкие положительные температуры не приводят к его гибели, в отличие от других пасленовых (томат, баклажан, перец). Однако и картофель страдает от них, что приводит к снижению его продуктивности. Поэтому повышение его холодостойкости является важной селекционной и агротехнической задачей. В настоящее время для решения этой задачи привлекаются биотехнологические методы, в том числе и генетическая инженерия. В некоторых работах [Park et al., 2004] показано, что при обработке растений H_2O_2 изменялась их устойчивость к различным абиотическим факторам. Поэтому можно было предположить, что увеличение способности растений продуцировать H_2O_2 может изменить устойчивость растений (в том числе и картофеля) к биотическим и абиотическим факторам. Известно, что некоторые грибы активно продуцируют H_2O_2 с помощью фермента глюкозооксидазы (GOX), которая окисляет глюкозу с образованием H_2O_2 . Поэтому ген *gox* был использован коллегами из Института генетики и цитологии Академии наук Республики Беларусь для получения трансгенного картофеля [Савчин и др., 2012]. Клубни картофеля сорта Скарб, трансформированные геном *gox* из *Penicillium funiculosum*, были любезно предоставлены нам для работы по совместному проекту. Ранее мы показали, что трансгенный картофель с геном *gox* имеет пониженную устойчивость к высокой температуре [Grabelnych et al., 2017]. Представляло интерес выяснить, отличаются ли эти трансгены по устойчивости к низкой температуре. Maruthasalam et al. [2010] показали, что трансгенный табак с геном глюкозооксидазы был более устойчив к низкой температуре.

Материалы и методы. Получение трансгенных растений, их выращивание и размножение *in vitro* описаны в нашей предыдущей публикации [Grabelnych et al., 2017]. В опытах использовались нетрансформированные растения сорта Скарб (СК), растения, трансформированные пустым вектором на основе плазмиды pBI121 (PBI) и 3 трансгенных линии с разной интенсивностью экспрессии целевого гена (L17.2, M7.3, M8.3) [Grabelnych et al., 2017]. Пробирочные растения помещали на 10 суток в темновой термостат с температурой 1 ± 0.5 °С. Затем пробирки переносились в световую

комнату с температурой 23 °С и освещением люминесцентными лампами 16 часов в сутки с интенсивностью 25 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Через 4-5 дней определялись следующие параметры: 1) отмирание стебля (% омертвевшей части стебля), 2) отмирание листьев (% мертвых листьев от общего их числа и % поврежденных листьев, у которых часть листа оставалась зеленой). Для определения суммарного повреждающего эффекта рассчитывался общий индекс повреждения каждого растения путем сложения повреждающих эффектов на стебли и листья, выраженных в %.

Активность глюкозооксидазы измеряли по способности растений генерировать H_2O_2 в присутствии глюкозы [Sauchyn et al., 2012], используя модифицированный нами метод количественного определения активности GOX в жидкой среде. Для этого листья картофеля гомогенизировали в 0.1 М Трис-НСl буфере (рН 7.0) в соотношении 1 : 30, центрифугировали при 12 тыс. об./мин в течение 5 мин и добавляли супернатант в раствор, содержащий 25 мМ КJ, 0,5% крахмала и 100 мМ D-глюкозы. В результате окисления глюкозы глюкозооксидазой образуется H_2O_2 , который окисляет КJ, в результате йодкрахмальной реакции происходило окрашивание среды в синий цвет, плотность которой измеряли на спектрофотометре при длине волны 595 нм. Активность GOX выражали в отн. ед./мг белка. Содержание белка определяли по методу Бредфорд. Количественное содержание сахаров определяли с антроновым реактивом [Дише, 1967], концентрацию водорастворимых углеводов рассчитывали в % на суховоздушный вес. Для детекции дегидринов проводили денатурирующий электрофорез (в 12,5% ПААГе) тотального белка из тканей побегов картофеля с последующим вестерн-блоттингом с поликлональными антителами против дегидринов (ADI-PLA-100, «Enzo Life Sciences», США). Опыты были проведены более трех раз. По данным определения биологических эффектов у каждого из 10 растений рассчитывалось среднее арифметическое значение, стандартное отклонение.

Результаты. В таблице 1 показано, что варианты СК и РВ1, не имеющие гена *gox*, и L17.2 со слабой его экспрессией сильнее повреждались холодом, чем линии М8.3 и М7.3 с более высокой экспрессией.

Таблица 1.

Индексы повреждения пробирочных растений картофеля сорта Скарб и его трансгенных линий, вызванных их выдерживанием при $1\pm 0.5^\circ \text{C}$, %

Дата опыта	СК	РВ1	L17.2	М8.3	М7.3
28.02.17	88±63	71±57	95±45	62±27	40±26
26.06.17	47±31	67±47	59±35	34±41	32±41
05.09.17	69 ±59	66±32	47±44	49±30	43±25
21.08.17	111±43	68±30	46±32	14±18	6±11
28.08.17	143±73	97±49	38±47	25±29	7±27
11.10.17	102±29	-	36±25	29±23	-
16.10.17	153±28	-	86±68	51±52	-
Среднее ± SD	81±70	60±59	85±54	33±32	11±16

Индекс=% мертвой части стебля+% мертвых листьев+(% поврежденных листьев) : 2.

Внешнее впечатление о характере повреждений, вызванных холодом, дает рисунок. Можно видеть, что у СК все растения имеют отчетливые повреждения, у М7.3 все растения не повреждены, у М8.3 из 13 растений 2 повреждены.

При просмотре растений через 10 дней было выявлено, что растения с неповрежденной верхушкой стебля были способны к возобновлению роста (табл. 2). При этом % таких растений у линий без гена *gox* и линии со слабой экспрессией был меньше, чем у линии с высокой экспрессией.

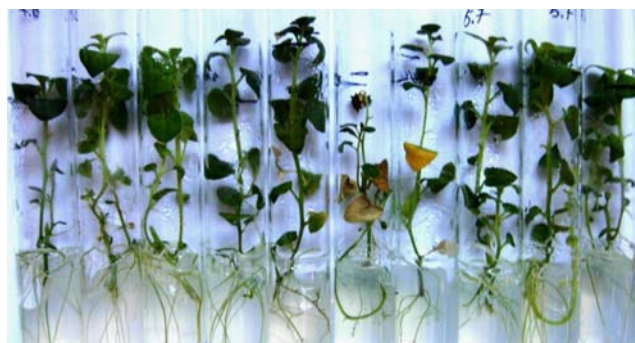
Таким образом, полученные данные позволяют полагать, что введение в геном картофеля сорта Скарб гена *gox* существенно увеличивает его устойчивость к длительному холоду. Это увеличение зависит от интенсивности экспрессии этого гена. По-видимому, постоянное присутствие повышенного содержания H_2O_2 в трансгенных линиях вызывает какие-то изменения в клетках, позволяющие им более эффективно противостоять неблагоприятному воздействию длительного охлаждения. Мы попытались обнаружить некоторые из них (активность глюкозооксидазы, содержание сахаров и дегидринов).



СК



М7.3



М8.3

Рисунок. Общий вид растений через 12 (с 16.08 по 28.08.17) дней после прекращения воздействия температуры 1° (с 05.08.17 по 16.08.17).

При анализе линий, трансформированных геном *gox*, на активность глюкозооксидазы выявлены четкие различия между линиями L17.2 и M8.3, при этом у линии M8.3 с более высокой экспрессией гена *gox* обнаружена наиболее высокая активность GOX (табл. 3). Охлаждение сопровождалось некоторым увеличением

активности GOX как у линии L17.2, так и у линии M8.3, что может быть следствием повышенного содержания H₂O₂ при холодовом стрессе. Следует отметить, что ни в одном из опытов не обнаруживалось наличия активности GOX в вариантах СК и РВІ.

Таблица 2.

Способность растений к возобновлению роста после окончания холодового воздействия

	СК	РВІ	L17.2	M8.3
% живых растений	40	44	50	82
% растений с приростом	20	22	33	64
Прирост за 12 дней, мм на 1 растение	1.5	6.6	4.3	12.8

По содержанию сахаров изученные линии различались, так, в варианте СК, не имеющего гена *gox*, содержание сахаров в контрольных условиях было самым высоким и снижалось после охлаждения, в то время как у линий L17.2 и M8.3, наоборот, охлаждение сопровождалось увеличением содержания сахаров (табл. 3). Также нами выявлены изменения в содержании отдельных дегидринов, свидетельствующие о более высокой устойчивости трансформантов к холоду (не показано).

Таблица 3.

Активность глюкозооксидазы и содержание сахаров в растениях картофеля до и после охлаждения

Линии	Активность глюкозооксидазы*		Содержание сахаров**	
	До охлаждения	После охлаждения	До охлаждения	После охлаждения
СК	0	0	2.55 ± 0.44	1.62 ± 0.23
РВІ	0	0	1.37 ± 0.56	2.69 ± 1.26
L17.2 21-28.08.17	0.66 ± 0.18	-	-	-
L17.2 08-21.12.17	0.74 ± 0.50	0.92 ± 0.39	0.70 ± 0.33	2.18 ± 0.45
M8.3 21-28.08.17	1.76 ± 0.47	-	-	-
M8.3 28-21.12.17	2.23 ± 0.42	2.88 ± 1.29	1.20 ± 0.71	2.09 ± 0.29

*отн. ед./мг белка, **% на воздушно сухой вес. M±SD, n=6-12

На основании полученных данных можно заключить, что введение гена *gox* в геном картофеля приводит к повышению устойчивости растений к низкой температуре, которое сопровождается некоторыми изменениями клеточного метаболизма.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №16-54-00070, с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН (г. Иркутск).

Литература

Дише З. Общие цветные реакции углеводов // Методы химии углеводов. – М: Мир, 1967. – С. 21–24.

Савчин Д.В., Панюш А.С., Картель Н.А. Создание и анализ трансгенных растений картофеля и табака с геном *GOX Penicillium funiculosum* // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. Серыя Біялагічных Навук. – 2012. – № 4. – С. 16–19.

Grabelnych O.I., Borovik O.A., Lyubushkina I.V., Gamburg K.Z., Fedyaeva A.V., Fedoseeva I.V., Stepanov A.V., Rikhvanov E.G., Sauchyn D.V., Urbanovich O.Yu., Borovskii G.B. Biological effects of potato plant transformation with glucose oxidase gene

and their resistance to hyperthermia // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2017. – V. 13, No. 1. – P. 5–14.

Maruthasalam S., Liu Y.L., Sun C.M., Chen P.Y., Yu C.W., Lee P.F., Lin C.H. Constitutive expression of a fungal glucose oxidase gene in transgenic tobacco confers chilling tolerance through the activation of antioxidative defense system // Plant Cell Rep. – 2010. – V. 29. – P. 1035–1048.

Park E.-J., Jeknic' Z., Sakamoto A., DeNoma J., Yuwansiri R., Murata N., Chen T.H.H. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage // The Plant Journal. – 2004. – V. 40. – P. 474–487.

EFFECT OF THE INSERTION OF *GOX* GENE FROM *PENICILLIUM FUNICULOSUM* INTO THE GENOME OF POTATO (SCARB VARIETY) ON ITS RESISTANCE TO PROLONGED COLD

K.Z. Gamburg¹, O.I. Grabelnych^{1, 2}, O.A. Borovik¹, G.B. Borovskii¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, gamburg@sifibr.irk.ru

²Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Abstract. Presented work contains data on the influence of glucose oxidase gene inserted into the potato genome on its resistance to prolonged (10 days) cold treatment. This genetic transformation led to the significant increase of the resistance depending from the intensity of gene expression. Glucose oxidase activity did not change significantly after 10 days at 1 °C and the content of sugars was increased in transgenic lines. The contents of some dehydrins before cold treatment were higher in transgenic lines.

Keywords: *potato, glucose oxidase, cold resistance*

ФЕНОТИП "STAY-GREEN" У МУТАНТА *ARABIDOPSIS THALIANA* ПО ГЕНАМ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ *GDH1GDH2*

Е.Ю. Гарник¹, Д.В. Вильянен², А.А. Власова², В.И. Бельков¹, В.И. Тарасенко¹,
Ю.М. Константинов¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *elga74@yandex.ru*

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

Аннотация. Индуцированное темнотой старение растений – это пожелтение и отмирание листьев при длительном выдерживании растений в темноте. Мы обнаружили, что двойной нокаут-мутант арабидопсиса *gdh1gdh2* сохраняет зеленую окраску листьев при выдерживании в темноте более 4 суток, тогда как растения дикого типа в этих условиях желтеют. Содержание хлорофиллов снижалось в течение 7 суток в темноте до 40-50% от исходного у растений *Col-0* и только до 70-80% у растений *gdh1gdh2*. Соотношение хлорофиллов *a/b* снижалось у растений *gdh1gdh2* вследствие более медленного распада хлорофилла *b*. Анализ экспрессии генов, отвечающих за катаболизм хлорофиллов, в зеленых, желтеющих и желтых листьях *Col-0* и в типичных (зеленых) листьях *gdh1gdh2* после 5-6 суток в темноте показал, что замедленный распад хлорофиллов у мутанта – следствие низкой экспрессии генов *NYC1*, *PAO*, *PPH*, *SGR1* и *SGR2*, отвечающих за деградацию хлорофиллов. Таким образом, у растений мутантной линии *gdh1gdh2* нарушена генетическая программа распада хлорофиллов при индуцированном старении.

Ключевые слова: *глутаматдегидрогеназа, индуцированное старение, хлорофилл a, хлорофилл b, экспрессия генов, Arabidopsis thaliana*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-903-907

NAD-зависимая глутаматдегидрогеназа (GDH, EC1.4.1.2) катализирует окислительное дезаминирование глутамата до 2-оксоглутарата, а также обратную реакцию. В растениях *Arabidopsis thaliana* были клонированы и охарактеризованы три гена, кодирующие GDH, два из которых – *GDH1* и *GDH2* – ответственны за большую часть активности GDH у арабидопсиса [Fontaine et al., 2013]. Существует жизнеспособный двойной нокаут-мутант по генам GDH *gdh1gdh2* [Miyashita and Good, 2008]. Нами обнаружено, что мутант *gdh1gdh2* при длительном (4 суток и более) выдерживании растений в темноте в большой степени сохраняет зеленый цвет листьев, в отличие от растений дикого типа *Col-0*, листья которых при этом желтеют (рис. 1). Это явление (пожелтение и отмирание листьев при длительном выдерживании в темноте) называется индуцированным старением [Lim et al., 2007]. Важно отметить, что у арабидопсиса старение начинается в каждом листе в свои сроки, так что на одном и том же растении одновременно могут присутствовать листья на разных стадиях старения: от самых молодых и полностью зеленых до полностью пожелтевших и отмирающих (рис. 1).

Фенотип растений, не желтеющих при естественном либо индуцированном старении, носит название *stay-green* [Kusaba et al., 2013]. Такой фенотип может возникать по разным причинам: при отключении генов, непосредственно обеспечивающих деградацию хлорофиллов или ее регуляцию, при нарушениях синтеза фитогормонов, а также у некоторых мутантов по белкам аутофагии [Sakuraba et al., 2014]. На сегодняшний день в литературе нет упоминаний ни о *stay-green* фенотипе у мутантов по генам глутаматдегидрогеназы, ни о каком-либо участии GDH в метаболизме хлорофиллов.

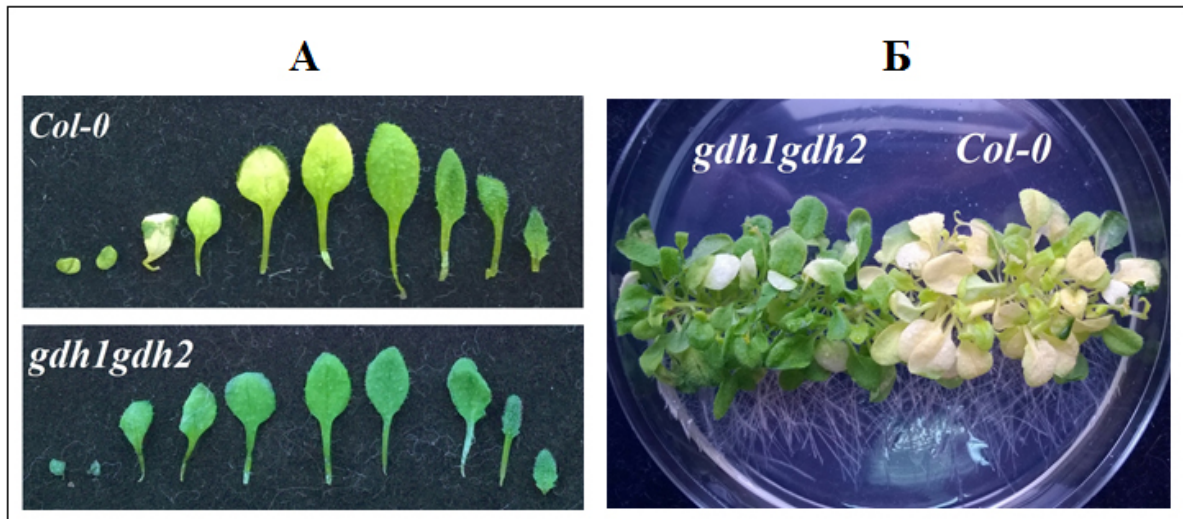


Рис. 1. Индуцированное старение листьев двух линий арабидопсиса. А - полные наборы листьев растений дикого типа (*Col-0*) и двойного мутанта по генам глутаматдегидрогеназы (*gdh1gdh2*) после 4 суток выдерживания растений в темноте. Б - состояние растений арабидопсиса *Col-0* и *gdh1gdh2* после 8 суток выдерживания в темноте.

Целью настоящей работы было изучение особенностей изменения содержания и состава хлорофиллов при длительном выдерживании в темноте растений мутантной линии *gdh1gdh2* в сравнении с линией дикого типа *Col-0*, а также изучение экспрессии ряда генов, ответственных за ключевые этапы деградации хлорофиллов, при развитии индуцированного старения в листьях *Col-0* и *gdh1gdh2*.

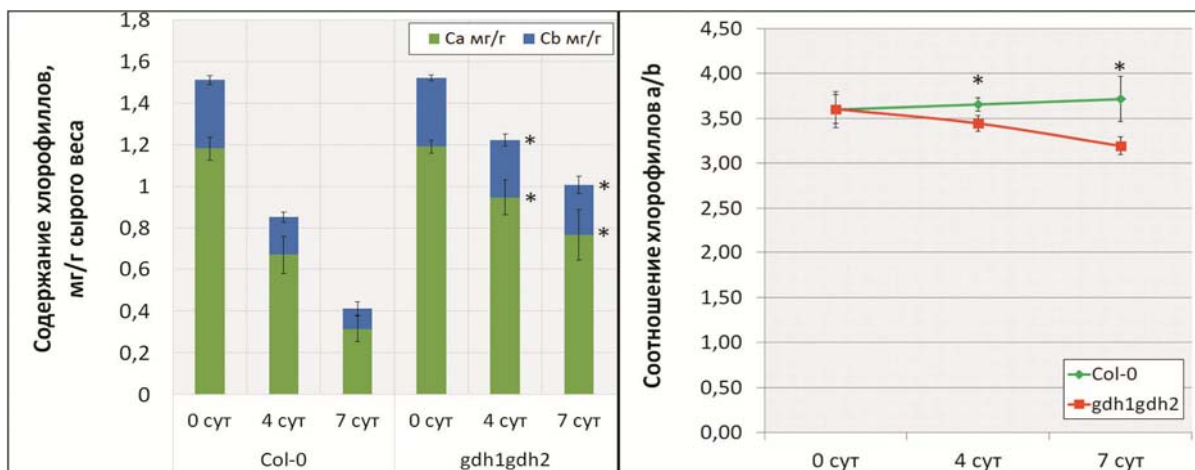


Рис. 2. Изменение содержания и состава хлорофиллов у растений *gdh1gdh2* и *Col-0* в течение 7 суток в темноте. $n \geq 5$. Бары обозначают стандартные отклонения. Знаком * обозначены различия между линиями *Col-0* и *gdh1gdh2* при $p < 0,01$.

Растения арабидопсиса линий *Col-0* и *gdh1gdh2* выращивали стерильно в чашках Петри в течение двадцати одного дня, затем убирали в темноту на 0, 4 и 7 суток. Хлорофиллы экстрагировали 80% ацетоном на холоде [Porra et al., 1989]. Содержание и состав хлорофиллов определяли спектрофотометрически, расчет концентраций хлорофиллов в экстрактах проводили согласно [Ni at al., 2009]:

$$C_a = 12,7 * A_{663} - 2,69 * A_{645} \text{ (Chlorophyll a)}$$

$$C_b = 22,9 * A_{645} - 4,86 * A_{663} \text{ (Chlorophyll b)}$$

$$C_{a+b} = 8,02 * A_{663} + 20,20 * A_{645} \text{ (Chlorophyll } a+b\text{)}$$

При выдерживании растений арабидопсиса в темноте более 4 суток происходило снижение содержания как хлорофилла *a*, так и хлорофилла *b* в растениях обеих линий (рис. 2). Снижение содержания хлорофиллов завершалось в течение 6-7 суток у обеих исследуемых линий, однако остаточное содержание хлорофиллов у *Col-0* составляло от 20% до 30%, у *gdh1gdh2* – от 50% до 60%. Таким образом, разрушение хлорофиллов у мутанта по генам GDH происходило менее эффективно. Кроме того, у растений *gdh1gdh2* проявилась тенденция к снижению соотношения хлорофиллов *a/b* в течение 7 суток в темноте, что говорит о более медленном разрушении хлорофилла *b* относительно хлорофилла *a*.

Распад хлорофиллов обеспечивается и регулируется экспрессией ряда генов, среди которых *NYC1* (хлорофилл *b*-редуктаза), *PPH* (феофитиназа), *PAO* (феофорбид *a* оксигеназа), гены *SGR1*, *SGR2*, *SGRL* (белки семейства SGR, обеспечивающие разборку хлорофилл-белковых комплексов и регулирующие распад хлорофиллов) [Tanaka et al., 2011]. Методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией мы исследовали изменения экспрессии перечисленных генов в процессе пожелтения листьев при индуцированном старении. Профили экспрессии оценивали после 6 суток выдерживания растений в темноте, отдельно для зеленых, желтеющих и полностью пожелтевших листьев растений линии *Col-0*, а также для типичных (зеленых) листьев из среднего яруса (т.е. не самых старых и не самых молодых) для растений *gdh1gdh2*.

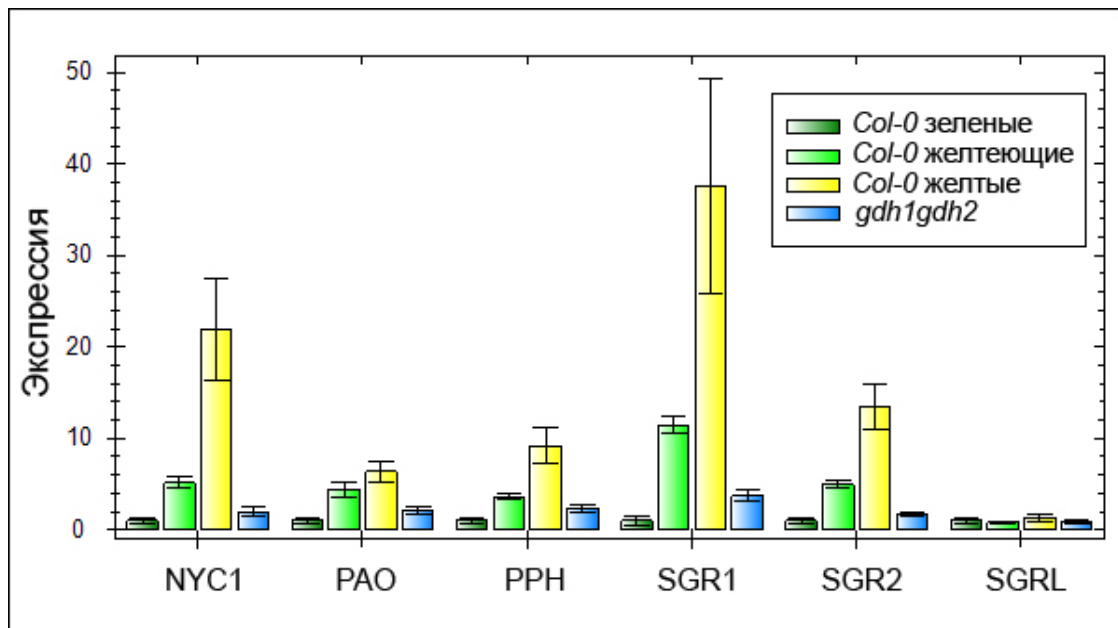


Рис. 3. Экспрессия генов катаболизма хлорофиллов в листьях линии *Col-0* на разных стадиях старения и в листьях мутантной линии *gdh1gdh2*. Растения были выдержаны в темноте в течение 6 суток. Показаны результаты ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Бары обозначают стандартные отклонения.

У растений дикого типа для всех исследованных генов, кроме *SGRL*, экспрессия была относительно низкой в зеленых листьях и значительно повышалась в желтеющих. В полностью пожелтевших листьях *Col-0* экспрессия генов, связанных с распадом хлорофиллов, может быть как очень высокой, так и низкой, в зависимости от того, началось ли отмирание тканей. Экспрессия тех же генов в листьях мутанта *gdh1gdh2* находится на низком уровне, сравнимом с уровнем в зеленом листе дикого типа (рис. 3). Это свидетельствует либо о нарушении программы деградации хлорофиллов в листьях мутантных растений (что хорошо согласуется с нашими данными о менее

эффективном распаде хлорофиллов у растений *gdh1gdh2*), либо о более раннем начале гибели их листьев. Ранее было показано, что при длительном выдерживании в темноте мутант *gdh1gdh2* начинает погибать раньше, чем растения дикого типа [Miyashita and Good, 2008].

Таким образом, индуцированное темнотой старение у мутанта арабидопсиса по генам NAD-зависимой глутаматдегидрогеназы *gdh1gdh2* развивается иначе, чем у линии дикого типа *Col-0*. Снижение содержания хлорофиллов у мутанта происходит значительно медленнее. Ряд генов, ответственных за деградацию хлорофиллов, в листьях мутантных растений экспрессируется на более низком уровне, чем в желтеющих листьях растений *Col-0*, при одних и тех же сроках выдерживания в темноте. Обнаруженные факты позволяют предполагать наличие функциональной связи между активностью NAD-зависимой глутаматдегидрогеназы и регуляцией процессов старения у растений.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

Fontaine J.-X., Terce-Laforgue T., Bouton S., Pageau K., Lea P.J., Dubois F., Hirel B. Further insights into the isoenzyme composition and activity of glutamate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Signalling and Behavior*. – 2013. – V. 8, No. 3. – e23329.

Kusaba M., Tanaka A., Tanaka R. Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence // *Photosynth Res*. – 2013. – V. 117. – P. 221–234.

Lim P. O., Kim J. H., Nam H. G. Leaf Senescence // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 58. – P. 115–136.

Miyashita Y., Good A. G. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation // *Journal of Experimental Botany*. – 2008. – V. 59, No. 3. – P. 667–680.

Ni Z., Kim E.D., Ha M., Lackey E., Liu J., Zhang Y., Sun Q., Chen Z.J. Altered circadian rhythms regulate growth vigor in hybrids and allopolyploids // *Nature*. – 2009. – Vol. 457. – P. 327–331.

Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1989. – V. 975. – P. 384–394.

Sakuraba Y., Lee S-H., Kim Y-S., Park O.K., Hortensteiner S., Paek N.-C. Delayed degradation of chlorophylls and photosynthetic proteins in *Arabidopsis* autophagy mutants during stress-induced leaf yellowing // *Journal of Experimental Botany*. – 2014. – V. 65, No. 14. – P. 3915–3925.

Tanaka R., Kobayashi K., Masuda T. Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana* // *The Arabidopsis Book*. – 2011. – e0145.

STAY-GREEN PHENOTYPE IN THE *ARABIDOPSIS THALIANA* GLUTAMATE DEHYDROGENASE MUTANT *GDH1GDH2*

E.Yu. Garnik¹, D.V. Vilyanen², A.A. Vlasova², V.I. Belkov¹, V.I. Tarasenko¹, Yu.M. Konstantinov¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *elga74@yandex.ru*

²Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Abstract. Dark-induced senescence of plants is a process of leaf yellowing and dying-off in conditions of the long-term dark. We detected that the double knock-out Arabidopsis mutant *gdh1gdh2* retains a mainly green color of its leaves when incubated in the dark during four days and more, whereas wild type Arabidopsis plants turn yellow in the same conditions. Chlorophyll content decreased during 7 days in the dark to 40-50% of the initial level in the wild type Arabidopsis line *Col-0* but only to 70-80% of the initial level in the *gdh1gdh2* plants. Chlorophyll *a/b* rate decreased in the *gdh1gdh2* plants as a consequence of the slower chlorophyll *b* degradation. Gene expression analysis in green, yellowing and yellow *Col-0* leaves and in typical (green) *gdh1gdh2* leaves after 5-6 days in the dark demonstrated that the slow chlorophyll content fall in the mutant plants is a result of the low expression of genes *NYC1*, *PAO*, *PPH*, *SGR1* and *SGR2* responsible for chlorophyll degradation. So, the genetic program of chlorophyll destruction during a dark-induced senescence is disrupted in the *gdh1gdh2* mutant plants.

Keywords: *chlorophyll a*, *chlorophyll b*, *dark-induced senescence*, *gene expression*, *glutamate dehydrogenase*, *Arabidopsis thaliana*

УЧАСТИЕ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛИНГА СИНЕГО СВЕТА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АППАРАТА ТРАНСКРИПЦИИ ПЛАСТОМА ПРИ ЦИТОКИНИН-ЗАВИСИМОЙ ДЕЭТИОЛЯЦИИ *A. THALIANA*

А.С. Дорошенко, М.Н. Данилова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия; anastasiya04101993@gmail.com

Аннотация. Исследования биогенеза хлоропластов в ходе деэтиоляции *Arabidopsis thaliana* показали, что рецепторы синего света CRY1 и CRY2, а также участник трансдукции светового сигнала HY5 контролируют экспрессию генов аппарата транскрипции пластома. Цитокинин-зависимая регуляция осуществляется в первую очередь за счет *транс*-фактора HY5.

Ключевые слова: деэтиоляция, криптохромы, фотоморфогенез, цитокинины, экспрессия генов

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-908-912

В начале ювенильного этапа онтогенеза проростки развиваются по программе скотоморфогенеза, которая является адаптацией общей морфогенетической программы к условиям почвенной темноты. В этих условиях в семядольных листьях из пропластид формируются этиопласты, геном которых в условиях отсутствия света проявляет слабую транскрипционную активность. В этиопластах присутствуют две РНК полимеразы. Мультисубъединичная полимеразы PEP (Plastid-Encoded RNA Polymerase) состоит из коровых субъединиц α , β , β' и β'' , которые кодируются пластомом (*proA*, *proB*, *proC1* и *proC2*), и одного из шести сигма факторов SIG1-6 ядерного кодирования (*SIG1-6*). Моносубъединичная полимеразы NEP (Nuclear-Encoded RNA Polymerase), кодируемая ядром, представлена двумя ферментами RPOTr и RPOTrp, которые, главным образом, осуществляют транскрипцию генов «домашнего хозяйства» пластид [Börner et al., 2015]. При освещении растение инициирует программу развития – фотоморфогенез, в результате чего проросток претерпевает многочисленные изменения на морфологическом, биохимическом и молекулярном уровнях. Под воздействием света происходит превращение этиопластов в хлоропласты и формирование фотосинтетически-активных комплексов в тилакоидных мембранах, а также масштабное перепрограммирование митохондриального, ядерного и хлоропластного геномов. Этот динамичный процесс происходит в течение 12-24 часов и называется деэтиоляцией [Cortleven et al., 2016].

Реализация светового сигнала осуществляется с участием сложной регуляторной сети, посредством которой растение «распознает» интенсивность, качество, и направление светового потока. В ходе деэтиоляции восприятие синего света осуществляется семейством апопротеинов, называемых криптохромами, которые регулируют транскрипцию чувствительных к синему свету генов. У *A. thaliana* семейство криптохромов представлено двумя белками CRY1 и CRY2 (Cryptochrome 1-2). В результате восприятия синего света рецепторы связываются с негативным регулятором фотоморфогенеза – комплексом COP/SPA, тем самым освобождая транскрипционные факторы HY5 (long hypocotyl 5), HYH (гомолог HY5), HFR1 (long hypocotyl in far-red) и LAF1 (long after far-red light 1) и запуская транскрипцию светорегулируемых генов [Liu et al., 2016]. К ним относятся гены хлоропластных белков ядерного и пластидного кодирования. Реализация генетической информации пластид определяется изменениями аппарата транскрипции пластома. При появлении света PEP полимеразы претерпевает значительные структурные изменения, благодаря

формированию комплекса с так называемыми PAP белками (PEP-Associated Proteins) [Liebers et al., 2017]. В результате PEP становится основной РНК-полимеразой и начинает активную транскрипцию фотосинтетических генов, в то время как NEP продолжает транскрипцию генов «домашнего хозяйства» [Börner et al., 2015].

Регуляция биогенеза хлоропластов в ходе деэтиоляции определяется не только освещением, но и различными фитогормонами. Известно, что цитокинины на начальном этапе фотоморфогенеза ускоряют превращение этиопласта в хлоропласт, положительно регулируя биосинтез хлорофилла и формирование тилакоидных мембран с фотосинтетически-активными комплексами [Cortleven et al., 2016]. Однако молекулярный механизм, за счет которого цитокинины ускоряют формирование хлоропластов, не ясен. Одним из возможных способов положительной регуляции цитокининами процесса дифференцировки хлоропластов из этиопластов является стимуляция формирования аппарата транскрипции пластома. В литературе отсутствуют работы, посвященные изучению роли конкретных рецепторов света (синего или красного) на экспрессию генов аппарата транскрипции пластома при превращении этиопласта в хлоропласт. Возможное участие цитокининов в регуляции экспрессии генов аппарата транскрипции пластома при участии рецепторов света ранее также не исследовалось. Исходя из вышесказанного, цель настоящей работы заключалась в изучении механизмов регуляции светом и цитокининами экспрессии генов аппарата транскрипции пластома.

Растения *A. thaliana* экотипа *Landsberg erecta* и созданные на его основе нокаут-мутанты по генам рецепции (*cry1/cry2*) и трансдукции (*hy5*) синего света выращивали в течение 4-х дней в условиях полной темноты на питательной среде Мурасиге-Скуга без гормона (контроль) и в присутствии 1 мкМ *tZ* (*транс*-зеатина) (опыт). Выращенные растения переносили на свет в климатическую камеру MLR-352H-PE (Sanyo, Япония) с интенсивностью освещения 120 мкМ фотонов*с⁻¹*м⁻² и температурой +23 °С. Проростки фиксировали в жидком азоте спустя 3, 6, 9 и 16 ч освещения. Контрольным образцом служил вариант дикого типа, выращенный в течение 4 дней в условиях темноты без гормона. Относительный уровень транскриптов оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени после обратной транскрипции на амплификаторе LigthCyclerR96 (“Roche”, Швейцария). Уровень транскриптов целевых генов был нормализован относительно уровня транскриптов референсного гена полиубиквитина (*UBQ10*).

Для проверки эффективности избранных экспериментальных условий анализировали динамику накопления транскриптов генов, экспрессия которых в ходе деэтиоляции положительно регулируется светом и цитокинином: *LHCB2.4* и *ARR5*. Освещение этиолированных проростков дикого типа и мутантов *cry1/cry2* и *hy5* приводило к достоверному увеличению уровня матриц гена светособирающего комплекса фотосистемы II *LHCB2.4* уже спустя 3 ч после начала освещения. Экзогенный цитокинин стимулировал накопление транскриптов гена *LHCB2.4* по сравнению с контрольными растениями. Сходная динамика наблюдалась и при анализе экспрессии *ARR5*: уровень транскриптов в проростках дикого типа и мутантных линий, выращенных в присутствии цитокинина, был выше как в условиях темноты, так и в процессе деэтиоляции. Эффективность экспериментальной постановки также подтверждается достоверным укорочением гипокотилей проростков дикого типа и мутантов *cry1/cry2* и *hy5*, выращенных на питательной среде, содержащей 1 мкМ *tZ*.

Анализ экспрессии генов аппарата транскрипции пластома у проростков дикого типа показал увеличение уровня матриц генов *RPOTp*, *rpoB*, *SIG1*, *SIG2*, *SIG5* и *PAP5*, с максимумом накопления транскриптов спустя 6 или 9 ч освещения (рисунок, а, б). Экзогенный цитокинин дифференциально регулировал экспрессию исследуемых генов

в проростках дикого типа: стимулировал экспрессию генов *RPOTp*, *SIG1* и *PAP5*, подавлял накопление транскриптов *SIG5* и не влиял на накопление матриц *rpoB*, *SIG2* и *SIG6*. Нокаут-мутанты *cry1/cry2* и *hy5* отличались пониженной способностью накапливать матрицы генов аппарата транскрипции пластома *rpoB*, *SIG1* и *PAP5* при освещении. *Транс*-зеатин способствовал достоверной активации экспрессии генов *RPOTp* и *PAP5* в ходе деэтиоляции мутанта *cry1/cry2* (рисунок а, б). При этом нокаут-мутант по *транс*-фактору *hy5* терял способность положительно регулировать экспрессию генов аппарата транскрипции пластома, что предполагает важную роль этого *транс*-фактора в цитокинин-зависимой деэтиоляции (рисунок а, б).

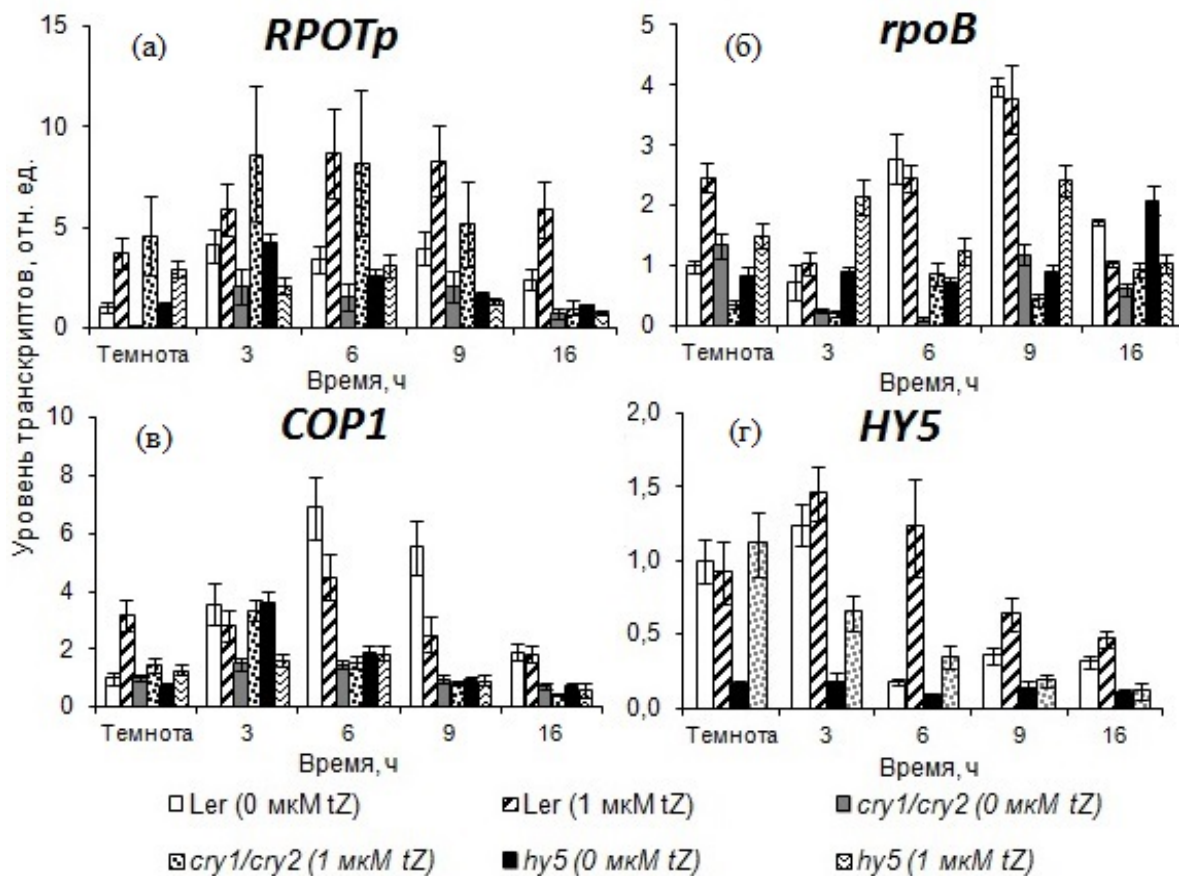


Рисунок. Влияние цитокинина на уровень транскриптов генов *RPOTp* (а), *rpoB* (б), *COP1* (в), *HY5* (г) в 4-х дневных этиолированных проростках *A. thaliana* дикого типа и нокаут-мутантов по компонентам рецепции и трансдукции сигнала синего света *cry1/cry2* и *hy5* в ходе деэтиоляции.

Одним из возможных путей регуляции цитокинином начального этапа фотоморфогенеза является модуляция компонентов сигналинга синего света, поэтому в дальнейшем оценивали динамику накопления матриц генов *HY5* и *COP1*. В ходе деэтиоляции проростков дикого типа свет стимулировал экспрессию гена E3 убиквитин-лигазы *COP1* и способствовал снижению уровня транскриптов гена *транс*-фактора *HY5* (рисунок, в, г). Цитокинин на фоне действия света подавлял накопление матриц негативного регулятора фотоморфогенеза *COP1* и не регулировал экспрессию гена *HY5* в растениях материнской линии (рисунок, в, г). Мутанты *cry1/cry2* и *hy5* отличались пониженным уровнем матриц *COP1* на свету и не регулировались цитокинином в процессе деэтиоляции. Экзогенный цитокинин стимулировал

накопление транскриптов гена *HY5* у нокаут-мутанта *cry1/cry2*, но не у проростков дикого типа (рисунок, г).

Ключевым событием перехода от гетеротрофного к автотрофному типу питания является светозависимое превращение этиопласта в хлоропласт. Из литературных данных известно, что криптохромы и цитокинины контролируют процессы деэтиоляции [Cortleven et al., 2016; Vandenbussche et al., 2007]. В данной работе исследовали участие компонентов сигналинга синего света в регуляции экспрессии генов аппарата транскрипции пластома при цитокинин-зависимой деэтиоляции *A. thaliana*. Наши эксперименты показали, что компоненты рецепции и трансдукции сигнала синего света вносят значительный вклад в регуляцию экспрессии генов аппарата транскрипции как ядерного, так и пластидного кодирования, и, следовательно, представляют важное звено в реализации процесса деэтиоляции. Подтверждением этого является то, что мутанты *cry1/cry2* и *hy5* отличаются пониженными уровнями матриц генов аппарата транскрипции на начальном этапе фотоморфогенеза. Тем не менее, под действием света мутантные линии *cry1/cry2* и *hy5* оказались способны накапливать транскрипты генов *SIG5*, *RPOTr* и *PAP5* на свету, что, возможно, происходило за счет компенсаторного действия сигнальной системы красного света.

Хорошо известно, что экзогенный цитокинин на фоне действия света дифференциально регулирует экспрессию хлоропластных и ядерных генов, тем самым ускоряя формирование хлоропластов из этиопластов [Cortleven et al., 2016]. В наших экспериментах активирующий эффект цитокинина на экспрессию генов аппарата транскрипции пластома наблюдался только у мутанта *cry1/cry2*, что, возможно, связано с подавлением экспрессии гена – негативного регулятора фотоморфогенеза *COP1* и сопряженной стимуляцией накопления матриц *транс*-фактора *HY5*. Наоборот, у мутанта *hy5* не наблюдалось активации экспрессии генов аппарата транскрипции. Это позволяет предполагать, что *транс*-фактор *HY5* играет значимую роль в пересечении путей трансдукции сигналов синего света и цитокининов.

Положительное действие цитокинина, возможно, также осуществляется через систему восприятия и трансдукции красного света. В дальнейшем мы планируем проанализировать влияние красной части светового спектра на формирование аппарата транскрипции на уровне экспрессии генов РНК-полимераз PEP и NEP.

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента РФ (грант № МК-1908.2018.4).

Литература

Biswal B., Krupinska K., Biswal U.C. Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence. – Dordrecht, Heidelberg, New York, London: Springer, 2013. – 876 p.

Börner T., Aleynikova A.Y., Zubo Y.O., Kusnetsov V.V. Chloroplast RNA polymerases: role in chloroplast biogenesis // Biochim Biophys Acta. – 2015. – V. 1847, No. 9. – P. 761-769.

Cortleven A., Marg I., Yamburenko M. V., Schlicke H., Hill K., Grimm B., Schaller G. E., Schmölling T. Cytokinin regulates etioplast-chloroplast transition through activation of chloroplast-related genes // Plant Physiol. – 2016. – V. 172, No. 1. – P. 464-478.

Liu B., Yang Z., Gomez A., Liu B., Lin C., Oka Y. Signaling mechanisms of plant cryptochromes in *Arabidopsis thaliana* // Journal of Plant Research. – 2016. – V. 129, No. 2. – P. 137–148.

Liebers M., Pfannschmidt T. Plastid RNA polymerases and nuclear-encoded proteins associated with them in *Arabidopsis thaliana* // Endocytobiosis and Cell Research. – 2017. – V. 28, No. 1. – P. 20–32.

Vandenbussche F., Habricot Y., Condiff A.S., Maldiney R., van der Straeten D., Ahmad

M. HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signaling pathways in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. – 2007. – V. 49. – P. 428–441.

PARTICIPATION OF THE BLUE LIGHT SIGNALING COMPONENTS IN THE REGULATION OF GENE EXPRESSION OF THE PLASTOME TRANSCRIPTION APPARATUS DURING CYTOKININ-DEPENDENT DE-ETIOLATION OF *A. THALIANA*

A.S. Doroshenko, M.N. Danilova

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia,
anastasiya04101993@gmail.com

Abstract. Studies of the chloroplast biogenesis during the de-etiolation of *Arabidopsis thaliana* have shown that the blue light receptors CRY1 and CRY2, as well as the component of the light signal transduction pathway HY5, control the expression of the genes for the transcriptional apparatus of the plastome. Cytokinin-dependent regulation is carried out primarily through the transcriptional factor HY5.

Keywords: *de-etiolation, cryptochromes, photomorphogenesis, cytokinins, gene expression*

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ В ФИТОПАТОГЕНЕЗЕ У РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, НЕСУЩИХ ГЕН ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ ЦИННИИ ZRNaseII

С.М. Ибрагимова, Е.А. Трифонова, Е.А. Филипенко, А.В. Кочетов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия, isola@bionet.nsc.ru

Аннотация. Трансгенные растения картофеля с. Голубизна, несущие ген экстраклеточной рибонуклеазы циннии ZRNaseII под управлением сильного конститутивного промотора 35S ВКМЦ, проявляют устойчивость к заражению *P. infestans*, выражающуюся в задержке симптомов развития инфекции, что дает основание предполагать участие S-подобных РНКаз в системе неспецифического ответа на поражение патогенами.

Ключевые слова: экстраклеточные рибонуклеазы, фитопатогенез, картофель, трансгенные растения, устойчивость к фитопатогенам

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-913-916

Наряду с системой собственного иммунитета, у растений существует система неспецифического ответа на поражение патогенами, выражающаяся в накоплении различных метаболитов и белков. Особый интерес представляют PR-белки (pathogenesis-related proteins). Функции этих белков связаны с защитными реакциями растений в ответ на заражение, и они были идентифицированы именно в пораженных органах растений. В настоящее время они разделены на 17 семейств, согласно своим структурным особенностям и биологической активности. Представители семейства 4 и 10 имеют глюконазную активность, другие семейства – эндохитаназную, и, надо полагать, что такие биологические свойства позволяют им при взаимодействии с патогенами гидролизовать клеточные стенки, разрушать пул их РНК. Наряду с PR-белками, в механизмах защиты от патогенов могут принимать участие экстраклеточные S-подобные рибонуклеазы. Экспрессия в ответ на поранение и атаку патогенов, и экстраклеточная локализация сближают экстраклеточные S-подобные РНКазы с PR-белками. Известно, что экспрессия генов некоторых экстраклеточных РНКаз индуцируется при повреждении тканей, в стареющих органах, при фосфатном голодании, а также при инфицировании тканей растения. Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что S-подобные РНКазы могут быть задействованы в ряде важных биологических процессов, включая формирование неспецифического ответа при заражении патогенами.

Ранее на модельных растениях табака (*N. tabacum* L.) было показано, что ферменты этого класса способны увеличивать неспецифическую защиту растений от вирусов с РНК-геномами [Сангаев и др., 2007]. В то же время, некоторые экстраклеточные PR-белки с рибонуклеазной активностью обладают противогрибковой активностью, хотя этот феномен остается малоисследованным [Galiana et al., 1997; Hugot et al., 2002]. Существует предположение, что РНКазы могут проникать в цитоплазму грибов и останавливать трансляцию, разрушая мРНК. Представителем этого семейства является экстраклеточная РНКазы *Zinnia elegans*. РНКазы *Z. elegans* не детектируется в интактных органах растения, не индуцируется фосфатным голоданием, обработкой перекисью водорода или в ходе старения, но в значительной степени индуцируется через 3-6 часов после поранения. Этот фермент кодируется в виде полипептида длиной 229 аминокислот, включая лидерную

последовательность для экстраклеточной секреции на N-конце [Ye, Droste, 1996].

Картофель – одна из важнейших пищевых культур во всем мире. И одной из главных задач является исследование механизмов устойчивости к такому важному патогену картофеля, как *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, и создание устойчивых сортов путем комбинации традиционных подходов и исследований на молекулярном уровне. Создание генетических моделей, несущих ген экстраклеточной РНКазы, позволит изучать механизмы их фунгицидной активности.

Для конститутивной экспрессии в растениях картофеля ZRNaseII *Zinnia elegans* был использован промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК). Этот промотор обеспечивает конститутивно высокий уровень экспрессии. Известно, что в ответ на атаку патогенов уровень экспрессии PR-белков может достигать значительных величин (5-10% суммарного белка). При этом уровень одного только PR-1 белка может составлять 1-2% суммарного белка [Edreva, 2005]. Такое накопление PR-белков оказывается необходимым для достижения ими токсических концентраций в апопласте и развития общего антимикробного эффекта, так как существует корреляция между уровнем накопления PR-белков и развиваемой устойчивостью [Edreva, 2005]. Использование промотора 35S РНК ВМЦК позволяло рассчитывать на эффективное накопление РНКазы ZRNaseII в апопласте, сравнимое с накоплением PR-белков во время защитного ответа.

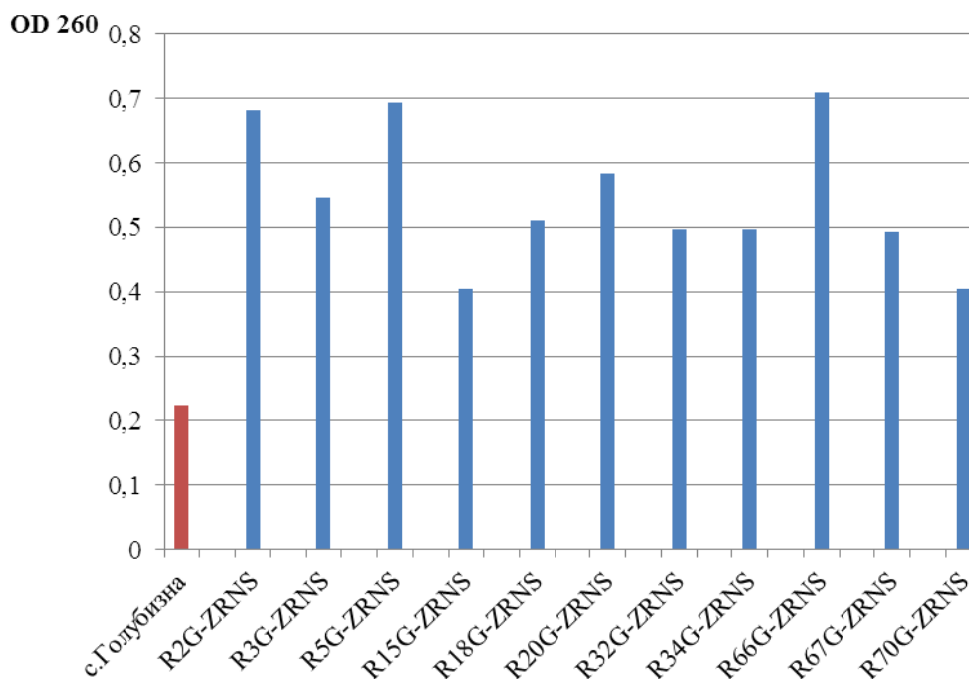


Рисунок. Рибонуклеазная активность грубых листовых экстрактов трансформантов картофеля сорта Голубизна, несущих ген экстраклеточной рибонуклеазы циннии ZRNaseII.

В качестве объекта для проведения генно-инженерных работ был выбран сорт Голубизна, обладающий высокой морфогенетической активностью в культуре *in vitro*. Сорт относится к среднеспелым сортам столового назначения и умеренно восприимчив к фитофторе. В качестве вектора была использована плаزمида pVi121, содержащая ген экстраклеточной РНКазы *Zinnia elegans* под управлением сильного конститутивного промотора 35S РНК ВМЦК [Trifonova et al., 2012]. Было получено 18 трансформантов, устойчивых к канамицину и содержащих T-ДНК инсерцию в геноме. Далее измеряли

РНКазную активность в белковых экстрактах из листьев трансформантов, в результате чего были отобраны 11 растений, уровень нуклеазной активности в апопластах которых в 2-3,5 раза превышал значения, характерные для нетрансгенных растений сорта Голубизна (рисунки).

Оценку устойчивости к фитофторозу проводили на отделенных листьях растений, инокулюм в виде суспензии зооспор помещали на нижнюю часть листовой пластинки, после чего листья помещали в камеры с высокой влажностью и оценивали степень поражения на 6-е и 10-е сутки. Для опыта использовали растения № 2, 5, 18, 20 и 66, нуклеазная активность в листьях которых превышала нетрансгенные растения сорта Голубизна в 3.5 раза и трансгенный образец № 18, активность у которого превышала контроль в 2,5 раза. В качестве дополнительного контроля использовали растения исходного сорта Голубизна и трансгенный образец № 32, полученный нами ранее на основе сорта Никулинский, уровень РНКазной активности в листьях которого превышал контрольные значения в 10 раз. Согласно полученным результатам, на 6-ой день после инокуляции симптомы поражения наблюдали только на листьях нетрансгенных растений сорта Голубизна, в то время как на листьях трансформантов выраженные симптомы поражения не наблюдались. Однако к 10-ому дню трансгенные образцы № 2, 5, 18, 20 также имели все признаки поражения (некротические пятна в местах нанесения суспензии, конидиальный налет вокруг некротических пятен), за исключением образца № 66 и образца № 32 с. Никулинский.

На основе полученных нами результатов, можно сделать предварительные выводы: высокий уровень РНКазной активности в апопласте недостаточен для существенного повышения устойчивости к фитофторе, однако может вызывать некоторую задержку в развитии инфекции. Таким образом, гены этой группы не только принимают участие в защите от РНК-содержащих вирусов, но также могут выполнять вспомогательные функции в системе защиты от патогенных грибов.

Литература

Сангаев С.С., Трифонова Е.А., Титов С.Е., Романова А.В., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Сапоцкий М.В., Малиновский В.И., Кочетов А.В. Эффективная экспрессия гена экстраклеточной рибонуклеазы *Zinnia elegans* в растениях табака *Nicotiana tabacum* SR1 // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 2. – С. 1002–1005.

Edreva A. Pathogenesis – related proteins: research progress in the last 15 years // Gen. Appl. Physiology. – 2005. – V. 31, No. 1-2. – P. 105–124.

Galiana E., Bonnet P., Conrod S., Keller H., Panabieres F., Ponchet M., Poupet A., Ricci P. RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor // Plant Physiol. – 1997. – V. 115. – P. 1557–1567.

Hugot K., Ponchet M., Marais A., Ricci P., Galiana E. A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens // Mol. Plant Microb. Interactions. – 2002. – V. 15, No. 3. – P. 243–250.

Ye Z.H., Droste D.L. Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans* // Plant Mol. Biol. – 1996. – V. 30. – P. 697–709.

Trifonova E.A., Romanova A.V., Sangayev S.S., Sapotsky M.V., Malinovsky V.I., Kochetov A.V. Inducible expression of the gene of *Zinnia elegans* coding for extracellular ribonuclease in the SR1 *Nicotiana tabacum* plants // Biol. Plantarum. – 2012. – V. 56, No. 3. – P. 571–574.

**STUDY OF THE ROLE OF EXTRACELLULAR RIBONUCLEASES IN
PHYTOPATHOGENESIS IN PLANTS BY THE EXAMPLE OF TRANSGENIC
POTATO PLANTS CARRIED WITH THE GENES OF ZRNaseII
EXTRACELLULAR RIBONUCLEASIS OF ZINNIA**

C.M. Ibragimova, E.A. Trifonova, E.A. Filipenko, A.V. Kochetov

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia, *isola@bionet.nsc.ru*

Abstract. Transgenic potato plants cv. Golubizna carrying the gene for extracellular ribonuclease ZRNaseII under the control of the strong constitutive 35S promoter of cauliflower mosaic virus shows some resistance to *P. infestans* infection, manifested in delayed symptoms of infection, suggesting the involvement of S-like RNase in the system of a nonspecific response to pathogen damage.

Keywords: *extracellular ribonuclease, phytopathogenesis, potato, transgenic plants, resistance to phytopathogens*

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНОВ mTERF В РЕАЛИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В МИТОХОНДРИЯХ АРАБИДОПСИСА

А.И. Катышев, Н.Б. Катышева, И.В. Федосеева, Г.Б. Боровский

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *byacky78@mail.ru*

Аннотация. Данная работа посвящена исследованию роли митохондриальных факторов терминации транскрипции mTERF в реализации генетических процессов в митохондриях растений. Молекулярно-биологический анализ гомозиготных, мутантных по отдельным генам mTERF линий арабидопсиса показал, что в ряде из них снижен уровень экспрессии митохондриальных генов, причем характер изменений экспрессии транскрибируемых различными митохондриальными РНК-полимеразами (RpoT_{mp} и RpoT_m) в разных мутантных линиях различен.

Ключевые слова: экспрессия митохондриального генома, РНК-полимераза, транскрипционные факторы, копияность митохондриального генома

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-917-920

Современные исследования регуляции экспрессии митохондриальных генов растений ограничены, в основном изучением, данного процесса на посттранскрипционном уровне с участием белков, содержащих в своей структуре пентатрикопептидные повторы (PPR-белки), а, собственно, на транскрипционном уровне – изучением роли отдельных РНК полимераз в экспрессии митохондриальных генов. Так, в митохондриях арабидопсиса функционируют 2 полимеразы фагового типа – RpoT_m и RpoT_{mp}, последняя из которых имеет двойную локализацию – в митохондриях и в хлоропластах. Показано, что, по крайней мере, в случае RpoT_{mp} для осуществления ее функции необходимо наличие неких неизвестных белковых кофакторов [Kuhn et al., 2007, 2009; также в обзоре Liege, 2011]. В качестве таких потенциальных факторов предлагалось несколько различных кандидатов, включая гомологи бактериального сигма-фактора, отдельные PPR-белки, гомологи обнаруженных у животных митохондриальных транскрипционных факторов (mtTFA и mtTFB) и другие [Liege, 2011]. Достоверных данных, подтверждающих участие этих факторов в экспрессии митохондриальных генов растений, до сих пор не получено. В то же время в последние годы получены данные, показывающие важную роль в реализации генетических процессов в органеллах растений белков-гомологов митохондриального фактора терминации транскрипции (mTERF, рассмотрено в обзоре Klein, 2015), обнаруженного впервые у метазой. У арабидопсиса семейство генов mTERF состоит из 35 представителей. Все гены mTERF кодируют хлоропластные, митохондриальные или имеющие двойную локализацию белки. Гены mTERF на сегодняшний день являются наиболее вероятными кандидатами на роль генов, участвующих в регуляции транскрипции митохондриальных генов. Функция этих генов в реализации генетических процессов в митохондриях арабидопсиса, вероятно, различна. Так, Kuhn с соавторами в 2009 году показали, что в мутантных растениях по RpoT_{mp} помимо снижения экспрессии специфичных для этой полимеразы генов наблюдается усиление экспрессии ряда других митохондриальных генов [Kuhn et al., 2009]. Авторы показали, что такое увеличение содержания транскриптов в митохондриях связано с увеличением копияности митохондриальной ДНК. Увеличение копияности мтДНК в мутантах по гену RpoT_{mp} и соответствующее снижение ее до контрольного уровня в мутантах с компенсацией функции RpoT_{mp} в митохондриях, но

не хлоропластах, показано также и в нашей работе [Tarasenko, 2016]. Эти данные позволяют предположить, что какие-то из интересующих нас mTERF, аналогично mTERF1 животных, могут участвовать также и в модуляции репликации мтДНК.

Целью данной работы является изучение вклада отдельных представителей семейства генов, кодирующих митохондриальные факторы терминации транскрипции (mTERF), в реализацию генетических процессов в митохондриях растений, а также возможное их участие в координации регуляции экспрессии хлоропластных и митохондриальных генов в онтогенезе. Для достижения поставленной цели предполагается использование линий растений арабидопсиса из коллекции семян Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), мутантных по генам mTERF. Для интересующих нас генов mTERF были заказаны мутантные линии из коллекции ABRC, для 2 генов (mTERF24 и mTERF34) не удалось заказать линии со встройкой T-ДНК в транскрибируемой области гена, были заказаны линии с соответствующей встройкой в промоторной области.

Поскольку встройка T-ДНК в промоторной области гена не обязательно может приводить к существенной дисфункции гена, для наименее изученного, но в то же время, согласно нашим предположениям, представляющего наибольший интерес гена mTERF34, было решено получить трансгенные растения арабидопсиса с повышенной и пониженной экспрессией этого гена. Для решения этой задачи были созданы генетические конструкции на основе плазмиды pBI121 с ориентацией кДНК гена mTERF34 в смысловой и антисмысловой ориентации под контролем 35S промотора. Эти конструкции были использованы для трансформации растений арабидопсиса методом окунания цветков, получены трансгенные растения, наличие встройки T-ДНК в которых подтверждено с помощью ПЦР. В итоге нами были впервые получены растения поколения T3 с повышенным и пониженным уровнем экспрессии интересующего нас гена mTERF34. В линии с наиболее высоким уровнем гиперэкспрессии интересующего нас гена количество транскрипта гена mTERF34 выше примерно в 65 раз, чем в контрольных растениях (рис. 1).



Рис. 1. Сравнительный анализ количества мРНК гена mTERF34 в контрольных растениях и растений с гиперэкспрессией этого гена.

Что касается мутантных растений, то на сегодняшний день с помощью ПЦР отобраны гомозиготные линии с мутацией 6 интересующих нас генов mTERF

(mTERF13, mTERF19, mTERF22, mTERF24, mTERF30, mTERF31), для еще двух генов получены только гетерозиготные линии, что, вероятно, связано с эмбриолетальным эффектом мутаций. Соответствие положения встройки Т-ДНК в нужном участке генома арабидопсиса подтверждено секвенированием.

Предварительный молекулярно-биологический анализ гомозиготных мутантных линий с помощью метода ПЦР в реальном времени показал, что в ряде из них снижен уровень экспрессии митохондриальных генов, причем характер изменений экспрессии транскрибируемых различными митохондриальными РНК-полимеразами (RpoTnp и RpoTm) в разных мутантных линиях различен. Так, в линиях растений, мутантных по генам mTERF19 и mTERF22, одинаково снижен уровень транскриптов генов, транскрибируемых обеими полимеразам. В линиях, мутантных по mTERF24 и mTERF30, достоверно снижен уровень мРНК генов, транскрибируемых RpoTm, но не RpoTnp. В линии, мутантной по гену mTERF13, наоборот, достоверно снижается количество мРНК генов, транскрибируемых RpoTnp, но не RpoTm. На рис. 2 представлены результаты одного из экспериментов по определению уровней экспрессии митохондриальных генов в мутантных линиях растений с помощью ПЦР-РВ.

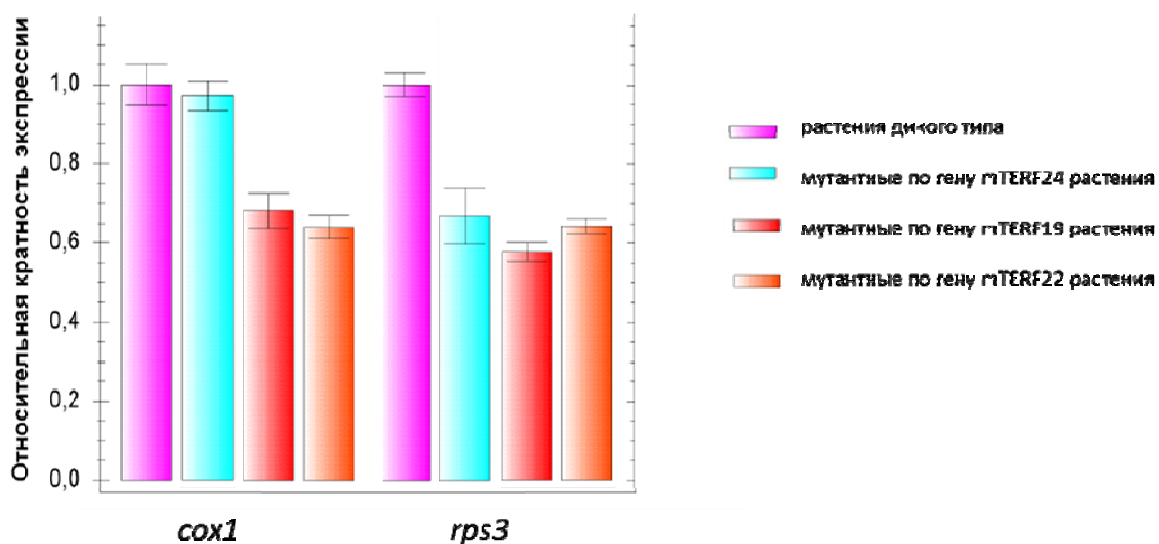


Рис. 2. Сравнительный анализ экспрессии митохондриальных генов в мутантных линиях растений. *cox1* – транскрибируемый RpoTnp митохондриальный ген арабидопсиса, *rps3* – транскрибируемый RpoTm митохондриальный ген арабидопсиса.

В данный момент нами проводится изучение возможной взаимосвязи наблюдаемых изменений экспрессии митохондриальных генов с копийностью митохондриальной ДНК, поскольку предполагается, что некоторые из генов mTERF в растениях, так же, как и у животных, могут участвовать в модуляции репликации ДНК митохондрий. Помимо этого в данный момент проводятся аналогичные исследования изменений экспрессии митохондриальных генов в трансгенных растениях с гипо- и гиперэкспрессией гена mTERF34. С целью изучения возможного участия исследуемых нами генов mTERF в координации регуляции экспрессии митохондриального и хлоропластного геномов исследуется также характер изменений количества транскриптов хлоропластных генов в растениях мутантных линий.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 17-04-01515.

Литература

Klein T., Leister D. Emerging functions of mammalian and plant mTERFs. (Review) // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2015 – V. 1847. – P. 786–797.

Kuhn K., Bohne A.V., Liere K., Weihe A., Börner T. Arabidopsis phage-type RNA polymerases: Accurate in vitro transcription of organellar genes // *Plant Cell*. – 2007. – V. 19. – P. 959–971.

Kuhn K., Richter U., Meyer E.H., Delannoy E., de Longevialle A.F., O'Toole N., Börner T., Millar A.H., Small I.D., Whelan J. Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell*. – 2009. – V. 21. – P. 2762–2779.

Liere K., Weihe A., Börner T. The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation // *Journal of Plant Physiology*. – 2011. – V. 168. – P. 1345–1360.

Tarasenko V.I., Katyshev A.I., Yakovleva T.V., Garnik E.Y., Chernikova V.V., Konstantinov Y.M., Koulintchenko M.V. RPOTmp, an Arabidopsis RNA polymerase with dual targeting, plays an important role in mitochondria, but not in chloroplasts // *Journal of Experimental Botany*. – 2016. – V. 67. – P. 5657–5669.

INVESTIGATION OF INDIVIDUAL MITOCHONDRIAL TRANSCRIPTION TERMINATION FACTORS (mTERFs) ROLE IN REALIZATION OF GENETIC PROCESSES IN ARABIDOPSIS MITOCHONDRIA

A.I. Katyshev, N.B. Katysheva, I.V. Fedoseeva, G.B. Borovskii

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *byacky78@mail.ru*

Abstract. This work is devoted to the study of the role of mitochondrial transcription termination factors (mTERFs) in the implementation of genetic processes in plant mitochondria. Molecular-biological analysis of individual homozygous mTERF-mutant Arabidopsis lines showed that in some of them the level of expression of mitochondrial genes was reduced, and the profiles of the expression of transcribed by different mitochondrial RNA polymerases (RpoTmp and RpoTm) genes varied in individual mutant lines.

Keywords: *expression of the mitochondrial genome, RNA polymerase, transcription factors, the mitochondrial genome copy number*

УЛУЧШЕНИЕ ВНУТРЕННЕЙ УСТОЙЧИВОСТИ СОИ К СТРЕССАМ ПУТЕМ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ФЕНИЛПРОПАНОИДНОГО ЦИКЛА

О.И. Кершанская¹, О.В. Зернова², Д.С. Нелидова², С.Н. Нелидов¹, В.В. Лозовая²

¹Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Институт биологии и биотехнологии растений» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан

²University of Illinois at Urbana-Champaign, USA, gen_o.kersh@mail.ru

Аннотация. Метаболизм фенилпропаноидов генерирует огромное количество вторичных метаболитов. Основная идея исследований – улучшение внутренней устойчивости сои к стрессам путем генетической инженерии фенилпропаноидного цикла, - а именно – введение в сою ключевых генов биосинтеза лигнина – компаунда, вовлеченного в широкий спектр физиологических процессов, участвующих в росте растений, обеспечивающих устойчивость клеточных стенок, - натурального механического барьера для проникновения микропатогенов.

Ключевые слова: *устойчивость к стрессу, фенилпропаноидный цикл, генетическая инженерия, улучшение, соя*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-921-925

Введение. В мировом масштабе потери от болезней сои достигают 11-50% от валовой продукции. Улучшение генетических механизмов резистентности растений является экономичным и устойчивым средством управления болезнями. Попытки усилить природные защитные системы, такие как биосинтез лигнина, методами генетической инженерии могут помочь лимитировать колонизацию микропатогенов [Lozovaya, 2004, 2005]. Создание биотехнологических продуктов нового поколения связано с регулированием ключевых метаболических путей растения, результирующих в улучшении важнейших полигенных признаков, таких как урожай, фотосинтез, устойчивость к стрессам [Martino-Catt, 2008]. На сегодняшний день успехи в генетическом улучшении растений к действию стрессов связаны с манипуляцией одного или нескольких генов, вовлеченных в сигнальные/регуляторные пути, или кодирующие ферменты, вовлеченные в эти пути [Perez-Clemente, 2013]. Важнейшим метаболическим путем создания вторичных метаболитов в растении является фенилпропаноидный цикл. В общем, метаболизм фенилпропаноидов генерирует огромное множество вторичных метаболитов на основе нескольких промежуточных шикиматных циклов. В последние годы различные превосходные обзоры обобщают современные знания о структуре генов, вовлеченных в фенилпропаноидный цикл, в особенности, формирование лигнина и флавоноидов, регуляторные транскрипционные факторы, гормональный контроль путей жасмонатов или ауксинов и эволюции циклов генов первичного метаболизма [Vogt, 2010]. Актуальным многообещающим подходом к улучшению природной устойчивости сои к биотическим стрессам является повышение биосинтеза лигнина как естественного анти-микробного компаунда путем генетической инженерии фенилпропаноидного цикла.

Цель исследований: разработать подходы к улучшению природной устойчивости сои к биотическим стрессам и создать устойчивую сою путем генетической инженерии фенилпропаноидного цикла – повышения биосинтеза лигнина – натурального анти-микробного компаунда улучшения борьбы микро-патогенами, вызывающими болезни.

Объекты и методы исследований. 10 Казахстанских и сортов сои США, транскрипционный фактор лигнификации Cs/PtMYB4; ключевой ген биосинтеза лигнина – 35S/PAL5 (фенилаланин аммония лиазы); ген C₄H/F₅H, кодирующий важнейший продукт лигнификации – ферулат-5-гидроксилазу; ген 35S/CAD1,

кодирующий циннамил алкоголь дегидрогеназу; ген анти-окислительного стресса 35S/FeSOD (Fe-зависимой супероксиддисмутазы). Методы молекулярного клонирования генов; оптимизированная биотехнология *A. tumefaciens*-mediated germ-line генетической трансформации сои; методы молекулярного подтверждения интродукции генов в геном трансгенной сои в первом T₁ и втором T₂ поколениях – ПЦР, РТ-ПЦР, Саузерн и Нозерн блот анализы; скрининг на антибиотики, морфологический анализ, анализ структуры урожая, методы определения содержания и состава лигнина; метаболический профайлинг.

Основные результаты и их новизна. Созданы и применены в генетической трансформации сои генетические конструкции транскрипционного фактора *Cs/MYB4 sens* и основных генов лигнификации: *35S/PAL5*, *C₄H/F₅H*, *35S/CAD1*, а также гена антиокислительного стресса – *FeSOD* (рис. 1).

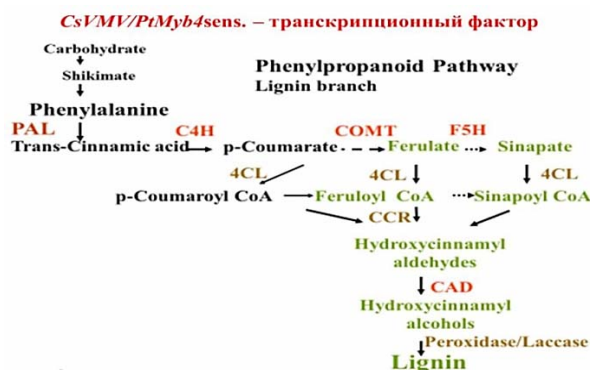


Рис. 1. Семейство транскрипционного фактора лигнификации MYB.

Оптимизирована биотехнология *A. tumefaciens* mediated germ-line генетической трансформации растений сои (рис. 2) [Кершанская, 2012, 2015]. Биотехнология включает в себя: а – процесс пипетирования рыльца пестика цветка суспензией агробактерий *A. tumefaciens* с целевыми генами; б – маркирование обработанных цветков цветными нитями; в – изучение схемы стадий развития цветка сои и его элементов; д-ф – исследование анатомо-морфологической характеристики опыления цветка сои: д – рыльце пестика выпускает вещества, которые привлекают и стимулируют созревание пыльцы, 9:00 утра; е – пыльца соединяется с рыльцем пестика и начинается ее прорастание, 9:15 утра; ф – прорастание пыльцевых трубок внутрь пестика цветка к зиготе, 9:30 утра.



Рис. 2. Отработка техники *A. tumefaciens*-mediated germ-line генетической трансформации сои.

Разработанная биотехнология использована для интродукции ключевых генов биосинтеза лигнина и получения растений сои T_0 с эффективностью формирования бобов 90% от числа трансформированных семян. Проведен скрининг предположительно трансгенных растений на антибиотики с эффективностью около 20%. Получены и подтверждены методами ПЦР и РТ-ПЦР трансгенные растения сои первого поколения T_1 с встроенными в геном генами лигнификации с эффективностью трансформации 5,6% [Kerhanskaya, 2015].

Получены из трансгенов первого поколения и подтверждены методами мультиплексного ПЦР (рис. 3), Саузерн (рис. 4) и Нозерн блот гибридизации трансгенные растения сои второго поколения T_2 с встроенными в геном генами лигнификации с эффективностью трансформации 50-75%. В трансгенных линиях показана активизация ферментов, кодируемых встроенными генами.

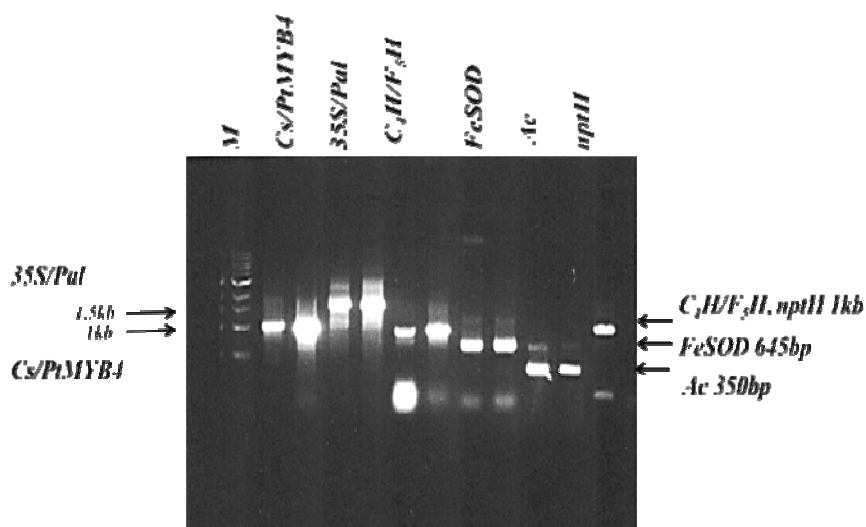


Рис. 3. ПЦР - анализ плазмидной ДНК генетических конструкций генов *Cs/PtMYB4sens.*, *35S/Pal5*, *C₄H/F₅H*, *FeSOD*, *Ac*, *nptII*.

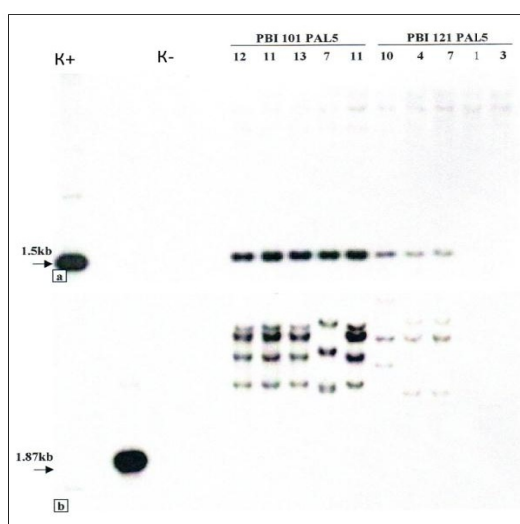


Рис. 4. Саузерн-блот анализ трансгенных растений сои с геном 35S/PAL5.

Подтверждены биохимические изменения содержания лигнина – основного природного барьера для борьбы растений с инфицированием микрорастениями. Подтверждено изменение состава мономеров лигнина – увеличение % содержания

сирингила (S) и/или глицила (G), в связи с активизацией экспрессии встроенных генов. Методом высокоточной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрическим анализом (HPLC-ESI-MS), получены типичная суммарная ионная хроматограмма листьев растения сои (а) и HPLC хроматограмма экстрактов листьев трансгенных растений сорта сои Spencer (b), трансформированных отсутствующими у сои генами *Cs/PtMYB4 sens.* и *Cs/PtAhRS3 sens.* под промотором CsVMV (рис. 5). У трансгенов выявлены дополнительные пики trans-Piceid, cis-Piceid, trans-Resveratrol и cis-Resveratrol. Метаболический профайлинг трансгенных растений сои показал изменение состава и увеличение содержания важнейших метаболитов фенилпропаноидного цикла: флавонолов, фенольных кислот, генистина и сапонинов – антиоксидантов, участвующих в защите растений от биотических стрессов.

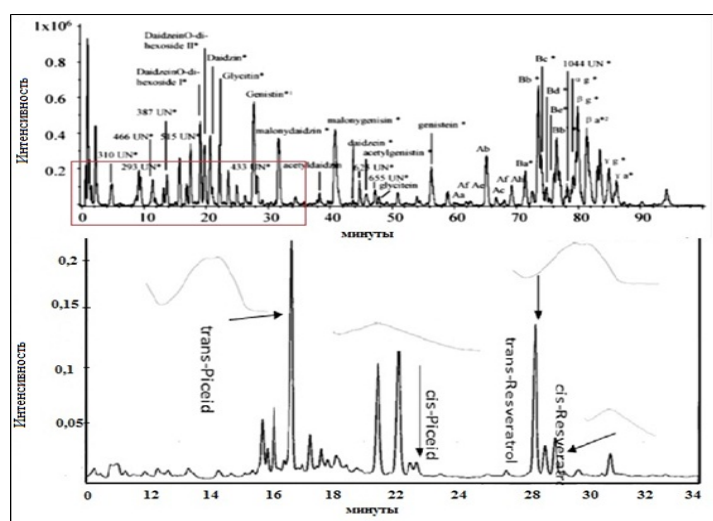


Рис. 5. Ионная хроматограмма метаболитов трансгенных и исходных растений сои.

Можно заключить, что осуществлен переход от Геномики к Метаболомике путем улучшения важнейшего метаболического процесса – фенилпропаноидного цикла в растениях сои методами генетической инженерии для повышения устойчивости к биотическим стрессам – болезням, вызываемым микрорганизмами.

Литература

- Кершанская О.И., Дидоренко С.В., Есенбаева Г.Л. Патент 25950 РК. Способ germ-line генетической трансформации сои. Оpubл. 15.08.2012, Бюл. № 8. – 8 с.
- Kershanskaya O.I., Abdulzhanova M.A., Esenbaeva G.L., Nelidova D.S., Zernova O.V., Lozovaya V.V., Widholm J.M. Improvement of inner soybean diseases resistance by genetic engineering of phenylpropanoid cycle: molecular detection of transgenic plants // *Biotechnology. Theory and practice.* – 2015. – No. 1. – P. 35-47.
- Lozovaya V.V., Lygin A.V., Hartman G.L., Widholm J.M. Biochemical response of soybean roots to *F. solani* f. sp. *Glycines* infection // *Crop Sci. J.*–2004. – V. 44.–P. 819–826.
- Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Widholm J.M. Genetic engineering of plant; disease resistance by modification of the phenylpropanoid pathway // *Plant Biosystems J.*– 2005. – V. 139. – P. 20–23.
- Martino-Catt S.J., Sachs E.S. The Next Generation of Biotech Crops // *Plant Physiology.* – 2008. – V. 147, No. 1. – P. 3–5.
- Perez-Clemente R.M., Vives V., Zandalinas S.I., Climent M.F. Biotechnological approaches to study plant responses to stress // *BioMed Res. International.* – 2013. – P. 10–25.
- Vogt T. Phenylpropanoid Biosynthesis // *Mol. Plant.* – 2010. – No. 3. – P. 2–20.

IMPROVEMENT OF SOYBEAN INNATE RESISTANCE TO STRESS THROUGH GENETIC ENGINEERING OF PHENYLPROPANOID CYCLE

O.I. Kershanskaya¹, O.V. Zernova², D.S. Nelidova², S.N. Nelidov¹, V.V. Lozovaya²

¹Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

²University of Illinois at Urbana-Champaign, USA, gen_o.kersh@mail.ru

Abstract. Phenylpropanoid metabolism generates an enormous array of secondary metabolites based on the few intermediates of the shikimate pathway as the core unit. The main idea of our research is to improve soybean innate resistance to stresses via genetic engineering of the phenylpropanoid pathway, namely – introduction into soybean key genes involved in lignin biosynthesis, – the compound that is assigned to a broad range of physiological processes participating in plant growth, providing the rigidity to the cell walls, the natural mechanical barrier and defense against pathogen penetration.

Keywords: *stress resistance, phenylpropanoid cycle, genetic engineering, improvement, soybean*

АБСЦИЗОВАЯ КИСЛОТА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ СИГНАЛ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ У *PETUNIA HYBRIDA*

Л.В. Ковалева¹, А.С. Воронков^{1,2}, Е.В. Захарова^{3,4}, Ю.В. Минкина⁵

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия, *kovaleva_l@mail.ru*

²Государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет», Орехово-Зуево, Россия, *voronkov_as@mail.ru*

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия, *zakharova_ekater@mail.ru*

⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва, Россия, *zakharova_ekater@mail.ru*

⁵Обнинский институт атомной энергетики — филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск, Россия, *minkina_ylia@mail.ru*

Аннотация. Распределение абсцизовой кислоты (АБК) в пыльниках петунии фертильной и стерильной линий анализировали иммуногистохимическим методом. Развитие фертильного мужского гаметофита сопровождалось монотонным повышением уровня АБК в репродуктивных клетках. Абортация микроспороцитов в профазе мейоза у стерильной линии сопровождалась резким двукратным повышением уровня АБК. Результаты позволили заключить, что АБК включается в PCD микроспороцитов.

Ключевые слова: мужской гаметофит, тапетум, мужская стерильность, PCD, АВА

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-926-930

Мужской гаметофит развивается в пыльнике, в спорангиях которого на первой стадии происходит микроспорогенез, в то время как на второй стадии микроспоры развиваются в зрелые пыльцевые зерна. Во время развития пыльника ткани мужского гаметофита подвергаются уникальным процессам, включая клеточные деления (мейоз), дифференциацию клеток мужского гаметофита, межклеточные взаимодействия между тапетумом и микроспорами. Мейоз, развитие микроспор и созревание пыльцевых зерен обеспечивает полифункциональная ткань тапетума. Образование фертильного мужского гаметофита требует своевременной дегенерации тапетума. Этот процесс является частью программы созревания пыльника, которая приводит к последовательной деструкции тканей пыльника, скоординированной с процессами дифференциации пыльцы. Дезинтеграция тапетума вызывается процессом PCD [Wang et al., 1999]. Такой же эффект наблюдали, если пыльники подвергали гиперосмотическому шоку. Использование TUNEL-реакции, которая метит 3'-концы ДНК, показало, что фрагментация ДНК в основном происходит в клетках локулы стенки пыльника, тапетума и филамента.

В настоящее время молекулярные и гормональные аспекты регуляции микроспорогенеза активно исследуются [Hirano et al., 2008; Dobrovolskaya et al., 2009; De Storme and Geelen, 2014; Zhang and Yang, 2014; Sharma and Nayyar, 2016].

Цель данной работы – установить роль фитогормона абсцизовой кислоты (АБК) в регуляции мужского гаметофита петунии (*Petunia hybrida* L.). На двух линиях (фертильной и стерильной) с использованием иммуногистохимического метода

проведен анализ распределения АБК в тканях пыльника, включая репродуктивные ткани (микроспороциты, микроспоры, пыльцевые зерна) и спорофитные ткани стенки пыльника (тапетум и средние слои) на 4 стадиях развития пыльника: материнские клетки микроспор, мейоз, тетрады микроспор и пыльцевые зерна.

Методика иммуногистологического определения АБК. Бутоны петунии фиксировали в смеси 4% параформальдегида, пропионовой кислоты и 70% этилового спирта в соотношении 5:5:90 (V/V) с добавлением 2% (m/V) 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодиимид гидрохлорида в течение 24 ч при 4 °С [Chen and Zhao, 2008]. Фиксированный материал проводили через серию спиртов (96% абсолютный спирт), парафинизировали, получали полутонкие гистологические срезы и проводили депарафинизацию. Препараты проводили через серию спиртов (70% – 50% – 30% – 15%), помещали в 10 мМ фосфатный буфер (PBS), содержащий 0,1% (V/V) Tween 20, 1,5% глицина и 5% БСА на 20 мин + на 40 мин при 22 °С, промывали в нормальном солевом буфере (НСБ) (10 мМ PBS, 0,8% NaCl, 0,1% (V /V) Tween 20 и 0,8% БСА), а затем три раза в том же буфере без NaCl и Tween 20.

Инкубация с анти-АБК антителами (поликлональные анти-АБК продуцируемые в кролике, AS09446, Agrisera; разведение 1:200) проводили в PBS + БСА (0,1%) в течение ночи при комнатной температуре во влажной камере в темноте. После инкубации образцы несколько раз тщательно промывали в концентрированном солевом буфере (КСБ), содержащем 10 мМ PBS, 2,9% NaCl, 0,1% (V/V) Tween 20 и 0,1% БСА с последующей промывкой в НСБ и буфере без NaCl и Tween 20. Затем проводили инкубацию образцов со вторичными антителами (анти-кроличьи продуцируемые в курице LGG DyLight 350-конъюгированные, 122564, Agrisera; разведение 1:200) проводили в PBS + 0,1% БСА в течение 4 ч, несколько раз тщательно промывали в КСБ, в НСБ и буфере без NaCl и Tween 20, промывали в НСБ и заключали в глицерин [Chen et al., 2010]. Препараты исследовали на флуоресцентном микроскопе (AxioImager Z2 с ApoTome, MRm камеры; набором фильтров №49 – 365 возбуждения, эмиссия 445/50; Carl Zeiss, Германия).

Локализация АБК в развивающихся пыльниках петунии. Высокая интенсивность флуоресценции в пыльниках петунии фертильного клона на стадии материнских клеток микроспор характеризовала ткань тапетума, в то время как на последующих стадиях подобный эффект был характерен для репродуктивной ткани, а именно для микроспор и пыльцевых зерен. Мейотическое деление клеток репродуктивной ткани сопровождалось повышением уровня АБК в репродуктивной ткани на фоне почти постоянного уровня АБК в тапетуме. На стадии тетрад уровень АБК, по-видимому, одинаков в репродуктивных и тапетальных тканях. В зрелом мужском гаметофите наблюдали высокий уровень АБК, почти идентичный уровню на двух предыдущих стадиях развития. На стадии созревания пыльцевых зерен флуоресцентный сигнал АБК не наблюдали в тапетальной ткани, в то время как в средних слоях имело место его постепенное снижение.

Абортация мужского гаметофита петунии на стадии мейоза проходила на фоне преждевременной дегенерации тапетума при полной сохранности средних слоев стенки пыльника. В профазе мейоза наблюдали дезинтеграцию тапетума, которая сопровождалась дегенерацией материнских клеток микроспор и хорошей сохранностью стенки пыльника, которая, по-видимому, увеличивалась в размерах, благодаря повышению числа средних слоев. Как показали наши результаты, абортация материнских клеток микроспор в профазе мейоза вследствие разрушения тапетальной ткани сопровождалась резким повышением уровня АБК в клетках репродуктивной ткани и, напротив, постоянным низким уровнем АБК в тапетуме. В стерильных пыльниках на поздних стадиях наблюдали полное отсутствие репродуктивной ткани и

тапетума. Таким образом, процесс развития фертильного мужского гаметофита, очевидно, включает постоянный уровень АБК как в репродуктивной ткани, так и в тапетуме, в то время как стерильная пыльца на стадии мейоза, в отличие от фертильных пыльников, сопровождается двукратным повышением уровня АБК.

АБК как потенциальный сигнал мужской стерильности. АБК аккумулируется в растениях при нескольких типах абиотического стресса, включая холод, солевой стресс и водный дефицит. Вызываемые стрессом изменения касаются динамики цитоскелета, стабильности тапетума, метаболизма углеводов, накопления АФК, индукции ПКС и сигнальных компонентов [Zhu et al., 2010; Zhang and Yang, 2014]. АБК регулирует ответ на осмотический стресс и обеспечивает устойчивость растений к стрессу через регуляцию большого числа стресс-ответственных генов [Fujita et al., 2011].

Согласно данным [Nirano et al., 2008], хотя у риса гены АБК не показали синхронной экспрессии, однако сигналинг АБК функционировал в пыльниках на стадиях тетрад и трехклеточного пыльцевого зерна. Авторы полагают, что гены АБК также относительно хорошо экспрессируются и во время развития пыльника.

У злаковых АБК играет важную роль в контроле гомеостаза АБК пыльника и устойчивости репродуктивной стадии к абиотическому стрессу. Мужская стерильность чувствительных к засухе пыльников пшеницы связана с накоплением АБК, в то время как устойчивые к засухе пыльники содержат более низкие уровни АБК [Ji et al., 2011].

Как показали результаты, абортация материнских клеток микроспор в профазе мейоза вследствие разрушения тапетума сопровождается резким повышением уровня АБК в репродуктивной ткани и, напротив, его интенсивным снижением в тапетуме.

Растет количество данных о том, что АБК взаимодействует с сигналингом сахаров, активируя ответ растений на стресс [Eckardt, 2002]. У риса, например, аккумуляция АБК в пыльниках, подвергшихся холодовому стрессу (3 суток при 12 °С), совмещается с тапетальным апопластическим транспортом сахаров и индуцирует высокий уровень абортации пыльцы [Oliver et al., 2007]. Так как различия в накоплении АБК коррелируют с экспрессией генов АБК, полагают, что АБК действует как ответный сигнал на стресс, который индуцирует абортацию пыльцы, подавляя апопластический транспорт сахаров в пыльнике. В целом полученные данные поддерживают потенциальную роль АБК в контроле метаболизма сахаров, например, меняя активность инвертазы в мужских репродуктивных органах при стрессе [de Storme and Gleeson, 2014]. Инвертаза является критическим фактором для развития пыльника. Имеется достаточно доказательств, указывающих на то, что АБК может быть потенциальным сигналом регуляции апопластического транспорта сахаров в пыльниках. Экзогенная АБК подавляла в пыльнике ген инвертазы *TaIVR1* или *INV4* у пшеницы. С другой стороны, подавление гена инвертазы снижалось при повышении катаболизма АБК [Ji et al., 2011]. Есть данные, что повышение уровня АБК негативно регулирует экспрессию генов инвертазы [Albacete et al., 2015]. Полагают, что АБК является потенциальным сигналом стресс-индуцированной мужской стерильности и регуляции транспорта сахаров в апопласте пыльника. Приведенные выше данные подтверждают роль АБК в контроле метаболизма сахаров в мужских репродуктивных органах. Инвертаза независимо или в сочетании с фитогормонами регулирует множество процессов роста и развития растений от экспрессии генов до перераспределения питательных веществ [Roitsch and Gonzalez, 2004]. Полагают, что есть связь между проявлением мужской стерильности и изменением активности инвертазы в репродуктивных органах. Установлена ключевая роль инвертазы в транспорте сахарозы из тапетума в апопласт и создании градиента растворимых сахаров в пыльнике [De Storme, Geelen, 2014].

В пыльнике фертильной петунии активность инвертазы была выявлена на стадии мейоза, в то время как на стадии тетрад ее наблюдали на поверхности всего среза пыльника [Dobrovolskaya et al., 2009]. В стерильном пыльнике активность инвертазы выявлялась только после смерти микроспороцитов и возрастала к моменту созревания пыльников, т.е. очевидно, что в этом случае инвертаза участвует в перераспределении неиспользованной сахарозы. Выявленное в данной работе двукратное повышение уровня АБК на стадии мейоза в стерильных пыльниках, по сравнению с фертильными пыльниками, предполагает, что АБК является потенциальным сигналом мужской стерильности и регуляции транспорта сахаров в апопласте пыльника.

Таким образом, развитие фертильного мужского гаметофита петунии сопровождается монотонным повышением уровня АБК в репродуктивных органах и, напротив, их постепенным снижением в клетках тапетума и средних слоев. Абортация микроспороцитов в профазе мейоза, обусловленная преждевременной дегенерацией тапетума при полной сохранности средних слоев, сопровождалась двукратным повышением уровня АБК в репродуктивных клетках. Полученные данные позволяют рассматривать АБК в качестве потенциального сигнала мужской стерильности.

Литература

Albacete A., Cantero-Navarro E., Großkinsky D.K., Arias C.L. Ectopic overexpression of the cell wall invertase gene *CINI* leads to dehydration avoidance in tomato // *J. Exp. Bot.* – 2015. – V. 66. – P. 863–878.

Chen D. Free IAA in stigmas and styles during pollen germination and pollen tube growth of *Nicotiana tabacum* // *Physiologia Plantarum.* – 2008. – V. 134. – P. 202–215.

De Storme N. & Geelen D. The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms // *Plant Cell Environ.* – 2014. – V. 37. – P. 1–18.

Dobrovolskaya A.A., Rodionova G.B., Voronkov A.S., Kovaleva L.V. Sporophyte-gametophyte interactions between anther and male gametophyte in petunia // *Rus. J. Plant Physiology.* – 2009. – V. 56. – P. 394–401.

Eckardt N.A. Abscisic acid biosynthesis gene underscores the complexity of sugar, stress, and hormone interactions // *Plant Cell.* – 2002. – V. 14. – P. 2645–2649.

Fujita Y., Fujita M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants // *J. Plant Res.* – 2011. – V. 124. – P. 509–525.

Hirano K., Aya K., Hobo T., Sakakibara H. et al. Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice // *Plant Cell Physiol.* – 2008. – V. 49. – P. 1429–1450.

Ji X., Dong B., Shiran B., Talbot M.J. Control of ABA catabolism and ABA homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals // *Plant Physiol.* – 2011. – V. 156. – P. 647–662.

Oliver S.N., Dennis E.S., Dolferus R. ABA regulates apoplastic sugar transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice // *Plant Cell Physiol.* – 2007. – V. 48. – P. 1319–1330.

Roitsch T. & González M.C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations // *Trends Plant Sci.* – 2004. – V. 9. – P. 606–613.

Sharma K.D. & Nayyar H. Regulatory networks in pollen development under cold stress // *Front. Plant Sci.* – 2016. – V. 7. – P. 1–13.

Wang M., Hoekstra S., van Bergen S., Lamers G.E., Oppedijk B.J., van der Heijden M.W., de Priester Schilperoort R.A. Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. // *Plant Mol. Biol.* – 1999. – V. 39. – P. 489–501.

Zhang D. & Yang L. Specification of tapetum and microsporocyte cells within the anther // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2014. – V. 17. – P. 49–55.

ABSCISIC ACID AS POTENTIAL SIGNAL OF MALE STERILITY IN *PETUNIA HYBRIDA*

L.V. Kovaleva¹, A.S. Voronkov^{1,2}, E.V. Zakharova^{3,4}, Yu.V. Minkina⁵

¹K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia, kovaleva_l@mail.ru

²Moscow Regional Institution of Higher Education "University for Humanities and Technologies", Orekhovo-Zuyevo, Russia, voronkov_as@mail.ru

³All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia, zakharova_ekater@mail.ru

⁴Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Russian Timiryazev State Agrarian University", Moscow, Russia, zakharova_ekater@mail.ru

⁵Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Obninsk, Russia, minkina_ylia@mail.ru

Abstract. Distribution of abscisic acid (ABA) in anthers of male-fertile and male-sterile lines of petunia was analyzed by immunohistochemical method. Development of fertile male gametophyte was accompanied by monotonous elevation of ABA level in reproductive cells. Abortion of microsporocytes in the meiosis prophase in the sterile line accompanied by two-fold elevation in ABA level in reproductive cells. We conclude that at the meiosis stage ABA is involved in the PCD of microsporocytes.

Keywords: *male gametophyte, tapetum, male sterility, PCD, ABA*

САМОНЕСОВМЕСТИМОСТЬ РНКАЗНОГО ТИПА И ПРОГРАММИРОВАННАЯ КЛЕТОЧНАЯ СМЕРТЬ (PCD)

Л.В. Ковалева¹, Е.В. Захарова^{2,3}, Г.В. Тимофеева¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия, *kovaleva_l@mail.ru*

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва, Россия, *zakharova_ekater@mail.ru*

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия, *zakharova_ekater@mail.ru*

Аннотация. Для *Petunia hybrida* характерна самонесовместимость РНКАзного типа. В системе пыльца-пестик петунии выявлены маркеры PCD. Использовали три метода: окрашивание трипановым синим, ДНК-электрофорез и Tunel-метод. Дополнительное окрашивание DAPI показало, что TUNEL-позитивный сигнал происходит от ядерной ДНК. Результаты позволили сделать вывод, что PCD является детерминантой самонесовместимости РНКАзного типа у петунии.

Ключевые слова: петуния, самонесовместимость РНКАзного типа, PCD, TUNEL

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-931-935

Самонесовместимость – генетически детерминируемый репродуктивный барьер, который во многих семействах покрытосеменных предотвращает самооплодотворение и поддерживает разнообразие вида. Отторжение «своей» пыльцы происходит в процессе узнавания пыльцы и пестика [Takayama, Isogai, 2005]. Это распознавание контролируется детерминантами мужской и женской специфичности (S-пыльцы, S-пестика), кодируемыми мультиаллельными генами на S-локусе. К настоящему времени интенсивные молекулярные исследования проведены на пяти семействах, представители которых обладают самонесовместимостью [Meng et al., 2011]. Три различных типа молекулярного контроля узнавания пыльцы и пестика охарактеризованы в трех семействах: *Brassicaceae*, *Papaveraceae*, *Solanaceae* [Iwano, Takayama, 2012]. У растений с самонесовместимостью *Solanaceae*-типа (семейства *Solanaceae*, *Rosaceae* и *Plantaginaceae*) поведение пыльцы определяется ее собственным S-генотипом (т.е. пыльца признается “своей” и отторгается пестиком только в том случае, если ее гаплотип идентичен одному из двух S-гаплотипов пестика). Установлено, что в механизм самонесовместимости *Solanaceae*-типа включены два тесно связанных гена на S-локусе: (1) ген *S-PHKазы*, контролирующей S-специфичность пестика [Murfett et al., 1994; Sassa et al., 1996]; (2) ген *S-локус F-box* (*SLF* или *SFB*), контролирующей S-специфичность пыльцы [Entani et al., 2003; Kubo et al., 2010, 2016; Williams et al., 2014]. Установлено, что в семействах *Solanaceae*, *Rosaceae* и *Plantaginaceae* – самонесовместимость S-РНКАзного типа: S-РНКАза (S-пестика) ингибирует рост «своих» пыльцевых трубок, деградируя РНК [Takayama and Isogai, 2005; McClure et al., 2011; Iwano and Takayama, 2012]. S-РНКАза пестика и SLF-белки пыльцы в семействах *Solanaceae* и *Plantaginaceae*, SFB в семействе *Rosaceae* (у *Prunus*) или SFB в семействе *Rosaceae* (у *Maloideae*) взаимодействуют в цитоплазме пыльцевых трубок [Liu et al., 2014].

Механизм самонесовместимости S-РНКАзного типа, функционирование которого приводит к ингибированию несовместимых пыльцевых трубок в проводниковых тканях столбика, является наименее изученным в отличие от более доступных для

исследования типов самонесовместимости, при которых несовместимая пыльца немедленно отторгается после ее попадания на поверхность рыльца. Данная работа посвящена одному из дискуссионных вопросов – функционированию программированной клеточной смерти (ПКС) в механизме самонесовместимости S-РНКазного типа в семействе *Solanaceae*, а именно у петунии (*Petunia hybrida* L.). Используя различные цитохимические техники окрашивания, включая TUNEL – окрашивание и анализ ДНК-деградации, выявлена ДНК-фрагментация (характерная черта ПКС растений) в пыльцевых трубках, растущих *in vivo* в тканях пестика после самонесовместимого опыления. Результаты позволили заключить, что у петунии ингибирование роста пыльцевых трубок при функционировании механизма самонесовместимости S-РНКазного типа в проводниковых тканях столбика протекает с участием ПКС.

Материалы и методы. На двух клонах петунии (самосовместимом и самонесовместимом) проводили самоопыление кастрированных накануне цветков. Через 2, 4, 6, 8, 24 ч после опыления пестики фиксировали, используя искусственный спирт (3:1), состоящий из трех частей 96% спирта и одной части ледяной уксусной кислоты.

Визуализация пыльцевых трубок, растущих *in vivo* в проводниковых тканях пестика, была осуществлена с использованием флуоресцентного красителя анилинового голубого. Метод основан на специфической способности флуорохрома соединяться с каллозой, которая входит в состав оболочки пыльцевой трубки и образует каллозные пробки. Мацерацию проводили в 20% спиртовом растворе щелочи (KOH) в течение 20-40 мин. После мацерации пестики дважды промывали дистиллированной водой и заливали 0,01% раствором анилинового голубого на 30-40 мин. Окрашенные пестики переносили на предметное стекло в каплю глицерина с водой (1:1), накрывали покровным стеклом, слегка раздавливали и наблюдали под микроскопом (Zeiss AxioPlan), оснащенным флуоресцентной насадкой.

Для обнаружения ПКС были использованы три метода: окрашивание красителем трипановым синим, ДНК-электрофорез и TUNEL-метод (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).

Окрашивание трипановым синим является специальной техникой для определения ПКС [Waspi et al., 2001]. Краситель связывается с внутриклеточными белками поврежденной клетки и используется для селективного окрашивания мертвых клеток и тканей. Метод окрашивания трипановым синим помогает определить повреждение плазматической мембраны клетки. Пестики фиксировали в искусственном спирте, окрашивали в кипящем спиртовом растворе лактофенола (96% этанол + лактофенол, 1:1), содержащем 0,1 мг мл⁻¹ трипанового синего (Sigma), 1 мин, любой избыток удаляли раствором хлоралгидрата (2,5 мг мл⁻¹) при комнатной температуре. Пестики исследовали под микроскопом (Zeiss AxioPlan).

ДНК-электрофорез – аналитический метод разделения фрагментов ДНК. Геномную ДНК выделяли из опыленных пестиков, замороженных в жидком азоте. Пестики растирали в ступке в мелкий порошок и выделяли ДНК по стандартной методике [Bernatsky, 1986]. ДНК пыльников использовали как позитивный контроль. Электрофорез ДНК проводили в трис-боратном буфере.

TUNEL – метод обнаружения фрагментации ДНК (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), маркируя концевую область нуклеиновых кислот. TUNEL метод является основным методом диагностирования ПКС. Методика визуализации места локализации ПКС в системе пыльца-пестик по TUNEL-методу (деградация ядерной ДНК, а именно, связывание специфических флуоресцентно-меченных антител со свободными 3'-концами полипептидной цепи, образующимися

вследствие ее разрушения) была нами адаптирована с использованием работы [Wang et al., 2009] с модификациями. Через 8-9 ч после самоопыления предварительно кастрированных цветков петунии двух клонов (самосовместимого и самонесовместимого) пестики собирали, фиксировали в растворе: 37% раствор формальдегида:ледяная уксусная кислота:50% этанол (5:5:9) и хранили при 4 °С до использования. Промывали и инкубировали в 1М NaOH 2 ч (для размягчения тканей), дважды промывали дистиллированной водой, инкубировали в 0,01% растворе водорастворимого анилинового голубого в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте. Затем промывали цитратным буфером (рН 4,1) и окрашивали по TUNEL-методу с использованием КИТа (APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit). Эксперимент был повторен трижды в трехкратной повторности. Дополнительное окрашивание ядерным красителем DAPI показало, что TUNEL-позитивный сигнал соответствует ядерной ДНК.

Результаты. Визуализация с помощью анилинового голубого пыльцевых трубок, растущих в проводниковых тканях пестика, показала, что как после совместимого, так и самонесовместимого опылений почти все пыльцевые зерна проросли, и пыльцевые трубки росли по тканям рыльца и столбика. При этом в случае совместимого опыления пыльцевые трубки через 30 ч достигали завязи, где происходило оплодотворение, в то время как после самонесовместимого опыления рост пыльцевых трубок прекращался через 8-9 ч на расстоянии $8 \pm 0,3$ мм от поверхности рыльца вследствие функционирования реакции самонесовместимости S-РНКазного типа.

Эксперименты с трипановым синим показали гибель папиллярных клеток рыльца после всех типов опыления, тогда как в рыльцах, собранных из развивающихся бутонов, окрашивание отсутствовало. В неопыленных рыльцах, собранных из изолированных, предварительно кастрированных цветков, не было найдено ни одного случая ПКС. Различия между окрашенными пыльцевыми трубками при совместимом и несовместимом опылениях были значительными. Так, при самонесовместимом опылении трипановым синим окрашивались 70% видимых пыльцевых трубок и только 17% – при совместимом опылении.

Признаки ПКС (фрагментация ДНК) выявлены с помощью электрофоретического анализа деградации ДНК, аналитического метода разделения фрагментов ДНК. Результаты показали, что деградация ДНК выявлялась в тканях рылец и столбиков петунии самонесовместимого клона через 8 ч после самоопыления, т.е. во время прохождения реакции самонесовместимости. Наложение TUNEL-окрашивания на окрашенные анилиновым голубым пыльцевые трубки позволило визуализировать ядра пыльцевых трубок от ядер клеток пестика (в частности, от ядер папиллярных клеток рыльца, которые тоже претерпевают деградацию в процессе роста пыльцевых трубок). Дополнительное окрашивание специфическим ядерным красителем DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндола) (0,05 г/мл) (метод окраски ядерной ДНК) показало, что TUNEL-позитивный сигнал соответствует ядерной ДНК, процент положительных TUNEL-окрашенных ядер от всех видимых ядер был посчитан в каждом опыте (10 пестиков в трехкратном эксперименте). При несовместимом опылении 68,5 % видимых ядер показывали положительное TUNEL-окрашивание, в то время как при совместимом опылении – только 16,5 %. Полученные данные коррелируют с данными о том, что S-РНКазы, детерминанта самонесовместимости в пестике у *Pyrus pyrifolia* (сем. *Rosaceae*), участвует в отторжении своей пыльцы, запуская деградацию ДНК в несовместимых пыльцевых трубках [Wang et al., 2010]. Они установили, что после несовместимого опыления TUNEL-позитивный сигнал в пыльцевых трубках достигал $62,7 \pm 8,1\%$ от всех ядер, а после совместимого опыления этот сигнал обнаруживался только в $8,8 \pm 2,7\%$ ядер [Wang et al., 2010].

Таким образом, тестирование гипотезы об участии ПКС в механизме S-РНКазной самонесовместимости у петунии (*Petunia hybrida*) с использованием четырех методов выявило наличие маркеров ПКС в пыльцевых трубках петунии после самонесовместимого опыления. Положительную реакцию и деградацию ДНК (по фрагментации ДНК) наблюдали в пестиках петунии самонесовместимого клона через 8-9 ч после самоопыления. Следовательно, признаки ПКС, в том числе деградация ДНК, были выявлены в тканях столбика петунии во время прохождения реакции самонесовместимости. Результаты позволяют полагать, что ПКС является детерминантой механизма самонесовместимости S-РНКазного типа у петунии.

Литература

- Bernatsky R., Tanksley S.D. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences // *Genetics*. – 1986. – V. 112. – P. 887–898.
- Bosch M., Franklin-Tong V. E. Self-incompatibility in Papaver: signaling to trigger PCD in incompatible pollen // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59. – P. 481–490.
- Entani T., Iwano M., Shiba H., Che F. S., Isogai A., Takayama S. Comparative analysis of the self-incompatibility (S) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity // *Genes Cells*. – 2003. – V. 8. – P. 203–213.
- Iwano, M., and Takayama, S. Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2012. – V. 15. – P. 78–83.
- Kubo, K. I., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A. M., Hua, Z. Collaborative non-self-recognition system in S-RNase-based self-incompatibility // *Science*. – 2010. – V. 330. – P. 796–799.
- Kubo K.I., Tsukahara M., Fujii S., Murase K., Wada Y., Entani T., Iwano M., Takayama S. Cullin1-P is an essential component of non-self-recognition system in self-incompatibility in *Petunia* // *Plant Cell Physiol.* – 2016. – V. 57. – P. 2403–2416.
- Liu W., Fan J., Li J., Song Y., Li Q., Shang Y., Hue Y. SCF(SLF)-mediated cytosolic degradation of S-RNase is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia hybrida* // *Front. Genet.* – 2014. – V. 5. – article 228.
- McClure B., Cruz-Garcia F., Romero C. Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems // *Annals of Botany*. – 2011. – V. 108. – P. 647–658.
- Meng X., Sun P., Kao T.H. S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia inflata* // *Annals of Botany*. – 2011. – V. 108. – P. 637–646.
- Murfett J., Atherton T. L., Mou B., Gasser C. S., McClure B. A. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection // 1994. – *Nature*. – V. 367. – P. 563–566.
- Sassa H., Nishio T., Kowayama Y., Hirano H., Koba T., Ikehashi H. Self-incompatibility (S) alleles of the *Rosaceae* encode members of a distinct class of the T2/S-ribonuclease superfamily // *Molecular and General Genetics*. – 1996. – V. 250. – P. 547–557.
- Takayama S., Isogai A. Self-incompatibility in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2005. – V. 56. – P. 467–489.
- Thomas S.Q. and Franklin-Tong V.E. Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen // *Nature*. – 2004. – V. 429. – P. 305–309.
- Wang C.L., Wu J., Xu G.H., Gao Y.B., Chen G., Wu J.Y., Wu H.Q., Zhang S.L. S-RNase disrupts tip-localized reactive oxygen species and induces nuclear DNA degradation in incompatible pollen tubes of *Pyrus pyrifolia* // *Cell Sci.* – 2010. – V. 123. – P. 4301–4309.
- Waspi U., Schweizer P., Dulder R. Syringolin reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew // *Plant Cell*. – 2001. – V. 13. – P. 153–161.

Williams J.S., Natale C.A., Wang N., Brubaker T.R., Sun P., Kao T.H. Four previously identified *Petunia inflata* *S*-locus *F*-box genes are involved in pollen specificity in self-incompatibility // Mol. Plant. – 2014. – V.7. – P. 567–569.

S-RNase-BASED SELF-INCOMPATIBILITY AND PROGRAMMED CELL DEATH

L.V. Kovaleva¹, E.V. Zakharova^{2,3}, G.V. Timofeeva¹

¹K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia, *kovaleva_l@mail.ru*

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Russian Timiryazev State Agrarian University”, Moscow, Russia, *zakharova_ekater@mail.ru*

³All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia, *zakharova_ekater@mail.ru*

Abstract. PCD markers were revealed in the pollen-pistil system of petunia characterized by S-RNase-based self-incompatibility. Three methods were used: trypan blue, DNA-electrophoresis and TUNEL method. Additional staining with DAPI showed that TUNEL-positive signal originates from nuclear DNA. The results reliably prove that PCD is a determinant of S-RNase-based self-incompatibility in petunia.

Keywords: *Petunia*, *self-incompatibility of S-RNase-type*, *PCD*, *TUNEL*

ВЛИЯНИЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ НА РАСТЕНИЯ, ВЫРАЩЕННЫЕ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МЕТИЛФОСФОНАТАМИ

Е.В. Коваль¹, Ю.В. Чупрова¹, С.Ю. Огородникова^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Вятский государственный университет», Киров, Россия, *undina2-10@yandex.ru*

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

Аннотация: Изучено влияние цианобактерии (ЦБ) *Nostoc paludosum* на жизнедеятельность растений ячменя, которые выращивали в присутствии метилфосфоновой кислоты (МФК) и глифосата (ГЛ). Инокуляция семян ЦБ уменьшает фитотоксическое действие метилфосфонатов. Предпосевная обработка ЦБ снижает интенсивность процессов перекисного окисления липидов в клетках, оказывает ростстимулирующее действие на растения ячменя, выращенные в присутствии МФК. В опытах с ГЛ протекторное действие ЦБ проявляется в меньшей степени, что, возможно связано с высокой токсичностью ГЛ.

Ключевые слова: метилфосфоновая кислота, глифосат, цианобактерии, ячмень, пластидные пигменты, перекисное окисление липидов

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-936-940

Метилфосфонаты – производные метилфосфоновой кислоты (МФК), которые характеризуются наличием химически стабильной углерод-фосфорной связи [Кононова, Несмеянова, 2002]. МФК является конечным продуктом гидролиза и универсальным маркером фосфорсодержащих отравляющих веществ. МФК устойчива в природных условиях и сохраняется в почве десятилетиями [Савельева и др., 2002]. Известно, что даже в малых концентрациях МФК оказывает влияние на растения и почвенную микрофлору [Огородникова и др., 2004; Ашихмина и др., 2007].

Среди метилфосфонатов широкое распространение получил гербицид глифосат (ГЛ). Глифосат (N-(фосфонометил)-глицин) – неселективный системный гербицид, который используется для борьбы с сорными растениями. Среди гербицидов ГЛ занимает первое место в мире по производству [Шушкова и др., 2009]. Глифосат быстро мигрирует по сосудистой системе растений и наносит им серьезные повреждения. У многолетних растений, выживших после ошибочного опрыскивания, последствия заметны спустя несколько лет [Федтке, 1985].

Цианобактерии (ЦБ) способны выдерживать значительные стрессовые нагрузки благодаря разнообразным физиологическим особенностям [Домрачева, 2005]. В сельском хозяйстве цианобактериальные препараты используются для повышения жизнеспособности растений, как ростстимулирующие средства и иммуномодуляторы.

Цель работы – изучить действие ЦБ *Nostoc paludosum* на жизнедеятельность растений ячменя в условиях загрязнения метилфосфонатами (МФК и ГЛ).

Объектом исследования были растения ячменя сорта Новичок. Семена ячменя проращивали в чашках Петри в присутствии ЦБ *N. paludosum* и без ЦБ. В первой серии опытов семидневные проростки ячменя пересаживали в сосуды на водную среду, в качестве которой использовали питательный раствор Кнопа (контроль), раствор ГЛ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), приготовленный на растворе Кнопа. Во второй серии опытов семидневные проростки ячменя пересаживали в контейнеры с песком, увлажненным раствором МФК (0,05 моль/л), приготовленным на питательном растворе Кнопа. Возраст культуры *N. paludosum* – 5 недель. Титр: $2,6 \cdot 10^7$ кл./мл.

В фазу 2-х листьев оценивали показатели жизнедеятельности растений. Интенсивность процессов ПОЛ изучали по накоплению малонового диальдегида (МДА), который образуется в процессе ПОЛ [Лукаткин, 2002]. Содержание пластидных пигментов анализировали фотометрически в ацетоновой вытяжке [Шлык, 1971]. Для определения показателей линейного роста растений отбирали по 20 растений каждого варианта, измеряли длину побегов и корней.

Переокисление липидов является одним из универсальных механизмов управления внутриклеточным метаболизмом, индуцированное образованием активных форм кислорода [Гонтарь и др., 2006]. Установлено, что ГЛ вызывал активацию процессов ПОЛ в корнях и листьях проростков ячменя. Листья оказались более чувствительны к действию ГЛ, чем корни. Глифосат приводил к повышению накопления МДА в наземных органах, по сравнению с контролем, на 50% (рис. 1А). Обработка семян ЦБ приводила к снижению интенсивности процессов ПОЛ в листьях растений, содержание МДА было ниже, чем в контроле на 59%. Обработка семян ЦБ оказывала протекторное действие на растения ячменя в условиях загрязнения ГЛ. В опытах с действием ГЛ инокуляция семян ЦБ вызывала снижение интенсивности процессов ПОЛ в листьях и корнях ячменя, по сравнению с растениями, которые не подвергались обработке ЦБ.

При воздействии МФК отмечали значительное снижение интенсивности процессов ПОЛ в корнях и листьях опытных растений (рис. 1Б). Инокуляция семян ЦБ не вызывала достоверных изменений содержания МДА в листьях ячменя, но многократно снижала уровень МДА в корнях растений. Цианобактериальная инокуляция семян оказывала защитное действие на растения ячменя, выращенные в условиях загрязнения МФК. Отмечали значительное, в 1,9 раза по сравнению с контролем, снижение накопления МДА в листьях и корнях растений.

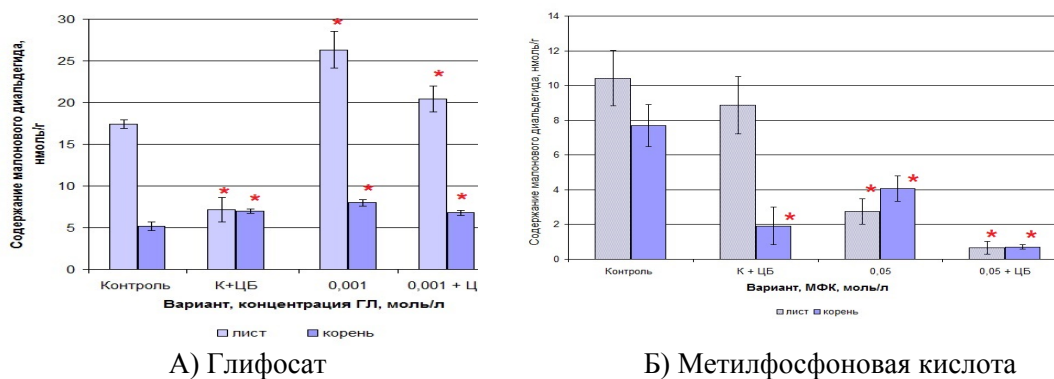


Рис. 1. Влияние метилфосфонатов и обработки семян цианобактерией *N. paludosum* на содержание малонового диальдегида в корнях и листьях ячменя.

Примечание: здесь и далее * – различия между контролем и опытом достоверны при $P \leq 0,05$.

Известно, что каротиноиды входят в состав антиоксидантной системы клетки. При изучении действия ГЛ на растения было установлено, что содержание каротиноидов снижалось во всех вариантах, по сравнению с контролем (табл. 1). Цианобактериальная инокуляция семян вызывала значительное уменьшение накопления каротиноидов в листьях ячменя. В опыте с совместным действием ЦБ и ГЛ отмечали незначительный рост уровня каротиноидов в листьях, по сравнению с растениями, выращенными в присутствии ГЛ.

МФК, напротив, вызывала рост содержания каротиноидов в листьях (табл. 1). Инокуляция семян ЦБ также приводила к повышенному накоплению каротиноидов в

контрольном варианте и в варианте с действием МФК (более, чем в 3 раза от уровня контроля). Выявлена тесная отрицательная корреляция между содержанием МДА в листьях и содержанием желтых пигментов ($r=-0,7$), что может свидетельствовать об эффективной работе антиоксидантной системы в стрессовых условиях.

Изучено накопление зеленых пигментов – хлорофиллов в листьях ячменя. Выявлено, что присутствие в среде выращивания ГЛ приводило к снижению накопления хлорофиллов в листьях на 40% от контроля (табл. 1). Инокуляция семян ЦБ не оказывала протекторного действия на растения, которые выращивали в присутствии ГЛ. Напротив, растения, выращенные в присутствии ГЛ и ЦБ, отличались более низким содержанием хлорофилла.

В опытах с действием МФК, а также с предпосевной инокуляцией семян ЦБ отмечали увеличение содержания хлорофиллов в 1,7 раза от уровня контроля (табл. 1). При совместном действии ЦБ и МФК количество хлорофиллов в листьях было ниже, чем в опыте с действием МФК, однако оставалось в 1,5 раза выше, по сравнению с контролем.

Таблица 1.
Влияние метилфосфонатов и цианобактерии *N. paludosum* на содержание пластидных пигментов в растениях ячменя

Вариант, концентрация, моль/л	Содержание пигментов, мг/г сух. м			
	хлорофилл			каротиноиды
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a+b</i>	
Глифосат, $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л				
Контроль (0)	6,48±0,44	2,55±0,36	9,03	1,10±0,02
Контроль (0)+ЦБ	5,67±0,82	2,98±0,58	8,65	0,46±0,13*
ГЛ ($1 \cdot 10^{-3}$)	2,49±0,41*	1,75±0,34	4,24	0,68±0,04*
ГЛ ($1 \cdot 10^{-3}$)+ЦБ	2,16±0,13*	0,72±0,12*	2,88	0,75±0,02*
Метилфосфоновая кислота, 0,05 моль/л				
Контроль (0)	3,67±0,49	1,02±0,46	4,69	0,79±0,16
Контроль (0)+ЦБ	6,01±0,39*	2,16±0,08*	8,17*	3,24±0,10*
МФК (0,05)	6,05±0,52*	2,33±0,14*	8,38*	3,64±0,11*
МФК (0,05)+ЦБ	5,19±0,23*	1,93±0,09*	7,13*	3,30±0,04*

Изменение ростовых показателей является одним из важных и наиболее легко регистрируемых проявлений токсичности веществ в отношении растений. Установлено, что метилфосфонаты оказывали фитотоксическое действие на проростки ячменя, что проявилось в угнетении ростовых процессов (табл. 2). Наибольшее угнетение роста побегов наблюдали при действии ГЛ. Корни были более чувствительны к действию метилфосфонатов, по сравнению с побегами. Длина корней ячменя, выращенного в присутствии МФК, была на 20% меньше, по сравнению с контролем.

Предпосевная инокуляция семян ЦБ *N. paludosum* стимулировала ростовые процессы органов ячменя. Отмечали фитопротекторное действие ЦБ на растения ячменя, выращенные в присутствии метилфосфонатов. В варианте с совместным действием ЦБ и МФК длина корней и побегов ячменя, была, соответственно, в 1,26 и 1,14 раза выше, чем в контроле. В меньшей степени проявилось защитное действие ЦБ на растения, выращенные в присутствии ГЛ, что, по-видимому, обусловлено большей фитотоксичностью ГЛ, по сравнению с МФК. Цианобактерии значительно снижали ростингибирующее действие метилфосфонатов на корни. Возможно, это обусловлено

способом ЦБ обработки растений, и может быть следствием образования растительно-микробного комплекса, который способствует повышению жизнеспособности растений в условиях загрязнения метилфосфонатами.

Таблица 2.

Действие метилфосфонатов и цианобактерии *N. paludosum* на рост органов ячменя

Вариант, концентрация, моль/л	Длина, % к контролю	
	побег	корень
Глифосат, $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л		
Контроль (0)+ЦБ	129	128
ГЛ ($1 \cdot 10^{-3}$)	60*	90
ГЛ ($1 \cdot 10^{-3}$)+ЦБ	72	114
Метилфосфоновая кислота, 0,05 моль/л		
Контроль (0)+ЦБ	113	114
МФК (0,05)	102	78
МФК (0,05)+ЦБ	114	126

Таким образом, загрязнение среды выращивания метилфосфонатами приводит к нарушению жизнедеятельности растений ячменя. Глифосат вызывает активацию процессов ПОЛ в растительных клетках и снижение накопления пластидных пигментов в листьях. В присутствии МФК, напротив, происходит снижение интенсивности процессов ПОЛ и накопление хлорофиллов и каротиноидов в клетках ячменя. Метилфосфонаты вызывают угнетение роста ячменя. Глифосат, по сравнению с МФК, в большей степени ингибирует ростовые процессы. Различия в ответных реакциях растений на действие метилфосфонатов, возможно, обусловлены большей фитотоксичностью ГЛ, по сравнению с МФК.

Инокуляция семян ЦБ *N. paludosum* уменьшает фитотоксическое действие метилфосфонатов, что проявляется как в биохимических изменениях в клетках, так и в показателях линейного роста проростков. Предпосевная обработка ЦБ *N. paludosum* снижает интенсивность процессов ПОЛ в клетках, оказывает ростстимулирующее действие на растения ячменя, выращенные на песчаной культуре, загрязненной МФК. В опытах с ГЛ протекторное действие ЦБ проявляется в меньшей степени, что, возможно, связано с высокой токсичностью ГЛ.

Литература

Ашихмина Т.Я., Кондакова Л.В., Домрачева Л.И., Огородникова С.Ю. Метилфосфоновая кислота как регулятор биологических процессов в экологических системах: действие на микроорганизмы, ферментативную активность и высшие растения // Теоретическая и прикладная экология. – 2007. – № 2. – С. 78–85.

Гонтарь О.Б., Жиров В.К., Хаитбаев А.Х., Говорова А.Ф. Возрастные аспекты адаптации растений в экстремальных условиях // Вестник МГТУ. – 2006. – Т. 9, № 5. – С. 729–734.

Домрачева Л.И. «Цветение» почвы и закономерности его развития. – Сыктывкар: 2005. – 336 с.

Кононова С.В., Несмеянова М.А. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами // Биохимия. – 2002. – Т. 67, Вып. 2. – С. 220–233.

Лукаткин А. С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. – 208 с.

Огородникова С.Ю., Головки Т.К., Ашихмина Т.Я. Реакции растений на фосфорорганический ксенобиотик – метилфосфоновою кислоту // Научные доклады. – Вып. 464. – Сыктывкар: Коми научный центр УрО РАН. – 2004. – 24 с.

Савельева Е.И., Зенкевич И.Г., Кузнецова Т.А., Радилов А.С., Пшеничная Г.В. Исследование продуктов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии // Российский химический журнал. – 2002. – Т. XLVI, № 6. – С. 82–91.

Федтке К. Биохимия и физиология действия гербицидов. – М.: 1985. – 223 с.

Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С. 154–171.

Шушкова Т.В., Васильева Г.К., Ермакова И.Т., Леонтьевский А.А. Сорбция глифосата и его микробная деградация в почвенных суспензиях // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 6. – С. 664–670.

THE INFLUENCE OF CYANOBACTERIA ON BARLEY PLANTS, GROWN IN CONDITIONS OF METHYLPHOSPHONATES POLLUTION

E.V. Koval¹, J.V. Chuprova¹, S.Y. Ogorodnikova^{1,2}

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Vyatka State University», Kirov, Russia, undina2-10@yandex.ru

²Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

Abstract. The effect of *Nostoc paludosum* on the vital activity of barley plants, which was grown in the presence of methylphosphonic acid (MPA) and glyphosat (GL), was studied. Inoculation of seeds of the cyanobacteria (CB) reduces the phytotoxic effect of methylphosphonates. Presowing treatment of the CB reduces the intensity of processes of lipid peroxidation in cells, exerts a growth stimulating effect on barley plants grown in the presence of MPA. In the experiments with GL, the protective action of the CB appears to a lesser degree, which is possibly due to the high toxicity of GL.

Keywords: *methylphosphonic acid, glyphosat, cyanobacteria, barley, plastid pigments, lipid peroxidation*

СОВРЕМЕННАЯ ФИЛОГЕОГРАФИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА *WALDSTEINIA TERNATA* (STEPH.) FRITSCH КАК ОТРАЖЕНИЕ ГЛОБАЛЬНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЧЕТВЕРТИЧНОГО ПЕРИОДА

А.Д. Коновалов^{1,2}, В.В. Павличенко¹, Д.А. Орлова², Е.Д. Золотовская^{1,2}, М.В. Протопопова¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, konovalov.alexey.d@gmail.com, vpavlichenko@gmail.com, marina.v.protopopova@gmail.com

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия, orlova.daria.alexeevna@gmail.com

Аннотация. Работа направлена на исследование современной филогеографической структуры реликтового вида растений *Waldsteinia ternata* на протяжении сибирско-восточноазиатского ареала, дизъюнкция которого возникла в результате воздействия неблагоприятных факторов последних геологических эпох. Результаты молекулярно-генетического анализа свидетельствуют в пользу восточноазиатского происхождения вида, непродолжительной изоляции и возможном существовании миграционных процессов между южносибирскими популяциями.

Ключевые слова: глобальные климатические изменения, филогеография, реликтовые виды растений, рефугиум, молекулярные маркеры

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-941-943

Настоящая работа была направлена на исследование современной филогеографической структуры неморального реликтового вида растений *Waldsteinia ternata* (Steph.) Fritsch (*Rosaceae*) на протяжении его сибирско-восточноазиатского дизъюнктивного ареала. Вид трактуется, как южносибирский эндемик и первоначально описан из его основного местонахождения на северном макросклоне хр. Хамар-Дабан. В Южной Сибири *W. ternata* также известен из изолированных участков ареала в предгорьях Восточного и Западного Саянов. После протяженной дизъюнкции *W. ternata* встречается на Дальнем Востоке. Изолированность западносаянских и дальневосточных популяций от основного местонахождения в комплексе с незначительными морфологическими различиями даёт основание для их выделения в самостоятельные виды – *W. tanzybeica* N.V. Stepanov и *W. maximowicziana* (Terpner) Probat. [Пробатова, 2015]. Дизъюнкция некогда единого ареала вида наиболее вероятно возникла в периоды плейстоценовых оледенений, сопровождающихся неблагоприятными температурными условиями в сочетании с аридизацией климата. Однако в настоящее время нет единого мнения ни о направлениях распространения популяций *W. ternata* в голоцене и о вкладе миграционных процессов в формировании современной структуры вида, ни о систематическом статусе его дистальных популяций.

Поскольку применение морфолого-экологических критериев не позволяет в полной мере решить обозначенные выше вопросы, представляется необходимым привлечение современных молекулярно-генетических методов и подходов. Кроме того, без использования молекулярно-генетических методов анализа сложно судить как о длительности возникшей изоляции между популяциями *W. ternata*, так и о степени лимитированности потока генов между ними в настоящее время.

В работе проводили сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей молекулярно-генетических маркеров ITS1-ITS2, *rpl20-rps12* и *trnV*. Сбор материала осуществляли из популяций с хр. Хамар-Дабан (поймы р. Дулиха и р. Безымянная), в предгорьях Восточного Саяна (р. Белая Зима) и Приморском крае (Дальний Восток, вблизи пос. Сиреневка и Раздольное). Для анализа также были использованы образцы, собранные в предгорьях Западного (р. Большой Кебеж) и Восточного Саяна (р. Олот), хранящиеся в гербариях IRKU и IRK. ДНК выделяли из высушенных листьев с помощью СТАВ метода [Doyle, Doyle, 1987] с модификациями [Протопопова и др., 2015; 2016]. ПЦР проводили с использованием универсальных праймеров [Wang et al., 2009; Utelli, 2000]. Для определения нуклеотидной последовательности регионов ITS1-ITS2 полученные ампликоны лигировали в плазмидный вектор pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific) с последующей трансформацией клеток *E. coli*. Секвенирование ампликонов и плазмид проводили по методу Сэнгера с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v. 3.1 (Applied Biosystems, США) на генетическом анализаторе серии 3500 (Applied Biosystems, США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью алгоритма MUSCLE, филогенетический анализ – методом максимального правдоподобия с учетом оптимальных моделей нуклеотидных замен в MEGA v. 7.0.16. Референтные последовательности были взяты из генетической базы данных GenBank.

Результаты показали наличие минимум четырех гаплотипов хлоропластного региона *rpl20-rps12*. Для приморских популяций выявлено 2 гаплотипа, которые объединялись в общий кластер. Для популяций с хр. Хамар-Дабан и Западного Саяна был характерен третий вариант гаплотипа. Для восточносаянских популяций было выявлено два гаплотипа: один – уникальный; второй – «хамар-дабанского» типа. Анализ *trnV* региона выявил 3 гаплотипа. Первый – был характерен только для приморских популяций, второй, производный от первого варианта, – для популяций с р. Безымянная (хр. Хамар-Дабан) и р. Белая Зима (Восточный Саян). Третий гаплотип – был характерен для популяций с р. Дулиха (хр. Хамар-Дабан), который является, по-видимому, производным от предыдущего гаплотипа. Сравнительный анализ региона ITS1 выявил несколько нуклеотидных вариантов, которые объединялись в отдельные кластеры на филогенетическом дереве. Первый – объединял последовательности приморских популяций («приморский» кластер); второй – популяций с хр. Хамар-Дабан, Восточного и Западного Саянов («сибирский» кластер), третий – приморской (с. Сиреневка), одной из хамар-дабанских популяций (р. Безымянная) и Западного Саяна. Кроме того, у приморских популяций обнаружено несколько переходных вариантов с «сибирским» типом последовательностей. Было также показано, что генетическая дистанция по этому региону между сибирскими и приморскими популяциями существенно ниже, чем таковая между любой из популяций и европейским близкородственным видом *W. geoides* и североамериканским *W. fragarioides*. Внутри «сибирского» кластера, было также выявлено несколько гаплотипов, характерных только для восточносаянских популяций и только для западносаянских популяций. Все эти уникальные гаплотипы являются производными от последовательностей хамар-дабанского типа.

Таким образом, несмотря на наличие четкой генетической дифференциации популяций *W. ternata*, величина генетического расстояния и наличие общих вариантов ITS1-ITS2 региона не позволяют однозначно подтвердить видовой статус приморских и западносаянских популяций. Полученные результаты также свидетельствуют в пользу гипотезы наличия дальневосточных корней у сибирских популяций. Степень выявленных отличий между популяциями с хр. Хамар-Дабан, Восточного и Западного Саянов свидетельствует в пользу их непродолжительной изоляции друг от друга и

возможном существовании миграционных процессов в течение межледниковых периодов, а также, вероятно, о «хамар-дабанском» источнике происхождения восточносибирского из западносибирского генотипов *W. ternata*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-74-10074) и грантов Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 16-34-60135 мол_а_дк, № 16-05-00783). Авторы благодарят ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН за предоставленный доступ к оборудованию и ЦКП «Биоресурсный центр» СИФИБР СО РАН за предоставленный доступ к работе с гербарием, В.В. Чепиногу за помощь в теоретическом обосновании работы, Н.С. Пробатову и Е.А. Пименову за помощь в сборе образцов из Приморского края.

Литература

Пробатова Н.С., Валидизация комбинации *Waldsteinia maximowicziana* (Turpener) Prob. (*Rosaceae*) // Новости систематики высших растений. – 2015. – № 46. – С. 237–238.

Протопопова М.В., Павличенко В.В., Гнутиков А.А., Адельшин Р.В., Чепинога В.В. Использование генетических маркеров для оценки состояния реликтовых видов растений Байкальской Сибири // Вестник РУДН. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2015. – № 4. – С. 28–36.

Протопопова М.В., Павличенко В.В., Коновалов А.Д., Золотовская Е.Д., Байрамова Э.М., Чепинога В.В. Перспективы использования внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) для идентификации редких видов растений на примере рода *Waldsteinia* (*Rosaceae*) // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». – 2016. – Т. 17. – С. 5–11.

Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. – 1987. – V. 19. – P. 11–15.

Utelli A., Roy B., Baltisberger M. Molecular and morphological analyses of European *Aconitum* species (*Ranunculaceae*) // Plant Systematics and Evolution. – 2000. – V. 224. – P. 195–212.

Wang L., Abbott R.J., Zheng W., Chen P., Wang Y., Liu J. History and evolution of alpine plants endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau: *Aconitum gymnandrum* (*Ranunculaceae*) // Molecular Ecology. – 2009. – V. 18, I. 4. – P. 709–21.

CURRENT PHYLOGEOGRAPHIC STRUCTURE OF *WALDSTEINIA TERNATA* (STEPH.) FRITSCH AS A REFLECTION OF QUATERNARY GLOBAL CLIMATE CHANGE

A.D. Konovalov^{1,2}, V.V. Pavlichenko¹, D.A. Orlova², E.D. Zolotovskaya^{1,2}, M.V. Protopopova¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, konovalov.alexey.d@gmail.com, vpavlichenko@gmail.com, marina.v.protopopova@gmail.com

²Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, orlova.daria.alexeevna@gmail.com

Abstract. The study was aimed to the identification of the current phylogeographic structure of relict plant species *Waldsteinia ternata* throughout its Siberian-East Asian range, its disjunction appeared as a result of unfavorable factors influence during the latest geological periods. The results of molecular genetic analysis evident the East Asian origin of the species, the short-term isolation and the possible migrations between the southern Siberian populations.

Keywords: global climate change, phylogeography, relict plant species, refugium, molecular markers

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ И ПОНИЖЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ПРОЦЕСС ПРОРАСТАНИЯ И УСТОЙЧИВОСТЬ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА КУКУРУЗЫ

А.Н. Кравченко, О.А. Клименко

Институт генетики, физиологии и защиты растений, Кишинев, Республика Молдова, *climenco@mail.ru*

Аннотация. В условиях температурного стресса оценены 15 линий кукурузы на уровне мужского гаметофита. Отмечена достоверная зависимость жизнеспособности и устойчивости пыльцы от взаимодействия «генотип×стресс». Выяснено, что между признаками «жизнеспособность пыльцы» и «устойчивость пыльцы» существуют достоверные положительные корреляционные связи. Генотипы W23, Л1362 и МК390 оказались устойчивы, как к повышенной, так и к пониженной температуре и представляют интерес для создания адаптивных гибридов.

Ключевые слова: мужской гаметофит, кукуруза, жизнеспособность пыльцы

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-944-947

В настоящее время исследование по устойчивости мужского гаметофита растений к температурным стрессовым факторам являются весьма важными и актуальными. В первую очередь это связано с проблемой глобального потепления, так как развитие и функционирование пыльцы в условиях повышенных температур во многом обуславливает фертильность растения, которая в свою очередь, является основой пищевой безопасности [Rieu et al., 2017]. Повышенные температуры отрицательно влияют на жизнеспособность и прорастание пыльцы [Harsant et al., 2013]. Изучение влияния как повышенной так и пониженной температур на жизнеспособность пыльцы выявило снижение показателей этого признака в данных стрессовых условиях [Dehestani-Ardakami et al., 2016]. Эффективность оценки устойчивости к повышенной температуре методом проращивания пыльцы *in vitro* отмечена в работе [Yunfei et al., 2018]. В наших исследованиях пыльцу кукурузы проращивали на питательной среде в нормальных условиях (+22...+26 °С), при повышенной температуре (+37 °С) и при пониженной температуре (+10...+12 °С). Определяли показатели жизнеспособности (процент проросших пыльцевых зерен) и устойчивости (отношение показателей жизнеспособности пыльцы в опыте к контролю умноженное на 100 процентов). Всего было изучено 22 генотипа кукурузы. Среди них были выделены те, у которых жизнеспособность пыльцы в контроле была выше 70% (линии Л459, P502, 092, МК390, W47), что составило 22,7% от общего количества генотипов, использованных в опыте. При температуре +37 °С только у 18,2% генотипов жизнеспособность пыльцы была выше 67% (линии Л459, P502, 092, МК390), в то же время при температуре +10 °С данный показатель был выше 64% только у 9% генотипов (линии Л459, МК390). Лучшие линии по жизнеспособности пыльцы в условиях стрессовых температур: Л459 (76,6% (контроль), 67,5% (+37 °С), 64,5% (+10 °С)) и МК390 (94,1% (контроль), 81,1% (+37 °С), 71,4% (+10 °С)). Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что жизнеспособность пыльцы достоверно зависела от факторов (табл. 1) «генотип» (49,95%), «стрессовая температура» (29,87%), а также от их взаимодействия (16,04%). Линия МК390 сохраняла высокую (более 70%) жизнеспособность пыльцы в стрессовых условиях, как и линия Л459 (более 60%). Следует отметить линию Мо17, у которой данный показатель был выше 40%, как при повышенной, так и при пониженной температуре. Линии P502 и 092 сохраняли жизнеспособность пыльцы выше 70% только при повышенной температуре. Выяснено, что линии W47, W23 и 4nW23

характеризовались достоверно более высокой жизнеспособностью пыльцы при пониженной температуре по сравнению с таким же показателем при повышенной температуре. Анализ зависимости изучаемого признака от взаимодействия факторов «генотип» и «стрессовые температуры» показал, что генотипы Фаворит и Р343, Со125 и F2, Р346 и Л276 несущественно отличались друг от друга. Однако восковидный аналог линии Р346 достоверно превосходил показатели исходного генотипа при разных температурах, такая же тенденция была отмечена и для тетраплоидного аналога линии W23.

Таблица 1.

Результаты дисперсионного анализа признака «жизнеспособность пыльцы»

Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F критерий	Уровень значимости
Генотип (А)	602,51	21	28,7	75,8	0,001
Стрессовые температуры (В)	360,33	2	180,16	476,0	0,001
А×В	193,44	42	4,6	12,17	0,001
Остаточная	49,96	132	0,4		
Общая	1206,24	197			

Корреляционный анализ выявил достоверные корреляционные связи между признаками «жизнеспособность пыльцы в контроле» и «жизнеспособность пыльцы при повышенной температуре», а также между признаками «жизнеспособность пыльцы в контроле» и «жизнеспособность пыльцы при пониженной температуре». Коэффициенты корреляции составили 0,68*** и 0,62***, соответственно. Также была достоверна корреляция ($r=0,7***$) между признаками «жизнеспособность пыльцы при +37 °С» и «жизнеспособность пыльцы при +10 °С». Регрессионный анализ выявил, что с увеличением жизнеспособности пыльцы в контроле на 1% (для использованных в опыте генотипов) жизнеспособность пыльцы при +37 °С увеличивается на 0,66%, а при +10 °С – на 0,5%. Коэффициент детерминации изучаемых признаков показывает, что 44,92% изменений признака «жизнеспособность при +37 °С» определены изменениями признака «жизнеспособность пыльцы в контроле», а при температуре +10 °С этот показатель на 10% меньше.

Дисперсионный анализ признаков «устойчивость пыльцы к повышенной температуре» и «устойчивость пыльцы к пониженной температуре» показал достоверную их зависимость от факторов «генотип», «стрессовые температуры», а также взаимодействия данных факторов (табл. 2). Наибольшими показателями устойчивости (в среднем на обоих стрессовых фонах) обладали линии W23 (88,3%), Л1362 (81,8%) и МК390 (80,7%). Отметим, что тетраплоидный аналог линии W23 уступал 36% по этому показателю исходному генотипу. Наименьшими показателями устойчивости характеризовались генотипы МК01 (6,33%), Р346 (12,2%) и Л459 (10,6%). В среднем по опыту, устойчивость генотипов к повышенной температуре была достоверно выше на 12% среднего показателя устойчивости к пониженной температуре. Следует отметить, что у линий 092 и Р346wx1wx1 обработка повышенной температурой вызывала стимуляцию прорастания пыльцевых зерен, при этом устойчивость к пониженной температуре была очень слабой (22,6% и 5,23%, соответственно). Высокие показатели устойчивости только к повышенной температуре

были зарегистрированы у линий Л1866 (89,6%), Со125 (77,3%), Р502 (81,34%). Линии Мо17, W47, 4nW23 отличались более высокими показателями устойчивости к пониженной температуре по сравнению с показателями устойчивости к повышенной температуре.

Таблица 2.

Результаты дисперсионного анализа признака «устойчивость пыльцы»

Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F критерий	Уровень значимости
Генотип (А)	63752,4	17	3750,14	565,6	0,001
Стрессовые температуры (В)	12971,8	1	12971,8	1956,4	0,001
А×В	48627,6	17	2860,45	431,4	0,001
Остаточная	477,4	72	6,63		
Общая	125829,0	107			

Так, у линии Мо17 показатель устойчивости к температуре +10 °С превосходил на 46% показатель устойчивости к температуре +37 °С, у линии 4nW23 разница этих же показателей составила 41%, а у линии W47 – 11%. Обращает на себя внимание тот факт, что у линии W23 при довольно высокой устойчивости к повышенной температуре выявлена стимуляция прорастания пыльцевых зерен пониженной температурой.

Корреляционный анализ показал, что между признаками «жизнеспособность пыльцы» при +37 °С и «устойчивость пыльцы к повышенной температуре», а также между признаками «жизнеспособность пыльцы при пониженной температуре» и «устойчивость пыльцы к пониженной температуре», существуют достоверные корреляционные связи ($r=0,7^{***}$ и $r=0,58^{***}$, соответственно). Коэффициенты детерминации составили $r^2=0,49^{***}$ и $r^2=0,34^{**}$, соответственно. Таким образом, выявлены генотипы с хорошей жизнеспособностью и устойчивостью мужского гаметофита к стрессовым температурам, которые можно использовать в селекционных схемах по созданию устойчивых гибридов кукурузы.

Литература

- Dehestani-Ardakani M., Shafiey F., Tajabadipour A. Effects of heat and cold stresses on pollen grain germination of three male genotypes of pistachio trees // *EC Agriculture*. – 2016. – V. 3.1. – P. 539–547.
- Harsant J., Pavlovic L., Chiu G., Sultmanis S., Sage T.L. High temperature stress and its effect on pollen development and morphological components of harvest index in the C₃ model grass *Brachypodium distachyon* // *J. Exp. Bot.* – 2013. – V. 64. – P. 2971–2983.
- Rieu I., Twell D., Firon N. Pollen Development at high temperature: from acclimation to collapse // *Plant Physiology*. – 2017. – V. 173. – P. 1967–1976.
- Yunfei J., Bueckert R.A., Warkentin T.D., Davis A.R. High temperature effects on *in vitro* pollen germination and seed set in field pea // *Canadian Journal of Plant Science*. – 2018. – V. 98. – P. 71–80.

THE EFFECT OF HIGH AND LOW TEMPERATURES ON VIABILITY AND RESISTANCE OF MAIZE MALE GAMETOPHYTE

A.N. Cravcenco, O.A. Climenco

The Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection of the Moldovan Academy of Sciences, Chisinau, Republic of Moldova, *climenco@mail.ru*

Abstract. Under conditions of temperature stress 15 inbred lines of maize were evaluated. Pollen viability and resistance significantly depended on the interaction of genotype and stress factor. The significant positive correlations between pollen viability and pollen resistance were found. Such genotypes as W23, L1362, MK390 proved to be more resistant both to high and low temperatures and can be used for obtaining adaptive hybrids.

Keywords: *male gametophyte, maize, pollen viability*

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВОДОПОГЛОЩАЮЩЕЙ И ВОДОУДЕРЖИВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ КУКУРУЗЫ НА СТРЕССОВЫХ ОСМОТИЧЕСКИХ ФОНАХ

А.Н. Кравченко, О.А Клименко

Институт генетики, физиологии и защиты растений, Кишинев, Республика Молдова, *climenco@mail.ru*

Аннотация. Исследование водоудерживающей и водопоглощающей способности пыльцы кукурузы в условиях осмотического стресса выявило достоверную зависимость этих признаков от факторов «генотип», «осмотическое давление», а также от взаимодействия данных факторов. Среди изученных линий выделены генотипы с потенциально высокой засухоустойчивостью (N6, A239, L459, XL12). Кроме этого отобрана линия с высокой водопоглощающей способностью (B73). Их предлагается использовать в селекционных схемах на засухоустойчивость.

Ключевые слова: кукуруза, пыльца, осмотический стресс

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-948-951

Признаки гаплоидного генома мужского гаметофита все шире используются в генетико-селекционных исследованиях растений, особенно для анализа и отбора устойчивых к стрессовым факторам генотипов [Ravikumar et al., 2003; Rang et al., 2011; Тоцкий, Лях, 2015]. Также важно изучать закономерности их проявления в эволюционном процессе [Жученко, Кравченко, 1986]. При этом рассмотрение водоудерживающей и водопоглощающей способности с позиции законов термодинамики позволяет более глубоко раскрыть их сущность при анализе засухоустойчивости [Зялалов, 1984]. В наших исследованиях оценивались показатели водоудержания и водопоглощения мужского гаметофита у 15 инбредных линий кукурузы.

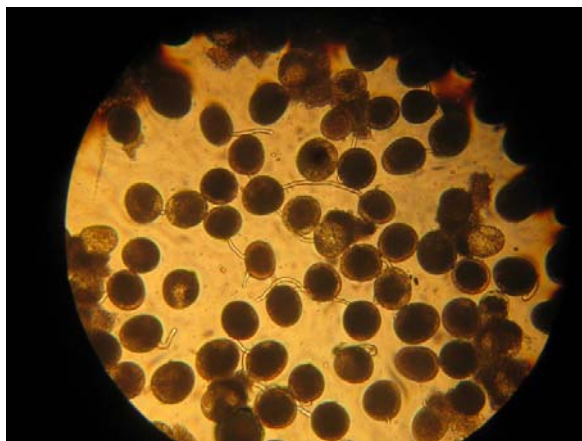


Рис. 1. Свежая пыльца.

Измерялся диаметр свежевывсыпавшейся из пыльников пыльцы (рис. 1), а затем измерялся диаметр пыльцевых зерен в растворах сорбита с концентрацией 20% и 60% (рис. 2), которые создают осмотическое давление 27,2 атм и 81,7 атм, соответственно. Относительно размера свежей пыльцы, вычисляли увеличение или уменьшение диаметра пыльцевых зерен за счет поглощения или потери воды в осмотическом растворе. Коэффициент изменчивости для каждого генотипа определяли по формуле: $КОЭ=O:K\times 100\%$, где O – это размер пыльцевых зерен в осмотическом растворе, а K – это размер свежесобранных пыльцевых зерен.

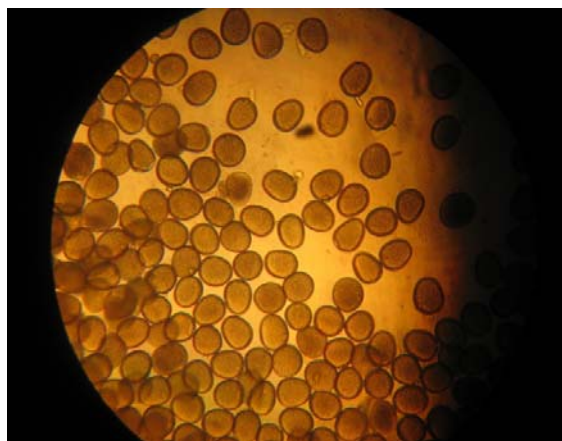


Рис. 2. Пыльца в растворе сорбита.

Полученные результаты обрабатывали по схеме двухфакторного дисперсионного анализа (табл. 1).

Таблица 1.

Результаты дисперсионного анализа

Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F-критерий	Уровень значимости
Генотип (А)	513,44	14	36,67	50,5	0,001
Сорбит (В)	855,32	1	855,32	1177,54	0,001
А×В	934,54	14	66,75	91,9	0,001
Остаточная	43,58	60	0,726		
Общая	2346,87	89			

Выяснено, что на изучаемые признаки (водоудержание или водопоглощение) мужского гаметофита кукурузы достоверно ($P \leq 0,001$) влиял фактор «генотип» (3,2%), фактор «концентрация сорбита» (89,2%) и их взаимодействие (6,95%). Высокая степень влияния фактора «концентрация сорбита» указывает на хорошую чувствительность генотипов к нему, что и способствует более полной оценке исследуемых признаков.

Таблица 2.

Генотипы с хорошей водопоглощающей способностью

Генотип	Размер пыльцевых зерен (единицы окуляр микрометра)	% увеличения (+) или уменьшения (-) размера пыльцевого зерна		Средний % потери воды по генотипу
		20% сорбит	60% сорбит	
XL12	158,6±2,24	+2,0±0,79	-10,2±0,64	-6,1
W47	143,7±1,15	+8,1±1,98	-12,5±1,0	-10,3
B73	128,1±1,37	+17±1,37	+2,0±0,82	+9,5

Как показывают экспериментальные результаты, пыльца таких генотипов как P343 и A239 в растворе сорбита с осмотическим давлением 27,2 атм полностью удерживает воду, то есть обладает большим осмотическим давлением. Линии

P346wx1wx1, P165, Л459 теряют всего около 2,5% воды, линии XL12, W47, В73 поглощают воду из этого раствора в количестве 2%, 8,1% и 17%, соответственно (табл. 2). Следовательно, их цитоплазма обладает более высоким, чем 27,2 атм осмотическим давлением.

На этом же стрессовом фоне дифференцируются линии с плохой водоудерживающей способностью – N6, 276, A285, Mo17, МК390. Особо выделяются линии 092 и P101, которые характеризовались самыми высокими значениями потери воды – 9,3% и 9%, соответственно. Следует отметить особенности проявления изучаемых признаков на осмотическом фоне – 81,7 атмосфер. Установлено, что пыльца линии В73 поглощает воду из этого раствора. Это указывает на более высокое чем 81,7 атм осмотическое давление у цитоплазмы этой линии. Также на этом осмотическом фоне минимальные потери воды были зарегистрированы у линий Л459 и XL12 (9,4% и 10,2%, соответственно), а у линий МК390 и Мо 17 этот показатель находился на самом высоком уровне – 17,2% и 18,9%, соответственно. У остальных 10 линий показатель потери воды изменяется от 11% до 13,1%. Такие линии как 092 и P101 имеют близкие значения потери воды на обоих фонах. Возможно, это говорит об их некоторой стабильности. Такая же закономерность отмечена и для линий N6, W47, Л459.

Таблица 3.

Группы линий в зависимости от показателя потери воды

Потери воды, (%) в среднем на двух фонах	Генотипы	Размер пыльцевых зерен (единицы окуляр микрометра)	Уменьшение (-) или увеличение (+) диаметра пыльцевых зерен, %	
			20% сорбит	60% сорбит
До 5%	N6	139±1,51	-0,63	-7,63
5%-6,01%	A239, Л459, XL12	От 151,9±0,93 до 158,6±2,24	От -2,6 до +2,0	От -9,4 до -11,6
6,6%-7,8%	P346wx1wx1, P165, P343, A285, Л276	От 147,4±1,33 до 159,7±1,71	От -4,2 до -0,1	От -11 до -13,1
10%-10,5%	W47,092, P101	От 143,7±1,15 до 154,2±1,08	От -9,3 до +8,1	От -11,2 до 12,5
12%-12,5%	Mo17, МК390	От 160,1±1,34 до 160,2±2,14	От -6 до -7,8	От -17,2 до -18,9

По среднему проценту потери воды на двух фонах изучаемые линии были разделены на 5 групп (табл. 3). Самая низкая потеря воды была у линии N6 (4,1%), и она относится к 1 группе. Линии A239, Л459, XL12 составляют 2 группу, показатели потери воды у которой до 6,01%. Третья группа линий включает пять генотипов (P346 wx1wx1, P165, P343, A285, Л276), которые в среднем теряют 7,2% воды. У линий W47,092, P101 потери составляют в среднем 10,1% (4 группа). Самая высокая потеря воды (12,2%) характеризует пятую группу линий, в которую входят Mo17 и МК390. Особо следует отметить линию В73, которая на фонах 27,2 атм и 81,7 атм не теряет воду, поглощает ее в среднем на 9,5%. Это указывает на потенциальную устойчивость к засухе этой линии. Полученные экспериментальные результаты показали возможность использования признаков мужского гаметофита кукурузы на осмотическом фоне, что позволяет дифференцировать и отбирать генотипы с хорошей водоудерживающей и водопоглощающей способностью. Среди изученных линий выделены генотипы с

потенциально высокой засухоустойчивостью (N6, A239, L459, XL12). Кроме этого, отобрана линия с высокой водопоглощающей способностью (B73). Предложенный метод может быть использован в схемах селекции кукурузы на засухоустойчивость.

Литература

Жученко А.А., Кравченко А.Н. Некоторые подходы и перспективы гаметной и зиготной селекции растений // Генетические методы ускорения селекционного процесса. – Кишинев: Штиинца, 1986. – С. 5–17.

Зялалов А.А. Физиолого-термодинамический аспект транспорта воды по растению. – Москва: Наука, 1984. – 135 с.

Тоцкий И.В., Лях В.А. Методы гаметофитного отбора на засухоустойчивость у подсолнечника культурного // Научно-технический бюллетень Института олійних культур НААН. – 2015. – № 22. – С. 43–51.

Rang Z.W., Jgadaish S.V.K., Zhou Q.M., Craufurd Q., Heuer S. Effect of high temperature and water stress on pollen germination and spikelet fertility in rice // Environmental and Experimental Botany. – 2011. – V. 70, Issue 1. – P. 58–65.

Ravikumar R., Patil B., Salimath P. Drought tolerance in sorghum by pollen selection using osmotic stress // Euphytica. – 2003. – V. 133. – P. 371.

VARIABILITY OF WATER-RETAINING AND WATER-ABSORBING CAPACITY OF MAIZE POLLEN UNDER CONDITIONS OF OSMOTIC STRESS

A.N. Cravenco, O.A. Climenco

The Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection of the Moldovan Academy of Sciences, Chisinau, Republic of Moldova, *climenco@mail.ru*

Abstract. The study of water-retaining and water-absorbing capacity of maize pollen under conditions of osmotic stress revealed their significant dependence on the factors "genotype", "osmotic pressure", and also on the interaction of these factors. Among the lines studied, genotypes with potentially high drought resistance (N6, A239, L459, XL12) were identified. In addition, a line with a high water-absorbing capacity (B73) was selected. These inbred lines are proposed to be used in breeding schemes for drought resistance.

Keywords: *maize, pollen, osmotic stress*

КЛОНИРОВАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ *SaCLCa1* И *SaCLCc1* СЕМЕЙСТВА ХЛОРИДНЫХ КАНАЛОВ (CLC) ИЗ ГАЛОФИТА *SUAEDA ALTISSIMA* (L.) Pall.

О.И. Неделева¹, А.В. Шувалов¹, Ю.В. Орлова¹, Л.А. Халилова¹, Д.В. Беляев¹, Н.А. Мясоедов¹, О.В. Майорова¹, А.А. Юрченко², Л.Г. Попова¹, Ю.В. Балнокин^{1,3}, И.В. Карпычев¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, olga.nedelyaeva@yandex.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет", Центр геномной биоинформатики им. Ф.Г. Добржанского, Санкт-Петербург, Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Аннотация. Клонировали два гена семейства *CLC* (chloride channel) – *SaCLCa1* и *SaCLCc1* – из галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. Для исследования функции *SaCLCa1* и *SaCLCc1* были экспрессированы в мутанте *Saccharomyces cerevisiae* Δ *gef1*. Экспрессия *SaCLCc1* в Δ *gef1* приводила к восстановлению роста мутанта на селективных средах. Экспрессия *SaCLCa1* восстанавливала рост Δ *gef1* на одной из сред только при замене в селективном фильтре пролина в положении 188 на серин. *SaCLCa1* и *SaCLCc1* экспрессировались во всех органах *S. altissima*. Дефицит NO_3^- в среде стимулировал экспрессию *SaCLCa1*, что особенно заметно в корнях. Предполагается, что *SaCLCa1* транспортирует NO_3^- , тогда как *SaCLCc1* – Cl^- .

Ключевые слова: транспорт ионов, *CLC*, галофит *Suaeda altissima*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-952-956

Семейство хлоридных каналов *CLC* (Chloride channel) включает анионные каналы и анион/ H^+ -антипортеры. Белки семейства *CLC* локализованы в эндомембранах. Они участвуют в стимуляции закисления люмена органелл, накоплении в них анионов (Cl^- и NO_3^-), а, опосредованно, и катионов (Na^+), а также в регуляции трансмембранного электрического потенциала [Zifarelli, Pusch, 2010].

Поскольку белки *CLC* вовлечены в компартментацию Cl^- и Na^+ и в регуляцию трансмембранного потенциала клеточных органелл, мы предположили, что они играют важную роль в солеустойчивости галофитов. Галофит *Suaeda altissima* (сведа высокая) является одним из наиболее солеустойчивых растений, способным произрастать на средах, в которых концентрация NaCl достигает 1 М.

Целью работы являлось клонирование двух генов *CLC*, *SaCLCc1* и *SaCLCa1*, из *S. altissima* и определение функциональной роли белков *SaCLCc1* и *SaCLCa1* путем гетерологичной экспрессии в нокаут-мутанте Δ *gef1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *GEF1* является единственным геном семейства *CLC* у *S. cerevisiae*. *Gef1p* локализован в пост-Гольджи везикулах, тонопласте, плазмалемме и участвует в транспорте Cl^- . Нокаут гена *GEF1* приводит к подавлению роста мутантных клеток на Fe-дефицитных средах с неферментируемыми источниками углерода, на минимальных синтетических средах с высокими рН (7.0 и более), на средах с повышенным содержанием токсичных катионов, в частности Mn^{2+} и $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ [Gaxiola et al., 1998; Lopez-Rodriguez et al., 2007].

Для определения последовательностей генов и их клонирования из корней растений *S. altissima*, выращенных в водной культуре с добавлением 250 мМ NaCl , выделили тотальную РНК. Чтобы клонировать *SaCLCa1* (KX013489.1, GenBank) (1):

секвенировали фрагмент *SaCLCa1*, который был амплифицирован с использованием пары вырожденных праймеров, подобранных к наиболее консервативному участку путем выравнивания последовательностей *CLC* из различных растений; (2): определили полную последовательность *SaCLCa1* методами 3'-, 5'-RACE и (3): на основе полной последовательности выбрали праймеры для клонирования кодирующей части *SaCLCa1* методом In-fusion HD (Clontech) в дрожжевой экспрессионный вектор pMB1.

Опубликование массива коротких прочтений транскриптома (NCBI, SRA, PRJNA279962) близкородственного вида *S. fruticosa* (L.) Forssk. позволило клонировать *SaCLCc1* (MG670589.1, GenBank) другим путем. (1) В собранном нами транскриптом *S. fruticosa* были идентифицированы контиги, содержащие кодирующие регионы (CDS) семи генов, гомологичных генам *CLC A. thaliana*, и по сходству с ними обозначенные как последовательности *SfCLCa/b1*, *SfCLCa/b2*, *SfCLCc1*, *SfCLCc2*, *SfCLCd*, *SfCLCef*, *SfCLCg*. (2) Используя последовательность *SfCLCc1*, выбрали пару праймеров для амплификации и секвенирования фрагмента полной последовательности *SaCLCc1*. Полученный фрагмент был на 99% идентичен соответствующему участку *SfCLCc1*. Основываясь на высоком сходстве частичных последовательностей *SaCLCc1* и *SfCLCc1*, для амплификации полной последовательности *SaCLCc1* выбрали праймеры, расположенные в некодирующих 5'- и 3'-областях *SfCLCc1*. Амплифицированный фрагмент включал полную CDS *SaCLCc1*. (3) Используя полную последовательность, выбрали праймеры для клонирования *SaCLCc1* методом Gibson assembly (NEB) в дрожжевой экспрессионный вектор pMB1.

Трансляция нуклеотидных последовательностей в аминокислотные последовательности показала, что в *SaCLCa1* и *SaCLCc1* присутствуют оба ключевых глутамата, характерных для анион/ H^+ -антипортеров семейства *CLC*. В селективном фильтре G(P/S)GIP у *SaCLCa1* находится пролин, а у *SaCLCc1* – серин. Показано, что серин отвечает за сродство к Cl^- , а пролин – к NO_3^- [Zifarelli, Pusch, 2010].

Для исследования функции *SaCLCa1* и *SaCLCc1* были экспрессированы в полученном нами делеционном дрожжевом мутанте $\Delta gef1::LEU2$. Мутант получили на основе штамма дикого типа *S. cerevisiae* W3031A (МАТа *leu2*, *his3*, *trp1*, *ura3*, *ade2*). В качестве положительного контроля комплементации мутации использовали клонированный в pMB1 ген *AtCLCd*. *AtCLCd* транспортирует Cl^- и восстанавливает рост мутанта $\Delta gef1$, как показано в работе [Lv et al., 2009].

Мутант $\Delta gef1$ был трансформирован конструкциями pMB1-*SaCLCa1*, pMB1-*SaCLCc1* и pMB1-*AtCLCd* литиевым методом. Полученные штаммы высаживали на ряд агаризованных селективных сред [Gaxiola et al., 1998]. В соответствии с данными, представленными в этой работе, в наших экспериментах рост мутанта подавлялся на Fe-дефицитных средах с неферментируемыми источниками углерода (рис. 1, среда 7), на минимальных синтетических средах с pH 7.0 (рис. 1, среда 9, 11), на средах с повышенным содержанием токсичных катионов, в частности Mn^{2+} (рис. 1, среды 2-5).

Рост трансформированного мутанта $\Delta gef1$, экспрессирующего *SaCLCc1*, так же, как и мутанта, экспрессирующего *AtCLCd*, восстанавливался при выращивании клеток на дефицитной по Fe-среде YPEG (2% этанол и 2% глицерин – неферментируемые источники углерода, 1% дрожжевой экстракт, 2% пептон) и на минимальных синтетических средах: SD (2% декстроза – ферментируемый источник углерода, 50 mM Mes-Tris, pH 7.0) и SR (2% раффиноза – неферментируемый источник углерода, 50 mM Mes-Tris, pH 7.0) (рис. 1, среды 7, 9, 11). Восстановление роста трансформантов наблюдалось также при выращивании клеток на богатой среде YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% декстроза), содержащей токсичные ионы Mn^{2+} (рис. 1, среды 2-5).

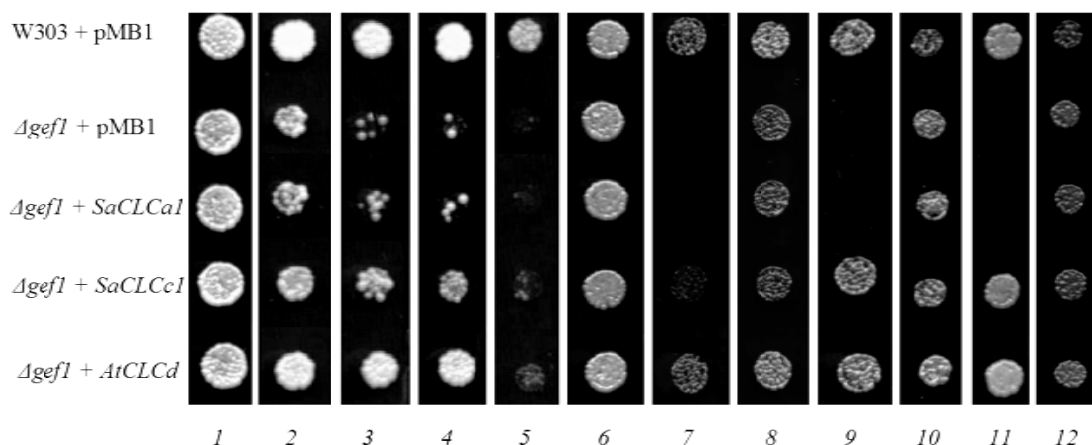


Рис. 1. Рост мутанта *Δgef1*, трансформированного генами *SaCLCc1*, *SaCLCa1* и *AtCLCd*, на селективных средах. Контрольные варианты: дикий тип W303 и мутант *Δgef1*, трансформированные вектором pMB1. Селективные среды: 1 – YPD; 2 – YPD, 2 mM MnCl₂; 3 – YPD, 3 mM MnCl₂; 4 – YPD, 2 mM MnSO₄; 5 – YPD, 3 mM MnSO₄; 6 – YPEG; 7 – YPEG, 1 mM феррозин (хелатор Fe²⁺); 8 – YPEG, 1 mM феррозин, 0,1 mM CuSO₄; 9 – SD, pH 7; 10 – SD, pH 7, 0,1 mM CuSO₄; 11 – SR, pH 7; 12 – SR, pH 7, 0,1 mM CuSO₄. Показано разведение 1:100 – 10⁵ кл/мл.

Экспрессия *SaCLCa1* не приводила к восстановлению роста мутанта *Δgef1* на селективных средах. Однако замена пролина в селективном фильтре *SaCLCa1* в положении 188 на серин привела к частичному восстановлению роста *Δgef1* на среде YPD с повышенным содержанием токсичных катионов Mn²⁺ (рис. 2).

Для оценки уровня экспрессии *SaCLCa1* и *SaCLCc1* в органах *S. altissima* растения вырастили в водной культуре в ряду засоления (0, 250 и 750 mM NaCl) (1) в богатой по содержанию нитрата среде – 15 mM NO₃⁻ и (2) в условиях дефицита нитрата – 0,75 mM NO₃⁻.

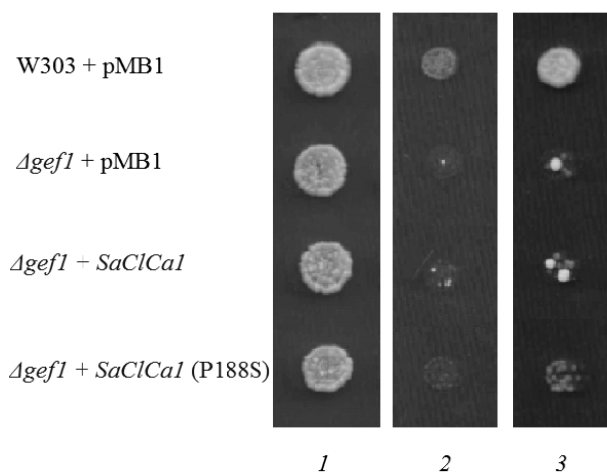


Рис. 2. Рост мутанта *Δgef1*, экспрессирующего *SaCLCa1(P188S)*, на селективных средах. Контрольные варианты: дикий тип W303 и мутант *Δgef1*, трансформированные вектором pMB1. Селективные среды: 1 – YPD; 2 – YPD, 3 mM MnSO₄ (рост в течение 2-х дней); 3 – YPD, 3 mM MnSO₄ (3 дня роста). Показано разведение 1:100 – 10⁵ кл/мл.

Тотальная РНК была выделена из листьев, стеблей и корней растений. Уровень представленности транскриптов оценивали с помощью Real-time PCR относительно актина 7 и фактора элонгации 1-альфа. *SaClCa1* и *SaClCc1* экспрессировались во всех органах *S. altissima*. Дефицит NO_3^- стимулировал экспрессию *SaClCa1* в органах *S. altissima*, особенно в корнях (рис. 3), тогда как засоление в условиях разной доступности NO_3^- влияло на экспрессию *SaClCc1* в гораздо меньшей степени (данные не приведены).

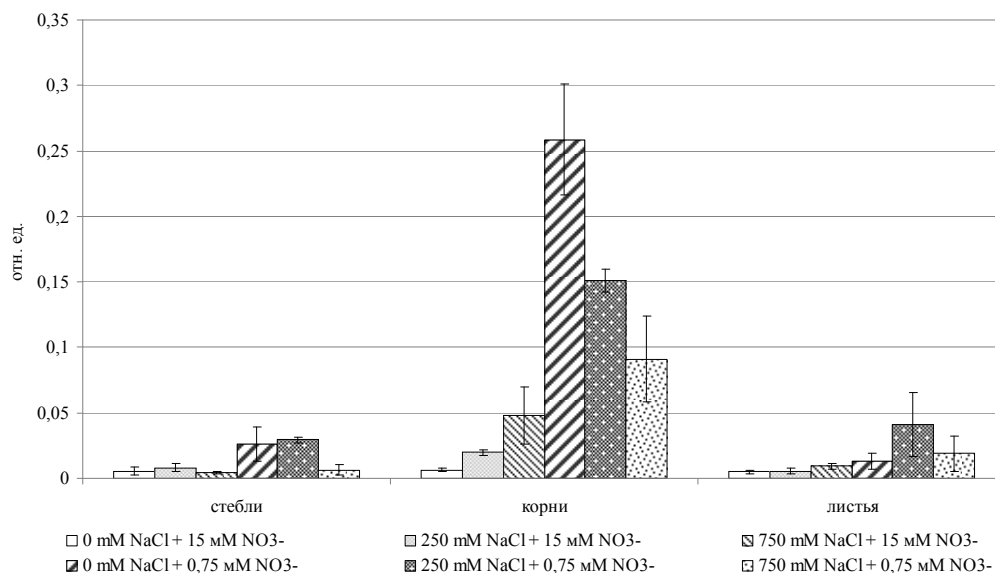


Рис. 3. Уровень представленности транскриптов *SaClCa1* в органах *S. altissima* при разных концентрациях NaCl и NO_3^- в среде выращивания (Real-time PCR) относительно актина. Бары – стандартное отклонение.

Комплементация фенотипа мутанта *Δgef1* геном *SaClCc1* свидетельствует об участии белка *SaClCc1* в транспорте ионов Cl^- . Мы предположили, что восстановление переноса Cl^- в пост-Гольджи везикулы нейтрализует накапливающиеся в люменах положительные заряды при функционировании H^+ -V-АТФазы и Cu^{2+} -АТФазы, стимулируя их этим. Подкисление люмена H^+ -V-АТФазой и поступление в люмен ионов меди необходимо для формирования высокоаффинной системы поглощения железа. Конвертирование $\Delta\phi$ в ΔpH при стимуляции H^+ -V-АТФазы хлоридным транспортером приводит к образованию ΔpH , достаточного по величине для компартиментации токсичных ионов Mn^{2+} , и, следовательно, к восстановлению роста мутанта *Δgef1*, экспрессирующего *SaClCc1*, на средах, содержащих ионы Mn^{2+} .

Отсутствие комплементации мутации *Δgef1* при экспрессии *SaClCa1*, частичное восстановление роста мутанта, экспрессирующего *SaClCa1*(P188S), а также возрастание экспрессии *SaClCa1* в органах *S. altissima* в условиях дефицита NO_3^- в среде выращивания указывают на возможное участие белка *SaClCa1* в транспорте ионов NO_3^- .

Литература

- Gaxiola R.A., Yuan D.S., Klausner R.D., Fink G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1998. – V. 95. – P. 4046–4050.
- Lopez-Rodriguez A., Trejo A.C., Coyne L., Halliwell R.F., Miledi R., Martinez-Torres A. // FEMS Yeast Res. – 2007. – V. 7. – P. 1218–1229.
- Lv Q.D., Tang R.J., Liu H., Gao X.S., Li Y.Z., Zheng H.Q., Zhang H.X. // Plant Science. – 2009. – V. 176. – P. 650–661.

CLONING AND FUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF THE *SaCLCa1* AND *SaCLCc1* GENES OF CHLORIDE CHANNEL FAMILY (CLC) FROM HALOPHYTE *SUAEDA ALTISSIMA* (L.) Pall.

O.I. Nedelyaeva¹, A.B. Shuvalov¹, Yu.V. Orlova¹, L.A. Khalilova¹, D.V. Belyev¹, N.A. Myasoedov¹, O.V. Mayorova¹, A.A. Yurchenko², L.G. Popova¹, Yu.V. Balnokin^{1,3}, I.V. Karpichev¹

¹K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia, olga.nedelyaeva@yandex.ru

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Saint-Petersburg State University", Theodosius Dobzhansky Center for Genome Bioinformatics, Saint-Petersburg, Russia

³Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. *SaCLCa1* and *SaCLCc1*, the genes of the CLC (chloride channel) family were cloned from halophyte *Suaeda altissima* (L.) Pall.. To study functions, *SaCLCa1* and *SaCLCc1* were expressed in the mutant *Saccharomyces cerevisiae* Δ *gef1*. Expression of *SaCLCc1* in Δ *gef1* led to restoration of mutant growth on selective media. Expression of *SaCLCa1* restored the growth of Δ *gef1* on one of the media only when proline was replaced with serine in the selective filter at position 188. *SaCLCa1* and *SaCLCc1* were expressed in all organs of *S. altissima*. Deficiency of NO₃⁻ in the medium stimulated the expression of *SaCLCa1*, especially noticeable in the roots. It is assumed that *SaCLCa1* transports NO₃⁻, whereas *SaCLCc1* - Cl⁻.

Keywords: ion transport, CLC, *Suaeda altissima* halophyte

РОЛЬ ХРОМОСОМ ВТОРОЙ ГОМЕОЛОГИЧЕСКОЙ ГРУППЫ В ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L.

С.В. Осипова^{1,4}, Т.А. Пшеничникова², А.В. Пермяков¹, М.Д. Пермякова¹,
Е.Г. Рудиковская¹, А.А. Дорошков², И.Н. Леонова², В.В. Верхотуров⁵, U. Lohwasser³,
A. Börner³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, svetlanaosipova2@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия, wheatpsh@bionet.nsc.ru

³Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany, boerner@ipk-gatersleben.de

⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия, svetlanaosipova2@mail.ru

⁵Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский национальный исследовательский технический университет», Иркутск, Россия, vervv@mail.ru

Аннотация. На хромосомах 2A и 2D мягкой пшеницы установлены позиции “hot spot” локусов, важных для регуляции ответов на водный дефицит. Биоинформационным анализом обнаружено в общей сложности 55 генов, функции которых взаимосвязаны и реализуются в широком диапазоне биохимических и молекулярных процессов, от регуляции цикла Кребса до регуляции взаимодействия различных сигнальных путей. Идентифицированы кандидатные маркеры для использования в маркер-ассоциированной селекции пшеницы.

Ключевые слова: геном пшеницы, водный дефицит, регуляторные локусы

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-957-961

На длинном плече хромосомы 2D с высокой достоверностью нами были картированы QTLs и выявлены маркеры, связанные с устойчивостью мягкой пшеницы к засухе. Фенотипирование рекомбинантных инбредных линий Чайниз Спринг/Синтетик 6х в контрастных условиях водообеспечения проводили по биомассе главного побега, параметрам газообмена и флуоресценции хлорофилла, содержанию фотосинтетических пигментов, активности липоксигеназы и ферментов аскорбат-глутатионового цикла в листьях. Один из главных QTL был ассоциирован с микросателлитным маркером Xgwm 539 в позиции 97 cM [Osipova et al., 2016; Permyakova et al., 2017]. Биоинформационным анализом было показано, что в позиции 2DL 97 cM локализованы пять белоккодирующих генов, функции которых связаны с ответными реакциями растений на стрессовые условия. Один из принципиально важных генов кодирует *GLK2* (golden2-like) транскрипционный фактор (ТФ), принадлежащий семейству GARP. Установлено, что ТФ этого семейства регулируют клеточную дифференцировку, развитие хлоропластов, участвуют в старении листа, подтверждена связь между *GLKs* и фитогормонами. *GLKs* непосредственно связываются с промоторами светособирающих генов и генов биосинтеза хлорофилла, и действуют как транскрипционные активаторы [Chen et al., 2016]. В той же позиции на хромосоме 2D были выявлены два гена, кодирующие гомологи глутатион-S-трансфераз, многофункциональных ферментов, играющих важнейшую роль в детоксикации и устойчивости к окислительному стрессу. У злаков экспрессия этих

генов индуцировалась засухой, наиболее высокий уровень транскрипции был выявлен у засухоустойчивых генотипов, он коррелировал с показателями продуктивности [Rezaei et al., 2013]. В том же QTL был локализован ген, кодирующий гомологи мембранных белков – пермеаз, которые транспортируют пурины и различные вторичные метаболиты [Jelesko, 2012], а также ген, кодирующий субъединицу мембранного транслоказного комплекса TIM23, который переносит синтезированные в ядре пептиды в митохондрии [Murcha et al., 2007].

На хромосоме 2A, генотипированной SNP – маркерами, было проведено картирование QTL по результатам фенотипирования рекомбинантных линий картирующей популяции Саратовская 29 (Янецкис Пробат 2A) (C29(ЯП2A)). 100 линий C29(ЯП2A) выращивали в двух полевых, двух тепличных вегетациях и одной – в климатической камере Plant Master в контрастных условиях водообеспечения. Фенотипирование линий C29(ЯП2A), выращенных в контролируемых условиях климата, проводили по комплексу вышеперечисленных физиолого-биохимических признаков. Фенотипирование линий, выращенных в полевых и тепличных условиях, проводили по компонентам урожая и фенологическим характеристикам. На длинном плече хромосомы 2A были картированы 2 QTL, ассоциированные с целевыми признаками и их устойчивостью в условиях засухи, в позиции 108.5 – 109.2 сМ и в позиции 102 сМ. Биоинформационным анализом в позиции 2AL 108.5 – 109.2 сМ были выявлены 29 генов, двадцать из которых кодировали регуляторные белки или важные регуляторные субъединицы, участвующие в ответных реакциях на водный стресс. В позиции 2AL 102 сМ были выявлены 13 генов, десять из которых также кодировали важные регуляторные белки. Поскольку многие из этих генов не изучены у *Triticum aestivum* L, об их функциях судили по сведениям, имеющимся для *Arabidopsis thaliana*. Аннотированные гомологи генов, локализованных в позициях 108.5 – 109.2 сМ и 102 сМ, весьма условно можно разделить на функциональные группы (рис. 1 и 2).

Анализ функций генов, выявленных в двух близкорасположенных QTL на хромосоме 2A пшеницы, позволяет предположить, что эти гены объединены в функциональные кластеры (или кластер), реагирующие на водный дефицит.

Локализация в этих кластерах значительного числа генов, регулирующих посттрансляционные модификации белков (ПТМ), подчеркивает роль ПТМ в модификации физиологического статуса растительного организма через регуляцию активности белков, белок-белковых и липид-белковых взаимодействий [Hashiguchi and Komatsu, 2016]. Серин/треонин киназы образуют сигнальные МАРК-каскады, могут активироваться более чем одним типом стресса и выступать в качестве точек пересечения нескольких сигнальных путей [Sinha et al., 2011]. Ацилтрансфераза, имеющая DUF231 домен, необходима для сохранения структурной целостности листа и скоординированных реакций различных ответов на абиотические стрессы, в том числе, детоксикацию АФК [Nafis et al., 2015]. Фосфатидилинозитол N-ацетилглюкозаминилтрансфераза осуществляет гликолипирование белков, играющих ключевые роли в разнообразных биологических процессах.

Помимо генов, функции которых связаны с ПТМ, в двух изученных QTLs локализованы гены, регулирующие важнейшие внутриклеточные процессы: посттранскрипционную экспрессию пластидных и митохондриальных генов; скорость-лимитирующую стадию цикла Кребса, занимающего центральное место в энергетическом обмене; убиквитин-протеасомную систему, которая, помимо регуляции содержания клеточных белков, является центральным регулятором гормональной сигнализации растений; ионные каналы и кальциевую сигнализацию; детоксикацию токсичных альдегидов и кетонов; биосинтез L-аскорбиновой кислоты и другие. Наконец, в QTL на хромосоме 2A локализованы гены семейства АТФ-аз AAA – типа,

которые имеют широкую субклеточную локализацию и участвуют в регуляции транскрипции, сигнальной трансдукции и деградации белков протеасомой.

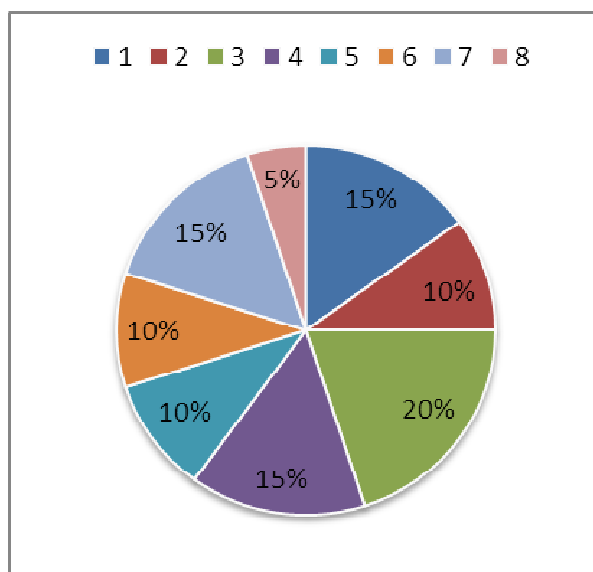


Рис. 1. Функции генов (в процентном соотношении), локализованных в позиции 2AL 108.5 - 109.2 сМ. Гены вовлечены в регуляцию: 1. транскрипции; 2. редактирования РНК; 3. посттрансляционных модификаций; 4. убиквитин-протеасомной системы; 5. липидного метаболизма; 6. редокс реакций; 7. энергетического обмена; 8. деубиквитинизации p53. Аннотированные гомологи. 1 группа: субъединица B7 ядерного фактора Y; 2 субъединицы SWI3A комплекса SWI/SNF; 2 группа: 2 белка, содержащие PPR повторы; 3 группа: 3 протеин киназы, обогащенные лейциновыми повторами; DUF231 ацетилтрансфераза; 4 группа: 2 белка, содержащие F-бокс и DUF-домен; белок, содержащий (UBA)/TS-N домен; 5 группа: субъединица фосфотидилинозитол N-ацетилглюкозаминил трансферазы; фосфолипаза C; 6 группа: 2 альдо-кето редуктазы 4; 7 группа: 2 белка семейства АТФ-аз AAA-типа; изоцитрат дегидрогеназа (НАД); 8 группа: Абро -1 подобная субъединица BRISC комплекса функции изучены у млекопитающих).

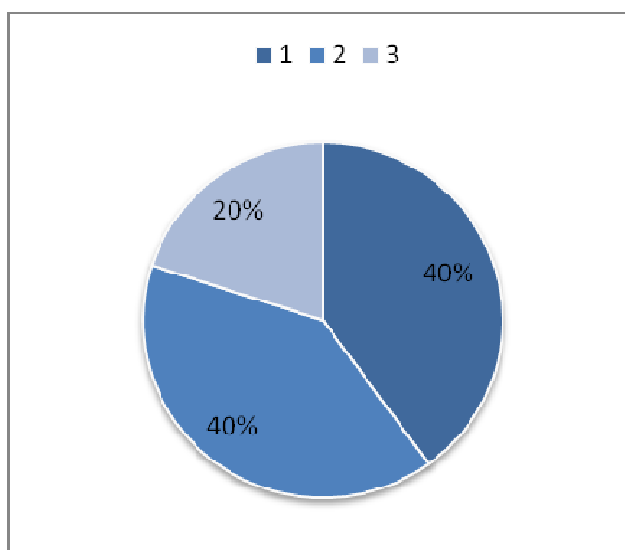


Рис. 2. Функции генов (в процентном соотношении), локализованных в позиции 2AL 102 сМ. Гены вовлечены в регуляцию: 1. пост-трансляционных модификаций; 2. редокс реакций; 3. связывания ионов Ca²⁺. Аннотированные гомологи. 1 группа: четыре специфичные для злаков серин / треонин протеин киназы; 2 группа: три белка семейства цитохромов P450, подсемейство 87; клаваминат синтаза; 3 группа: специфичная для злаков кальций-связывающая пероксигеназа 2; кальций связывающие белки.

По всей вероятности, ремоделирование хроматина с участием нуклеосом ремоделирующего комплекса SWI/SNF играет важную роль в восприятии экологических сигналов и активизации данной генной сети. Предположительно, комплекс SWI/SNF регулирует доступ ТФ NF-Y к зонам промоторов различных генов, контролирующих развитие организма. Известно, что SWI/SNF участвует в регуляции развития листа с помощью хроматин-опосредованной модуляции гормональных сигнальных путей и их взаимодействия [Saez et al., 2008; Sarnowska et al., 2016].

Таким образом, на хромосомах 2A и 2D гексаплоидной пшеницы нам удалось установить позиции “hot spot” локусов, чрезвычайно важных для регуляции ответов на внешние воздействия. Функции многих генов, локализованных в этих локусах, взаимосвязаны и реализуются в широком диапазоне биохимических и молекулярных процессов, от регуляции цикла Кребса до регуляции взаимодействия различных сигнальных путей. Мы идентифицировали также кандидатные маркеры, которые можно использовать в маркер-ассоциированной селекции пшеницы с целью повышения эффективности фотосинтетического аппарата и продуктивности в условиях водodefицита.

Работа поддержана грантами РФФИ 15-04-02762 и 18-04-00481. Все эксперименты были проведены на экспериментальной базе ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН и на экспериментальных базах двух ЦКП ИЦиГ СО РАН «Лаборатория искусственного выращивания растений» и «Селекционно-генетическая лаборатория».

Литература

Chen M., Ji M., Wen B., Liu L., Li S., Chen X., Gao D., Li L. Golden 2-like transcription factors of plants // *Front Plant Sci.* – 2016. – V. 7. – A. 1509.

Hashiguchi A., Komatsu S. Impact of post-translational modifications of crop proteins under abiotic stress // *Proteomes.* – 2016. – V. 4. – P. 42

Jelesko J.G. An expanding role for purine uptake permease-like transporters in plant secondary metabolism // *Front Plant Sci.* – 2012. – V. 3, No. 78. – doi: 10.3389/fpls.2012.00078.

Murcha M. W., Elhafez D., Lister R., Tonti-Filippini J., Baumgartner M., Philippar K., et al. Characterization of the preprotein and amino acid transporter gene family in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2007. – V. 143. – P. 199–212.

Nawrath C., Scheller H.V., Kliebenstein D.J., Sakuragi Y. Acetylation of cell wall is required for structural integrity of the leaf surface and exerts a global impact on plant stress responses // *Front. Plant Sci.* – 2015. – <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00550>.

Osipova S., Permyakov A., Permyakova M. et al. Regions of the bread wheat D genome associated with variation in key photosynthesis traits and shoot biomass under both well watered and water deficient conditions // *J. Appl. Gen.* – 2016. – V. 57. – P. 151–163.

Permyakova M.D., Permyakov A.V., Osipova S.V. et al. Chromosome regions associated with the activity of lipoxygenase in the genome D of *Triticum aestivum* L. under water deficit // *Rus. J. Plant Phys.* – 2017. – V. 64. – P. 28–40.

Rezaei M.K., Shobbar Z.S., Shahbazi M., Abedini R., Zare S. Glutathione S-transferase (GST) family in barley: Identification of members, enzyme activity, and gene expression pattern // *J. Plant. Physiol.* – 2013. – V. 170. – P. 1277–1284.

Saez A., Rodrigues A., Santiago J., Rubio S., P. Rodriguez P.L. HAB1–SWI3B interaction reveals a link between abscisic acid signaling and putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* – 2008. – V. 20. – P. 2972–2988.

Sarnowska E., Gratkowska D.M., Sacharowski S.P., Cwiek P., Tohge T., Fernie A.R., Siedlecki J.A., Koncz C., Sarnowski T.J. The role of SWI/SNF chromatin remodeling

complexes in hormone crosstalk // Trends in Plant Science. – 2016. – V. 21. – P. 594–608.

Sinha A.K., Jaggi M., Raghuramand B., Tuteja N. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress // Plant Signaling & Behavior. – 2011. – V. 6. – P. 196–203.

ROLE OF THE SECOND HOMEOLOGIC GROUP CHROMOSOMES IN THE DROUGH-RESISTANCE OF WHEAT *TRITICUM AESTIVUM* L.

S.V. Osipova^{1, 4}, T.A. Pshenichnikova², A.V. Permyakov¹, M.D. Permyakova¹, E.G. Rudikovskaya¹, A.A. Doroshkov², I.N. Leonova², V.V. Verchoturov⁵, U. Lohwasser³, A. Börner³

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, svetlanaosipova2@mail.ru

²Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia, wheatpsh@bionet.nsc.ru

³Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany, boerner@ipk-gatersleben.de

⁴Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, svetlanaosipova2@mail.ru

⁵Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Irkutsk National Research Technical University», Irkutsk, Russia, vervv@mail.ru

Abstract: The positions of the hot spot loci, which are important for the regulation of responses to water deficiency, were determined on the chromosomes 2A and 2D of soft wheat. Bioinformatics analysis revealed the 55 genes, whose functions are interlinked and are deployed in a wide range of biochemical and molecular processes, from the regulation of the Krebs cycle to the regulation of the interaction of various signaling pathways. Markers for marker-associated wheat breeding have been identified.

Keywords: genome of wheat, water deficiency, regulatory loci

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *STAPHYLOCOCCUS* КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ (БИОТОПЛИВА)

Е.В. Охремчук, С.В. Цинкевич, О.В. Евдокимова, Л.Н. Валентович

Государственное научное учреждение Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь, valentovich@mbio.bas-net.by

Аннотация. В данном исследовании была установлена критическая для роста 5 штаммов бактерий рода *Staphylococcus* концентрация бутанола в питательной среде. Для анализа детерминант, которые могут быть вовлечены в толерантность к органическим растворителям, был секвенирован геном *St. warneri* 22.1, после чего был проведен сравнительный анализ генетических детерминант у различных представителей рода *Staphylococcus* и естественного продуцента бутанола, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

Ключевые слова: *n*-бутанол, *Staphylococcus*, устойчивость к растворителям, аннотация генома

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-962-965

В настоящее время, в связи с проблемой истощения природных ресурсов, исследования в области разработки и усовершенствования технологий получения биотоплива стали глобальным приоритетом. Хорошей альтернативой нефти в качестве топлива является *n*-бутанол [Liu et al., 2017]. На данный момент самой распространенной биотехнологией получения бутанола является микробный синтез с помощью анаэробных бактерий рода *Clostridium*. С развитием метаболической инженерии производство данного соединения стало возможно также и в гетерологичных системах, таких как *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomonas putida* и *Bacillus subtilis*. Однако *n*-бутанол крайне токсичен для большинства микроорганизмов: уже при низких концентрациях спирта ($\approx 2\%$) наблюдается угнетение роста бактерий-продуцентов [Moon et al., 2016].

Бактерии обладают разнообразными механизмами устойчивости к органическим растворителям. Данные механизмы связаны с работой продуктов нескольких групп генов, вовлеченных в функционирование клеточной мембраны [Kanno et al., 2016; Reyes et al., 2011]:

1. Гены эффлюкс-систем и антипортов;
2. Гены транспортеров аминокислот и сахаров;
3. Гены синтеза мембранных липопротеинов;
4. Гены помп, обеспечивающих множественную лекарственную резистентность;
5. Гены белков стрессового ответа.

В последнее время в литературе появились данные о выявлении бутанол-толерантных бактерий: *Staphylococcus aureus* и *St. warneri* [Zhang et al., 2016]. Возможно, данное свойство является общей характеристикой рода, что делает данные микроорганизмы перспективными в качестве объектов метаболической инженерии для создания потенциальных продуцентов бутанола или других органических растворителей.

Целью работы стало установление критической для роста стафилококков концентрации бутанола в питательной среде, а также анализ генетических детерминант, которые обеспечивают высокую стрессоустойчивость представителей рода *Staphylococcus*.

Исследование проводилось на 5 штаммах рода *Staphylococcus*: *St. warneri* 22.1, *St. equorum* PLC, *St. saprophyticus* BSU, *St. aureus* ATCC 25925, *St. aureus* ATCC 6531.

Доступные нам бактерии были исследованы на способность расти в полноценной питательной среде в присутствии различных концентраций бутанола (рисунок).

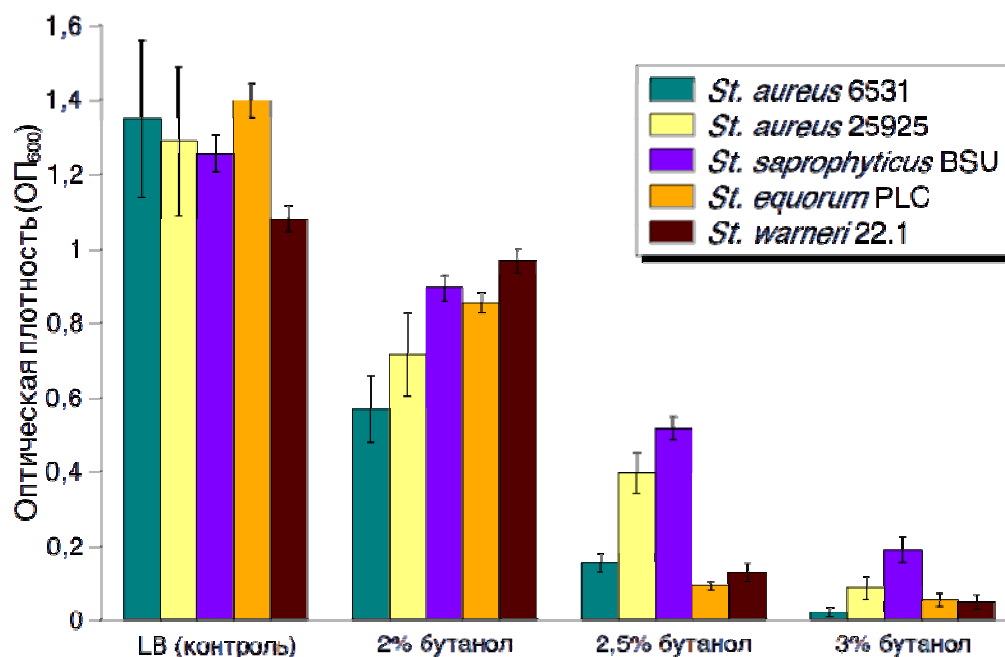


Рисунок. Интенсивность роста штаммов рода *Staphylococcus* в жидкой среде LB с бутанолом (24 часа культивации).

Все исследуемые микроорганизмы хорошо растут в присутствии 2% бутанола. Интенсивность роста бактерий значительно снижается при повышении концентрации бутанола в среде до 2,5%. Бактерии *St. saprophyticus* BSU способны расти в питательной среде, содержащей 3% бутанола [Цинкевич и др., 2017].

Методом газовой хроматографии было установлено, что исследуемые штаммы не метаболизируют бутанол, а лишь обладают устойчивостью к данному веществу. Из этого следует, что в геноме стафилококков имеются генетические детерминанты, определяющие толерантность к органическим растворителям, не связанные с работой метаболических путей по утилизации бутанола.

В ходе работы также был секвенирован геном *St. warneri* 22-1 для дальнейшего анализа детерминант, которые могут быть вовлечены в толерантность данных микроорганизмов к органическим растворителям.

Был проведен количественный анализ генетических детерминант стрессового ответа штаммов рода *Staphylococcus* и *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 (таблица). Данный штамм был выбран для сравнительного анализа по той причине, что он является естественным продуцентом бутанола, и в настоящее время широко используется в производстве.

Выявлено, что наибольшее количество групп генов стрессового ответа присутствует у *Cl. acetobutylicum* ATCC 824. Вероятно, это связано с тем, что данные микроорганизмы являются облигатно анаэробными и для них атмосферный кислород также является стресс-фактором.

Кроме того, количественный анализ показал, что у *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 имеется значительно большее количество групп генов, связанных с работой эффлюкс-помп, обеспечивающих множественную лекарственную резистентность. У всех из исследованных штаммов стафилококков количество данных групп генов составляет 4-6, клостридии же имеют 7 таких групп генов [Brettin et al., 2015].

Таблица.

Сравнение количества генов стрессового ответа у представителей рода *Staphylococcus* и *Cl. acetobutylicum*

Количество групп генов стрессового ответа	Микроорганизм				
	<i>St. warneri</i> 22-1	<i>St. aureus</i> ATCC 25923	<i>St. equorum</i> KS1039	<i>St. saprophyticus</i> ATCC 15305	<i>Cl. acetobutylicum</i> ATCC 824
Осмотический стресс	13	12	15	14	10
Окислительный стресс	28	30	31	29	37
Периплазматический стресс	1	-	-	1	1
Тепловой шок	16	16	15	15	19
Холодовой шок	3	3	3	2	2
Детоксикация	8	10	10	8	13
Без категории	10	10	10	14	7

Примечание. Последовательности геномов *St. equorum* KS1039 (код доступа NZ_CP013114.1), *St. saprophyticus* ATCC 15305 (NC_007350.1), *St. aureus* ATCC 25923 (NZ_CP009361.1) и *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 (NC_003030.1) были получены из БД GenBank. Данные штаммы были выбраны как типичные для своего вида.

Стоит отметить, что устойчивость к органическим растворителям требует дополнительных энергетических затрат. В геноме *St. saprophyticus* были детектированы гены (2-изопропилмалатсинтазы, 3-изопропилмалатдегидрогеназы, *argD*, репрессора аргинин-деиминазного пути и др.), продукты которых участвуют в переносе сахаров и аминокислот в клетку, что способствует выживаемости данных микроорганизмов в присутствии бутанола [Reyes et al., 2016; Brettin et al., 2015]. Известно также, что при появлении в среде бутанола повышается экспрессия гена *fecD*, который также был детектирован в геноме *St. saprophyticus*. Продукт данного гена является частью регуляторной сети, управляющей проницаемостью клеточной мембраны [Reyes et al., 2016]. Таким образом, можно предположить, что одним из механизмов устойчивости данных микроорганизмов к н-бутанолу также является предотвращение поступления н-бутанола во внутреннее пространство клетки.

Наибольший вклад в толерантность к органическим растворителям у всех из исследуемых представителей рода *Staphylococcus* связана с наличием капсул, массивность которых увеличивается при стрессовых условиях среды [Kanno et al., 2013]. Анализ геномов исследуемых штаммов показал, что присутствие генов, участвующих в образовании капсул, характерно для всех из анализируемых штаммов.

Безусловно, для рассмотрения данной группы организмов в качестве продуцентов необходимо также изучить их степень патогенности. Анализ геномов показал, что геном *St. arneri* 22-1 не содержит специализированных детерминант, которые позволяли бы успешно проявлять себя в качестве патогена в организме человека и животных. В геноме *St. warneri* 22-1 выявлена лишь одна область, подобная островкам патогенности, а также 3 островка генов резистентности к различным стресс-факторам [Bertelli et al., 2017; Yoon et al., 2007].

Таким образом, можно заключить, что все исследованные стафилококки обладают устойчивостью к бутанолу в концентрации 2%, а штамм *St. saprophyticus* PCL способен расти и при 3%. Анализ секвенированного нами генома бактерий *St. warneri* 22-1 показал наличие у них ряда детерминант, обеспечивающих высокую степень толерантности к органическим растворителям. Следовательно, данные

микроорганизмы могут использоваться для генно-инженерных манипуляций с целью создания продуцентов бутанола или других органических растворителей.

Литература

Цинкевич С.В., Евдокимова О.В., Валентович Л.Н. Исследование физиолого-биохимических характеристик бактерий рода *Staphylococcus* – потенциальных продуцентов органических растворителей (биотоплива) // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: тез. докл. X Междунар. науч. конф., Минск, 5-9 июня 2017 г. – Минск: Беларуская навука. – Минск, 2017. – С. 103–105.

Bertelli C. et al. Island Viewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45, No. W1. – P. 30–35.

Brettin T. et al. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5. – P. 1–5.

Kanno M. et al. Isolation of butanol- and isobutanol-tolerant bacteria and physiological characterization of their butanol tolerance // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – V. 79, No. 22. – P. 6998–7005.

Liu S., Qureshi N., Hughes S.R. Progress and perspectives on improving butanol tolerance // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – V. 33, No. 3. – P. 51.

Moon H.G. et al. One hundred years of clostridial butanol fermentation // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2016. – V. 363, No. 3 – P. 1–15.

Reyes L.H., Almario M.P., Kao K.C. Genomic library screens for genes involved in n-butanol tolerance in *Escherichia coli* // *PLOS ONE.* – 2011. – V. 6, No. 3. – P. 17678–17686.

Yoon S.H. et al. Towards pathogenomics: a web-based resource for pathogenicity islands // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V. 35. – P. 395–400.

Zhang J. et al. Isolation and characterization of butanol-tolerant *Staphylococcus aureus* // *Bio-technol. Lett.* – 2016. – V. 38, No. 11. – P. 1929–1934.

CHARACTERIZATION OF *STAPHYLOCOCCUS* AS A POTENTIAL BIOFUEL PRODUCTION PLATFORM

K.V. Akhremchuk, S.V. Tsynkevich, O.V. Evdokimova, L.N. Valentovich

Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus, valentovich@mbio.bas-net.by

Abstract. In this study the ability to grow in the presence of n-butanol was observed for the 5 strains of *Staphylococcus*. The whole genome of *St. warneri* 22-1 was sequenced and assembled. In addition, we analyzed genetic determinants involved in n-butanol tolerance in the *Staphylococcus* strains and *Cl. acetobutylicum* ATCC 824.

Keywords: n-butanol, *Staphylococcus*, solvent tolerance, genome annotation

КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ТЕМПЕРАТУРОЙ ВОЗДУХА И ПРИЗНАКАМИ КАРТОФЕЛЯ

К. Партоев¹, М.К. Гулов²

¹Институт ботаники, физиологии и генетики растений Академии наук Республики Таджикистан, Душанбе, Таджикистан, pkurbonali@mail.ru

²Таджикский государственный медицинский университет им. Абуали ибни Сино, Душанбе, Таджикистан, gulov60@mail.ru

Аннотация. В результате проведенных исследований в различных агроэкологических условиях при выращивании разных сортообразцов картофеля установлено, что между температурой воздуха и массы стеблей наблюдается обратная корреляционная связь. При повышении температуры и снижении температуры воздуха наблюдается уменьшение массы стеблей картофеля и корреляция между этими параметрами слабая, и она составляет $r=-0.276$. Также наблюдается обратная корреляционная связь между температурой воздуха и такими признаками картофеля, как масса клубней (средняя обратная связь $r=-0.430$) и масса корней (сильная обратная связь $r=-0.784$). Следовательно, между температурой воздуха и такими морфологическими признаками картофеля, как масса стеблей, масса корней и масса клубней наблюдается обратная корреляционная связь у картофеля, выращенного в различной вертикальной зональности Республики Таджикистан.

Ключевые слова: картофель, температура, обратная корреляция, вертикальная зональность, Таджикистан

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-966-969

Знание влияния различных агроэкологических факторов среды на ряд полигенных признаков картофеля имеет большое научно-практическое значение в процессе выведения новых перспективных генотипов картофеля в будущем [Альсмик, 1979; Новикова и др., 2017; Партоев, 2013; Росс, 1989]. В связи с этим перед нами стояла задача изучить особенности роста и развития различных генотипов картофеля в зависимости от выращивания их в различной вертикальной зональности Республики Таджикистан.

Исходным материалом для проведения наших исследований служили элитные и сортовые семенные клубни (I-II-ой семенной репродукции) различных генотипов/сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.). Исходные материалы нами были получены из коллекции Института ботаники, физиологии и генетики растений Академии наук Республики Таджикистан, из Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства и Международного центра картофелеводства (Перу). Научные работы по изучению особенности роста и развития, а также проявления ряда морфологических полигенных признаков различных генотипов картофеля были проведены в различных агроэкологических зонах возделывания в Республике Таджикистан: Хуросонский район (550 м), Душанбе (840 м), Вахдат (Явроз, 1500 м и Канаск, 2550 м), Ляхшский район (2700 м), Шугнанский район, 3600 м над уровнем моря) в течение 2015 – 2017 гг. Количество изученных сортообразцов картофеля в Хуросонском районе составило 8, в городе Душанбе – 21, в городе Вахдат – 28, в зоне Канаска и города Вахдата – 19, в Ляхшском районе – 20 и в Шугнанском районе – 10. Сортообразцы картофеля выращивались на основе общепринятой агротехники для каждой агроэкологической зоны. Клубни генотипов/сортов картофеля высаживались в течение февраль – май по схеме посадки 60 x 20 см. Сортообразцы картофеля были посажены в четырехкратной повторности, по 20 клубней в каждой делянке. Общее количество растений с каждого генотипа/сорта

составило по 80 растений. Во время вегетации генотипов/сортов картофеля были проведены следующие агротехнические работы: внесение минеральных удобрений ($N_{120}P_{180}K_{90}$ кг/га), два раза междурядные обработки (вручную), два раза культивации междурядий, окучивание рядов, 5-10 раз вегетационных поливов. Стандартными сортами картофеля служили сорт «Кардинал» (сорт селекции Голландии) и «Файзабад»

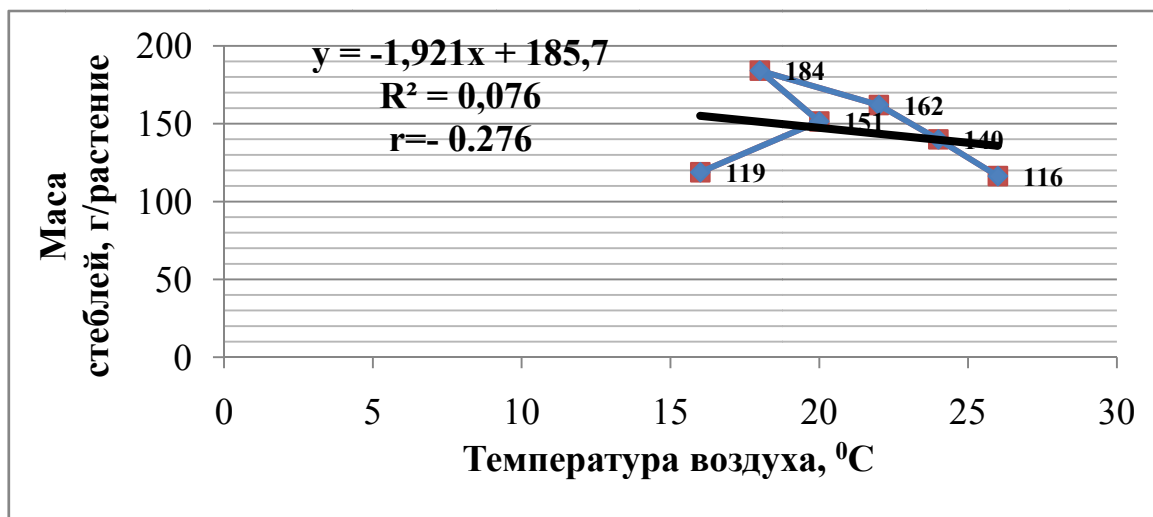


Рис. 1. Корреляция между массой стеблей и температурой воздуха во время вегетации картофеля.

(сорт селекции Таджикистана). Такие метеорологические данные, как среднесуточная температура воздуха и количество осадков были взяты в Государственном учреждении «Метеостанция», город Душанбе Республики Таджикистан. Статистическую обработку данных, а также корреляционные связи между различными признаками сортов картофеля и экологических факторов среды были проведены по [Доспехов, 1985] с использованием компьютерной программы Microsoft Excel 2007.

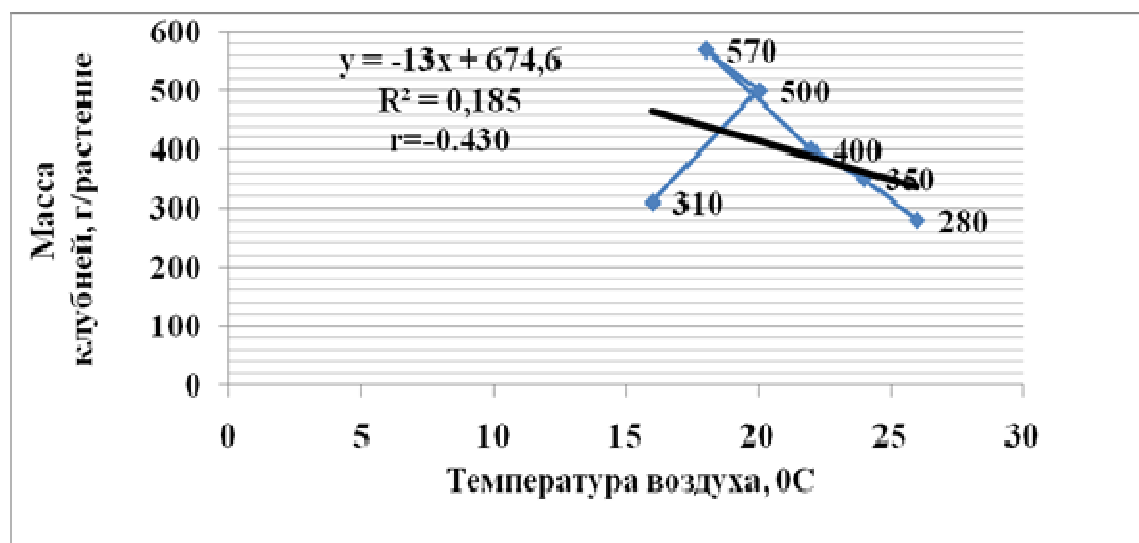


Рис. 2. Корреляция между массой корней и температурой воздуха во время вегетации картофеля.

Как показали наши исследования по определению корреляционных связей между температурой воздуха и такими морфологическими признаками, как масса стеблей, масса корней и масса клубней наблюдаются определенные связи.

В частности, между температурой воздуха и массой стеблей наблюдается отрицательная корреляционная связь. При повышении температуры и снижении температуры воздуха наблюдается уменьшение массы стеблей картофеля и корреляция между этими параметрами слабая, и она составляет $r = -0.276$ (рис. 1). Такая отрицательная корреляционная связь наблюдается между температурой воздуха и такими признаками, как масса клубней (средняя связь $r = -0.430$) и масса корней (сильная связь $r = -0.784$), что видно из рисунков 2 и 3.

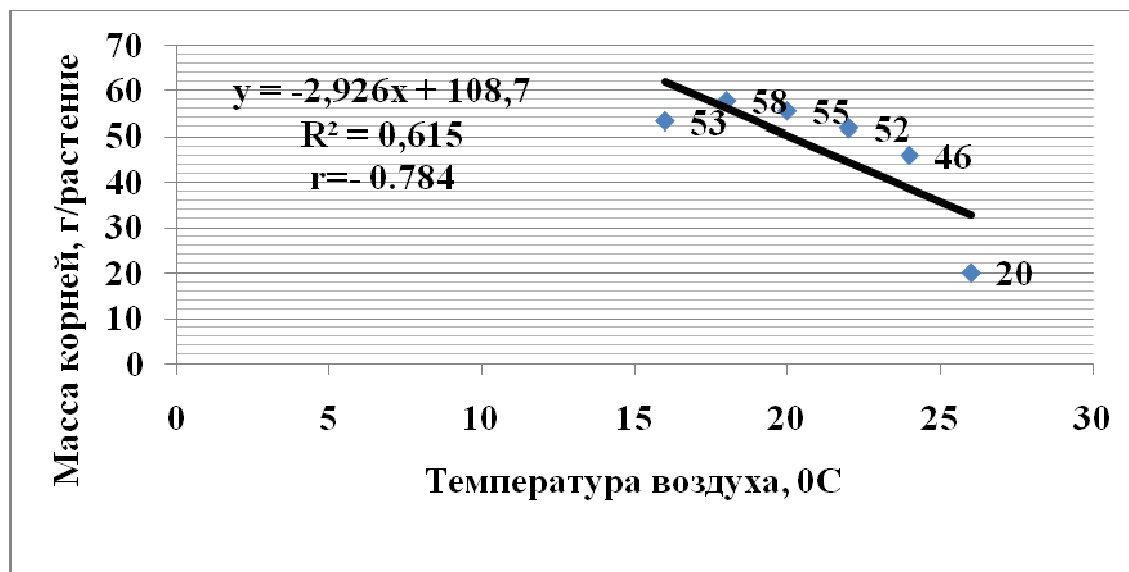


Рис. 3. Корреляция между массой клубней и температурой воздуха во время вегетации картофеля.

Таким образом, следует отметить, что между температурой воздуха и такими морфологическими признаками картофеля, как масса стеблей, масса корней и масса клубней наблюдается обратная корреляционная связь и это свидетельствует о том, что как с повышением, так и с понижением температуры воздуха происходит уменьшение массы ряда морфологических признаков у картофеля, выращенного в различной вертикальной зональности Республики Таджикистан.

Литература

Альсмик П.И. Селекция картофеля в Белоруссии. – Минск: Ураджай, 1979. – 127 с.

Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. – М: Колос, 1985. –368 с.

Новикова Л.Ю., Киру С.Д., Рогозина Е.В. Проявление хозяйственно ценных признаков у сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) при изменении климата на европейской территории России // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52, № 1 с. – 75–83.

Партоев К. Селекция и семеноводство картофеля в условиях Таджикистана. – Душанбе, 2013. – 190 с.

Росс Х. Селекция картофеля. Проблемы и перспективы. – М.: Агропромиздат, 1989. – 184 с.

CORRELATION BETWEEN AIR TEMPERATURE AND SIGNS OF POTATOES

K. Partoev¹, M.K. Gulov²

¹Institute of botany, plant physiology and genetics of Academy of Sciences Republic of Tajikistan, Dushanbe, Tajikistan, *pkurbonali@mail.ru*

²Avicenna Tajik State Medical University, Dushanbe, Tajikistan, *gulov60@mail.ru*

Abstract. As a result of the conducted researches in various agro ecological conditions at cultivation of different samples of potatoes it is established that between air temperature and the mass of stalks the return correlation communication is observed. At temperature increase and decrease in air temperature is observed reduction of mass of stalks of potatoes and correlation between these parameters weak, and it is $r = -0.276$. Also the return correlation communication between the air temperature and such signs of potatoes as the mass of tubers (average feedback of $r = -0.430$) and the mass of roots (strong feedback of $r = -0.784$) is observed. Therefore, between air temperature and such morphological features of potatoes as mass of stalks, mass of roots and mass of tubers the return correlation communication at potatoes which are grown up in various vertical zonality of the Republic of Tajikistan is observed.

Keywords: *potatoes, temperature, return correlation, vertical zonality, Tajikistan*

КАНДИДАТНЫЕ ГЕНЫ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЛИПОКСИГЕНАЗЫ

М.Д. Пермякова¹, С.В. Осипова^{1, 4}, А.В. Пермяков¹, Т.А. Пшеничникова²,
Е.Г. Рудиковская¹, А.А. Дорошков², И.Н. Леонова², В.В. Верхотуров⁵, U. Lohwasser³,
A. Börner³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *marperm@rambler.ru*

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия, *wheatpsh@bionet.nsc.ru*

³Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany, *boerner@ipk-gatersleben.de*

⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия, *svetlanaosipova2@mail.ru*

⁵Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский национальный исследовательский технический университет», Иркутск, Россия, *vervv@mail.ru*

Аннотация. Для QTL на пшеничной хромосоме 2A, ассоциированного с активностью липоксигеназы в условиях засухи, было выявлено 19 кандидатных генов с взаимосвязанными функциями. Среди них гены метаболических путей полифосфатов инозита, альдо-кето редуктаз, рецептор-подобных протеин киназ, F-box-белков, субъединиц SWI3A хроматин-ремодулирующего комплекса SWI/SNF, субъединицы B7 ядерного фактора Y(NF-Y), белков семейства 87 цитохрома P450 и кальций-связывающей пероксигеназы.

Ключевые слова: липоксигеназа, пшеница, кандидатные гены, QTL, засуха

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-970-974

С использованием рекомбинантных замещенных дигиплоидных линий пшеницы Саратовская 29/Янецкис Пробат по хромосоме 2A были выявлены два кластера локусов количественных признаков (QTL). Хромосомный регион 2A 108.5–109.5сМ оказался связанным с наибольшим числом (23) физиологических признаков, включая активность липоксигеназы (ЛОГ). Хромосомный регион 2A 102 сМ был связан с 15 признаками. Оба очень близко расположенных кластера включали признаки газообмена, флуоресценции хлорофилла, фенологии, зерновой продуктивности и их индексы устойчивости. Биоинформационным анализом в этих регионах было обнаружено 42 белок-кодирующих гена. Анализ функций выявленных генов показал, что они взаимосвязаны и представляют собой функциональную единицу для перестройки метаболизма растений пшеницы при адаптации к водному дефициту.

ЛОГ катализирует образование гидропероксидов ЖК, дающих начало многим путям метаболизма липидов, в том числе пути биосинтеза фитогормона жасмоновая кислота (ЖАК). Так как этот фермент участвует в широком диапазоне биохимических и молекулярных процессов, функциональные характеристики многих выявленных нами генов позволяют отнести их к кандидатным генам для регуляции активности ЛОГ.

Среди генов в регионе 2A 108.5–109.5сМ были обнаружены аннотированные гомологи двух генов метаболических путей полифосфатов инозита:

– Р-связанная субъединица фосфотидилинозитол N-ацетилглюкозамин трансферазы. Фермент участвует в биосинтезе гликановых структур и в сборке

гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-якоря [Shears, 2015]. GPI-закрепление является консервативной стратегией эукариот для управления широким спектром процессов. GPI-закрепленные белки включают β -1,3-глюкоаназы, металло- и аспартил-протеазы, глицерофосфодиэстеразы, фитоцианины, фасцилин-подобные арабиногалактанные белки, мульти-медь-оксидазы, экстензины, рецепторы плазматических мембран, включая серин/треанин и обогащенные лейциновым повтором рецептор-подобные протеинкиназы, липид-трансферные белки [Vorner, 2003].

– Фосфолипаза С. Фермент продуцирует (модулирует) три сигнала, регулирующие ионные каналы и участвующие в сигнализации Ca^{2+} : инозитол 1,4,5-трифосфат, диацилглицерин и фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат; расщепляет фосфоглицериновую связь в GPI-закрепленных белках, выделяя их из клеточной мембраны [Putney, Tomita, 2012].

Высокофосфорилированные, растворимые инозиты представляют собой группу вторичных мессенджеров с фундаментальным значением во многих клеточных процессах, таких как мембранный траффик, поддержание теломер, рибосомный биогенез, апоптоз и экспрессии генов на уровне транскрипции, ремоделирования хроматина, редактирования и экспорта мРНК [Alcazar-Roman, Wente, 2008]. Известна важная функция инозитолпирофосфатов и в регулировании зависимых от жасмоната ответов. F-box-белки, участвующие в восприятии ЖАК (COI1) и ауксина (TIR1), включают инозитол полифосфаты в качестве корецепторов [Laha et al., 2016].

В данном регионе также были обнаружены аннотированные гомологи двух генов альдо-кето редуктазы. Этот фермент, обладая широкой субстратной специфичностью, может трансформировать липидные альдегиды и кетостероиды [Penning, 2015]. Вероятно, все четыре гена липидного метаболизма могут быть кандидатами для QTL, связанного с активностью растворимой ЛОГ листьев в условиях водного дефицита, обнаруженном в этом хромосомном регионе.

Три из аннотированных гомологов являются генами рецептор-подобных протеинкиназ, обогащенных лейциновыми повторами (LRR), играющих решающую роль в развитии и стрессовых реакциях, опосредованных фитогормонами. Например, взаимодействие LRR PEPR1 с подобным системину пептидом *AtPEP1* повышает цитозольный Ca^{2+} , активирует защитные гены, регулируемые гормонами ЖАК/этилен/салициловая кислота, и индуцируют экспрессию *PDF1.2 (defensin)* – маркерного гена, индуцируемого ЖАК [Liu et al., 2017]. Таким образом, гены LRR могут влиять на фенотипическое проявление активности ЛОГ.

Аннотированные гомологи генов, кодирующих два белка, содержащие F-боксы и DUF-домен, специфичные для однодольных, связаны с убиквитин-протеасомной системой деградации белков в клетках. Принцип восприятия гормонов через убиквитин лигазы SCF распространен в гормональных сигнальных системах растений. Убиквитин-протеасомная система является центральным регулятором в жасмонатном восприятии и сигнализации [Wasternack, Hause, 2013], поэтому эти два гена также могут быть вовлечены в регуляцию активности ЛОГ, ассоциированную с данным хромосомным регионом.

В регионе 2A 108.5–109.5 сМ были обнаружены аннотированные гомологи двух генов, кодирующих субъединицу SWI3A мультибелкового АТФ-зависимого ремодулирующего хроматин комплекса SWI/SNF. Этот комплекс изменяет структуру хроматина путем изменения контактов ДНК-гистон в нуклеосоме. Он участвует в регуляции гормонов посредством физического взаимодействия с различными компонентами гормональных сигнальных путей и регуляторов транскрипции генов, участвующих в биосинтезе и восприятии гормонов [Sarnowska et al., 2016].

Транскрипция ЖАК-чувствительных генов опосредуется субъединицей 25 (MED25) Медиаторного комплекса [Wasternack, Hause, 2013], которая взаимодействует с SWI/SNF и CHD1 комплексами, регулируя архитектуру хроматина [Allen, Taatjes, 2015]. Кроме того, MED25 позитивно регулирует CONSTANS – положительный регулятор *FLOWERING LOCUS T*, чтобы способствовать цветению [Kazan, 2017]. Эти сведения позволяют считать геном-кандидатом для активности ЛОГ аннотированный гомолог гена субъединицы В7 ядерного фактора Y(NF-Y), регулирующего цветение взаимодействием с CONSTANS, а также два гена, кодирующие субъединицу SWI3A комплекса SWI/SNF.

Среди 13 генов, локализованных в регионе 2А 102 сМ, нами были выбраны семь:

– Аннотированные гомологи четырех генов специфических для злаков серин/треонин протеин киназ, два из которых кодировали MAP киназу 27, WNK2. Эти киназы образуют каскады сигнальных путей, участвующих в реакции абиотического стресса и способны фосфорилировать широкий спектр субстратов, включая другие киназы и/или транскрипционные факторы. Члены каскадов могут активироваться более, чем одним типом стресса и выступать в качестве точек пересечения нескольких сигнальных путей. Например, *AtMPK6* участвует в сигнальных путях O₃, H₂O₂, этилена, АБК и ЖАК [Sinha et al., 2011].

– Аннотированные гомологи двух генов цитохрома P450, семейство 87, подсемейство А, полипептид 2. Эти белки участвуют в окислении ЖК, биосинтезе brassinosteroidов и основных фитоалексинов, в циркадной регуляции биосинтеза каротиноидов, оксипиринов, глюкозинолатов и brassinosteroidов [Bolwell et al., 1994].

– Аннотированный гомолог специфической для СЗ-злаков кальций-связывающей пероксигеназы 2. Этот интегральный мембранный белок – калеозин участвует в генерации окисленных ЖК в сигнальных путях АБК и салициловой кислоты, является частью пути ЛОГ, вызванного стрессами, и также может генерировать противогрибковые соединения, полученные из ЖК [Partridge and Murphy, 2009].

По результатам анализа функциональных взаимосвязей генов, локализованных в регионе 2А 102–109.5 сМ, можно представить, как внеклеточные стимулы, связанные с водным дефицитом, могут инициировать транскрипционное перепрограммирование, а также определить место и роль ЛОГ в этом процессе.

Считают, что изменение содержания полифосфатов инозита в определенных физиологических условиях может использоваться клеткой в качестве решающих сигналов [Alcazar-Roman, Wentе, 2008]. В нашем случае сигналы проявились в нескольких направлениях: мобилизация Ca²⁺, GPI-закрепление белков, связывание с рецепторами растительных гормонов, ремоделирование хроматина и экспрессия генов, что соответствует литературным данным.

Быстрая и тонкая перестройка метаболизма растений в условиях стресса происходит за счет посттрансляционных модификаций белков (ПТМ) [Hashiguchi, Komatsu, 2016]. Среди генов, обнаруженных в двух регионах хромосомы 2А и кандидатных генов для активности ЛОГ, большинство имеют отношение к одной из ПТМ, таким как фосфорилирование, убиквитинирование, гликолипирование.

Функциональные взаимосвязи исследуемых генов свидетельствуют о «перекрестном разговоре» гормонов ЖАК, АБК, ауксин, этилен, салициловая кислота и brassinosteroid. Механизм взаимодействия гормональных сигнальных каскадов, конечной точкой которого является многосубъединичный Медиаторный комплекс [Allen, Taatjes, 2015], используются растениями для адаптации своего ответа к типу испытываемого стресса и достижения баланса между ростом и защитой в динамических экологических условиях [Verma et al., 2017].

По нашим данным, по меньшей мере, 19 аннотированных гомологов генов в двух близко расположенных кластерах на хромосоме 2А могут являться кандидатными генами для регуляции активности ЛОГ в условиях дефицита воды. Это свидетельствует о важной роли этого фермента, главным образом, его жасмонатного метаболического пути, в адаптации растений пшеницы к засухе и значительном влиянии на экспрессию засухо-отзывчивых генов.

Работа поддержана грантами РФФИ 15-04-02762 и 18-04-00481. Все эксперименты были проведены с использованием станции искусственного климата Центра коллективного пользования научным оборудованием «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН и на экспериментальных базах двух ЦКП ИЦИГ СО РАН «Лаборатория искусственного выращивания растений» и «Селекционно-генетическая лаборатория».

Литература

Alcazar-Roman A.R., Went S.R. Inositol polyphosphates: a new frontier for regulating gene expression // *Chromosoma*. – 2008. – V. 117, No. 1. – P. 1–13.

Allen B.L., Taatjes D.J. The Mediator complex: a central integrator of transcription // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2015. – V. 16, No. 3. – P. 155–166.

Bolwell G.P., Bozak K., Zimmerlin A. Plant cytochrome P45 // *Phytochemistry*. – 1994. – V. 37, No. 6. – P. 1491–506.

Borner G.H.H., Lilley K.S., Stevens T.J., Dupree P. Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. a proteomic and genomic analysis // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 132. – P. 568–577.

Hashiguchi A., Komatsu S. Impact of post-translational modifications of crop proteins under abiotic stress // *Proteomes*. – 2016. – V. 4, No. 4. – P. 42.

Kazan K. The multitasking MEDIATOR25 // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – V. 8. – A. 999. – P. 1–11.

Laha D., Parvin N., Dynowski M., Johnen P., Mao H., Bitters S.T., Zheng N., Schaaf G. Inositol polyphosphate binding specificity of the jasmonate receptor complex // *Plant Physiology*. – 2016. – V. 171. – P. 2364–2370.

Liu P.-L., Du L., Huang Y., Gao S.-M., Yu M. Origin and diversification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in plants // *BMC Evolutionary Biology*. – 2017. – V. 17. – A. 47.

Partridge M., Murphy D.J. Roles of a membrane-bound caleosin and putative peroxygenase in biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis* // *Plant Physiol. Biochem.* – 2009. – V. 47, No. 9. – P. 796–806.

Penning T.M. The aldo-keto reductases (AKRs): overview // *Chem. Biol. Interact.* – 2015. – V. 5, No. 234. – P. 236–246.

Putney J.W., Tomita T. Phospholipase C signaling and calcium influx // *Adv. Biol. Regul.* – 2012. – V. 52, No. 1. – P. 152–164.

Sarnowska E., Gratkowska D.M., Sacharowski S.P., Cwiek P., Tohge T., Fernie A.R., Siedlecki J.A., Koncz C., Sarnowski T.J. The role of SWI/SNF chromatin remodeling complexes in hormone crosstalk // *Trends in Plant Science*. – 2016. – V. 21, No. 7. – P. 594–608.

Sinha A.K., Jaggi M., Raghuramand B., Tuteja N. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress // *Plant Signaling & Behavior*. – 2011. – V. 6. – P. 196–203.

Shears S.B. Inositol pyrophosphates: why so many phosphates? // *Adv. Biol. Regul.* – 2015. – V. 57. – P. 203–216.

Verma V., Ravindran P., Kuma P.P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses // BMC Plant Biology. – 2016. – V. 16. – A. 86.

Wasternack C., Hause B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany // Annals of Botany. – 2013. – V. 111. – P. 1021–1058.

CANDIDATE GENES FOR REGULATION OF LIPOXYGENASE ACTIVITY

M.D. Permyakova¹, S.V. Osipova^{1, 4}, A.V. Permyakov¹, T.A. Pshenichnikova², E.G. Rudikovskaya¹, A.A. Doroshkov², I.N. Leonova², V.V. Verkhoturov⁵, U. Lohwasser³, A. Börner³

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *marperm@rambler.ru*

²Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia, *wheatpsh@bionet.nsc.ru*

³Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany, *boerner@ipk-gatersleben.de*

⁴Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, *svetlanaosipova2@mail.ru*

⁵Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Irkutsk National Research Technical University», Irkutsk, Russia, *vervv@mail.ru*

Abstract. For the QTL associated with lipoxygenase activity under drought, the 19 candidate genes with interrelated functions were identified. Among them were the genes of metabolic pathways of inositol polyphosphates, aldo-keto reductases, receptor-like protein kinases, F-box proteins, SWI3A subunits of the chromatin remodeling complex SWI / SNF, B7 subunit of nuclear factor Y (NF- Y), cytochromes P450 (87 family) and calcium-binding peroxxygenase.

Keywords: *lipoxygenase, wheat, candidate genes, QTL, drought*

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCOCCUS* SP. PCC 7942 К ДЕЙСТВИЮ 2-НОНАНОНА

А.А. Попова¹, О.А. Кокшарова^{1,2}, И.А. Хмель¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, Россия, alexandra.a.porova@gmail.com

²Подразделение Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова» Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия, oa-koksharova@rambler.ru

Аннотация. Летучие органические соединения (ЛОС), выделяемые ризосферными бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, способны ингибировать рост цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942. С целью изучения генетического контроля чувствительности *S. sp.* PCC 7942 к действию индивидуальных ЛОС была получена коллекция транспозонных цианобактериальных мутантов, устойчивых к трем разным кетонам. Были идентифицированы четыре гена, определяющие чувствительность клеток *S. sp.* PCC 7942 к действию кетона 2-нонанона.

Ключевые слова: цианобактерии, *Synechococcus*, летучие органические соединения, транспозонный мутагенез

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-975-977

Некоторые бактерии, ассоциированные с растениями, могут синтезировать летучие органические соединения (ЛОС), подавляющие рост фитопатогенных микроорганизмов [Kai et al., 2009; Insam, Seewald, 2010; Effmert et al., 2012; Audrain et al., 2015]. Кроме того, ризосферные бактерии выделяют ЛОС, которые могут стимулировать рост растений и вызывать системную резистентность растений к патогенам [Ryu et al., 2003, 2004]. Бактериальные ЛОС относятся к различным химическим классам органических соединений, таким как алкены, спирты, кетоны, терпены, серосодержащие соединения и др. [Blom et al., 2011; Dandurishvili et al., 2011; Chernin et al., 2011; Garbeva et al., 2014; Popova et al., 2014; Tyc et al., 2015]. Интерес к ЛОС, синтезируемым почвенными бактериями, связан с их возможными сигнальными функциями [Kai et al., 2009; Chernin et al., 2011; Effmert et al., 2012; Kim et al., 2013].

Мы показали, что ЛОС ризосферных и почвенных бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* значительно ингибируют рост цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 (далее *S. sp.* PCC 7942) [Popova et al., 2014]. Чтобы исследовать влияние ЛОС бактерий *Pseudomonas* и *Serratia* на рост микроорганизмов, мы применили систему совместного культивирования бактерий-продуцентов ЛОС и цианобактерий. Для этого использовали разделенные перегородкой чашки Петри. Чашки плотно герметизировали парафильмом. Питательные среды были разделены физическим барьером, поэтому антагонистическая активность почвенных бактерий могла быть обусловлена только действием их летучих веществ. Таким образом, исключалась возможность влияния бактерий на рост *S. sp.* PCC 7942 за счет других механизмов антагонизма [Popova et al., 2014].

По нашим данным, среди ЛОС, продуцируемых изучаемыми ризосферными и почвенными бактериями, значительную часть занимают кетоны [Popova et al., 2014]. Нами исследовано ингибирующее действие бактериальных кетонов на клетки

цианобактерии *S. sp.* PCC 7942. Кетоны 2-нонанон, 2-ундеканон и 2-гептанон полностью ингибировали рост *S. sp.* PCC 7942 [Popova et al., 2014].

С целью изучения генетического контроля чувствительности цианобактерии к действию кетонов 2-нонанона, 2-ундеканона и 2-гептанона были получены мутанты при использовании транспозона Tn5-692 [Koksharova, Wolk, 2002]. Более 2500 транспозонных мутантов высевали на чашки и инкубировали с каждым из трех кетонов. После анализа степени резистентности клеток мутантов к кетонам были отобраны 11 мутантов, устойчивых к действию 2-нонанона, 7 мутантов, устойчивых к действию 2-ундеканона, и 8 мутантов, устойчивых к действию 2-гептанона.

Для идентификации генов, нарушенных транспозоном, были выбраны мутанты, устойчивые к действию 2-нонанона, так как этот кетон оказывает сильное ингибирующее действие на клетки дикого типа цианобактерии *S. sp.* PCC 7942 и одновременно с этим синтезируется бактериями-продуцентами ЛОС в большем количестве, чем другие кетоны. Идентифицированы четыре гена, мутации в которых приводят к устойчивости цианобактерии *S. sp.* PCC 7942 к 2-нонанону. Локализация транспозонных мутаций успешно подтверждена инсерционной инактивацией соответствующих генов в штамме дикого типа *S. sp.* PCC 7942.

Идентифицированные гены кодируют следующие белки: (1) муреин-пептид-лигазу, которая участвует в рециклизации муреина в процессе биогенеза клеточной стенки цианобактерий; (2) ABC транспортер, имеющий сходство с белками ABC транспортерами, определяющими устойчивость к органическим растворителям; (3) белок, содержащий VRR-NUC домен, который присутствует в ферментах рестрикции-модификации третьей группы; (4) маленький гипотетический белок с неизвестной функцией.

В настоящее время проводится локализация мутаций в трех штаммах, устойчивых к 2-гептанону. Будущие эксперименты с применением методов биофизики и протеомики при изучении мутантов *S. sp.* PCC 7942 будут способствовать пониманию молекулярных механизмов, определяющих чувствительность цианобактерий к действию природных кетонов.

Работа поддержана грантами РФФИ №18-34-00396 и №18-04-00375.

Литература

Audrain B., Farag M.A., Ryu C.M., Ghigo J.M. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology // FEMS Microbiology reviews. – 2015. – V. 39. – P. 222–233.

Blom D., Fabbri C., Connor E.C., Schiestl F.P., Klauser D.R., Boller T. et al. Production of plant growth modulating volatiles is wide spread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions // Environmental microbiology. – 2011. – V. 13. – P. 3047–3058.

Chernin L., Toklikishvili N., Ovadis M., Kim S., Ben-Ari J., Khmel I. et al. Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles // Environmental microbiology reports. – 2011. – V. 3. – P. 698–704.

Dandurishvili N., Toklikishvili N., Ovadis M. et al. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown-gall tumors on tomato plants // Journal of Applied Microbiology. – 2011. – V. 110. – P. 341–352.

Effmert U., Kalderas J., Warnke R., Piechulla B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil // Journal of chemical ecology. – 2012. – V. 38. – P. 665–703.

Garbeva P., Hordijk C., Gerards S., de Boer W. Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria // Frontiers in microbiology. – 2014. – V. 5. – P. 289.

Insam H., Seewald M.A. Volatile organic compounds (VOCs) in soils // *Biology and fertility of soils*. – 2010. – V. 46. – P. 199–213.

Kai M., Hausteil M., Molina F., Petri A., Scholz B., Piechulla B. Bacterial volatiles and their action potential // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2009. – V. 81. – P. 1001–1012.

Kim K.S., Lee S., Ryu C.M. Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance // *Nature communications*. – 2013. – V. 4. – P. 1809.

Koksharova O.A., Wolk C.P. A novel gene that bears a DnaJ motif influences cyanobacterial cell division // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – V. 184. – P. 5524–5524.

Popova A.A., Koksharova O.A., Lipasova V.A. et al. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster* // *BioMed research international*. – 2014. – doi: 10.1155/2014/125704.

Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W., Pare P.W. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis* // *Plant physiology*. – 2004. – V. 134. – P. 1017–1026.

Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Pare P.W. et al. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* // *Proceedings of the national academy of sciences USA*. – 2003. – V. 100. – P. 4927–4932.

Tyc O., Zweers H., de Boer W., Garbeva P. Volatiles in inter-specific bacterial interactions // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – V. 6. – P. 1412.

THE STUDY OF MECHANISMS OF *SYNECHOCOCCUS* SP. PCC 7942 SENSITIVITY TO 2-NONANONE ACTION

A.A. Popova¹, O.A. Koksharova^{1,2}, I.A. Khmel¹

¹Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, alexandra.a.popova@gmail.com

²Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University subdepartment «A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology», Moscow, Russia, oa-koksharova@rambler.ru

Abstract. Volatile organic compounds (VOCs) emitted by rhizosphere bacteria of *Pseudomonas* and *Serratia* species, are capable of inhibiting the growth of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. In order to study the genetic control of the *S. sp.* PCC 7942 sensitivity to the action of individual VOCs, a collection of transposon cyanobacterial mutants resistant to three different ketones was obtained. We identified four genes that determined the sensitivity of *S. sp.* PCC 7942 to the action of the ketone 2-nonanone.

Keywords: cyanobacteria, *Synechococcus*, volatile organic compounds, transposon mutagenesis

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *IN SILICO* ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА CLC, В СОБРАННЫХ *DE NOVO* ТРАНСКРИПТОМАХ МОРСКОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA TERTIOLECTA*

Л.Г. Попова¹, А.В. Шувалов¹, А.А. Юрченко², Д.Е. Храмов^{1,3}, Д.А. Маталин¹, Л.А. Халилова¹, Ю.В. Орлова¹, Ю.В. Балнокин^{1,3}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, lora_gp@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Центр геномной биоинформатики им. Ф.Г. Добржанского, Санкт-Петербург, Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Аннотация. Осуществлена *de novo* сборка транскриптомов микроводоросли *Dunaliella tertiolecta* на основе представленных в базе Sequence Read Archive (NCBI) библиотек коротких прочтений РНК из этой водоросли. В собранных транскриптомах найдены *in silico* последовательности, кодирующие Cl⁻-транспортирующие белки семейства CLC: *DtCLC1* (857 а.о.), *DtCLC2* (809 а.о.), *DtCLC3* (768 а.о.). Эти белки сходны с белками CLC высших растений и животных (прежде всего рыб и рептилий), осуществляющих Cl⁻/H⁺ обмен.

Ключевые слова: *de novo* сборка транскриптома, белки CLC, морские микроводоросли, *Dunaliella tertiolecta*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-978-982

Введение. В основе солеустойчивости высших растений лежат механизмы, определяющие способность к ионному гомеостатированию цитоплазмы [Munns, Tester, 2008]. Среди них важную роль играют механизмы транспорта Na⁺ и Cl⁻. Регуляция концентраций этих ионов в цитоплазме осуществляется как на уровне плазматической мембраны, которая является основным барьером, отделяющим цитоплазму клетки от внешней среды, так и на уровне эндомембран клетки. И если в настоящее время о механизмах транспорта Na⁺ у растений известно достаточно много [Munns, Tester, 2008], механизмы транспорта Cl⁻ изучены недостаточно, несмотря на то, что этот ион является одним из доминирующих при почвенном засолении [Teakle, Tyerman, 2010].

Существенный вклад в регуляцию внутриклеточных концентраций Cl⁻ играют белки семейства CLC (Chloride Channel). Эти мембранные белки широко распространены в живой природе и найдены у представителей всех царств [Jentsch, 2008]. Семейство CLC включает в себя анионные каналы и анион/протонные антипортеры, в частности, Cl⁻/H⁺-антипортеры, транспорт Cl⁻ которыми через мембраны осуществляется за счет протон-движущей силы. У эукариот известные Cl⁻/H⁺-антипортеры локализованы в мембранах внутриклеточных органелл, тогда как у прокариот – в плазматической мембране. В животных клетках Cl⁻/H⁺-антипортеры осуществляют Cl⁻/H⁺-обмен между цитозолем и внутриклеточными компартментами, у бактерий – между цитозолем и наружной средой. В растительных клетках Cl⁻/H⁺-антипортеры также осуществляют экспорт Cl⁻ из цитоплазмы во внутриклеточные органеллы. У модельного растения *Arabidopsis thaliana* обнаружено семь представителей семейства CLC, которые локализованы в различных внутриклеточных мембранах: *AtCLCa*, *AtCLCb*, *AtCLCc* и *AtCLCg* – в тонопласте, *AtCLCd* и *AtCLCf* – в аппарате Гольджи, *AtCLCe* – в тилакоидах.

Галотолерантные водоросли, способные расти в соленых средах – морской воде или соленых озерах, вода в которых может содержать NaCl в высоких концентрациях, вплоть до насыщающих, – можно рассматривать как модельные объекты для исследования механизмов солеустойчивости на клеточном уровне. У галотолерантных микроводорослей плазматическая мембрана клетки непосредственно контактирует с наружной средой. Перемещение ионов через плазмалемму посредством механизмов, локализованных в этой мембране, играет центральную роль в поддержании ионного, в т.ч. Cl⁻, гомеостаза в клетках морских водорослей. Известно, что содержание Cl⁻ в клетках водорослей рода *Dunaliella*, как и содержание Na⁺, поддерживается на постоянно низком уровне в широком диапазоне наружных концентраций NaCl [Kirst, 1977; Балнокин и др., 1990]. Кроме того, транспорт Cl⁻, наряду с транспортом Na⁺ и K⁺, важен для поддержания осмотического баланса в клетке. Следовательно, клетки морских водорослей должны обладать механизмами, отвечающими за регулирование потоков этого иона как между клеткой и наружной средой, так и во внутриклеточных компартментах. Анионные переносчики у водорослей играют фундаментальную роль в биологии клетки, однако мало известно о специфических функциях этих транспортеров, их локализации, молекулярной природе, включая белки семейства CLC (за исключением одного белка, относящегося к семейству CLC, – H⁺/Cl⁻ антипортера термофильной водоросли *Cyanidioschyzon merolae* [Feng et al., 2010]).

Морские микроводоросли рода *Dunaliella* относятся к большому семейству зеленых одноклеточных микроводорослей Dunaliellaceae, представители которого повсеместно распространены в водах морей и соленых водоемов. Водоросли рода *Dunaliella* обладают высокой устойчивостью к засолению NaCl [Massjuk, 1973]. Механизмы Na⁺ гомеостатирования у *Dunaliella* активно изучаются [Попова, Балнокин, 2013], тогда как механизмам Cl⁻ гомеостатирования до настоящего времени внимания уделялось мало. Наше теоретическое исследование направлено на поиск белков семейства CLC у микроводорослей рода *Dunaliella* – эвригалинной микроводоросли *D. tertiolecta*, способной расти в широком диапазоне солености среды (0,07 М – 2 М NaCl) [Масюк, 1973]. Мы осуществили сборку *de novo* транскриптомов *D. tertiolecta* на основе нескольких массивов коротких прочтений РНК из этой водоросли (представлены в базе Sequence Read Archive, NCBI), и в собранных транскриптомах провели *in silico* поиск последовательностей, кодирующих белки, относящиеся к семейству CLC.

Методы исследования. Массивы коротких прочтений РНК для сборки транскриптомов *D. tertiolecta* были взяты из базы данных SRA (Sequence Read Archive, NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov). Идентификаторы библиотек прочтений (код эксперимента/код архива): SRX047443/runSRR124253, SRX047444/runSRR124254, SRX549041/runSRR1294427, SRX554105/runSRR1300297, SRX554106/runSRR1300298. Качество извлечённых из библиотек SRA коротких прочтений РНК было проверено с помощью программы FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Нуклеотиды низкого качества, остатки адаптеров Illumina и неопределённые нуклеотиды удалили с помощью программы Trimmomatic [Bolger et al., 2014]. Очищенные риды были собраны в контиги с помощью программы Trinity [Haas et al., 2013]. Оценку качества *de novo* сборки транскриптомов осуществляли, выравнивая прочтения обратно на контиги с помощью программы bowtie2 [Langmead, Salzberg, 2012]. Поиск интересных последовательностей в файлах с контигами осуществляли с помощью программы tblastn [Altschul, 1997]. Виртуальную трансляцию нуклеотидных последовательностей в аминокислотные осуществляли с помощью сервиса на сайте ExPASy (web.expasy.org/translate/). Размеры предсказанных белков определяли, исходя из присутствия в собранных контигах протяженных открытых рамок считывания.

Функции предсказанных белков анализировали с помощью ресурса InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Сравнительный анализ найденных последовательностей осуществляли также с помощью алгоритма blastx (BLAST, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Филогенетическое дерево построено с помощью программы proml, входящей в пакет программ Phylip (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/>). Дерево визуализировали в программе DrawTree (http://phylogeny.lirmm.fr/phylo_cgi/one_task.cgi?task_type=drawtree).

Результаты и обсуждение. Для реконструкции полных нуклеотидных последовательностей транскриптомов *D. tertiolecta* была осуществлена *de novo* сборка транскриптомов на основе представленных в базе SRA индивидуальных библиотек коротких прочтений РНК.

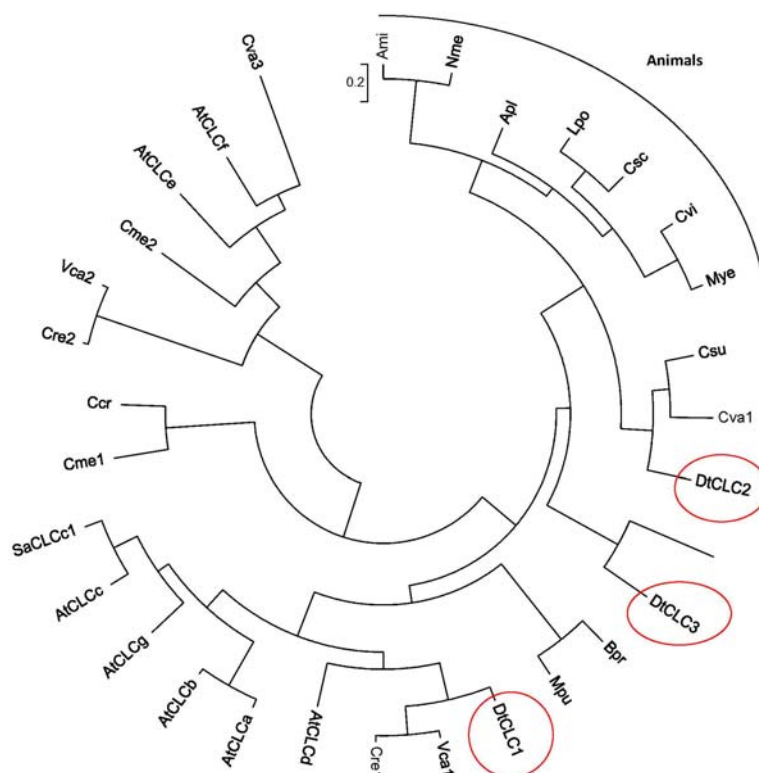


Рисунок. Кладограмма белков семейства CLC. Обозначения: Ami, *Alligator mississippiensis* (KYO26137.1); Apl, *Acanthaster planci* (XP_022108376.1); Bpr, *Bathycoccus prasinus* (CCO18009.1); Ccr, *Chondrus crispus* (XP_005711492.1); Cre1, *Chlamydomonas reinhardtii* (XP_001689664.1); Cre2, *Chlamydomonas reinhardtii* (XP_001690111.1); Csc, *Centruroides sculpturatus* (XP_023219872.1); Csu, *Coccomyxa subellipsoidea* (XP_005645781.1); Cme1, *Cyanidioschyzon merolae* (XP_005538077.1); Cme2, *Cyanidioschyzon merolae* (XP_005536888.1); Cva1, *Chlorella variabilis* (XP_005848966.1); Cva2, *Chlorella variabilis* (XP_005847218.1); Cva3, *Chlorella variabilis* (XP_005851997.1); Cvi, *Crassostrea virginica* (XP_022340710.1); Lpo, *Limulus polyphemus* (XP_013787955.2); Mpu, *Micromonas pusilla* (XP_003057128.1); Mye, *Mizuhopecten yessoensis* (XP_021349948.1); Nme, *Numida meleagris* (XP_021244254.1); SaCLCc1, *Suaeda altissima* (AVQ93350.1); Yca1, *Volvox carteri* (XP_002953983.1); Yca2, *Volvox carteri* (XP_002953895.1). Белки *Arabidopsis thaliana*: AtCLCa (NP_198905.1), AtCLCb (NP_189353.1), AtCLCc (NP_199800.1), AtCLCd (NP_197996.1), AtCLCe (NP_001190924.1), AtCLCf (NP_564698.1), AtCLCg (NP_198313.2).

Для поиска в файлах с контигами последовательностей, кодирующих белки семейства CLC, в качестве запроса использовали протяженные вырожденные

консенсусные последовательности, полученные при выравнивании последовательностей, кодирующих белки CLC различных организмов, прежде всего зеленых водорослей. Эти последовательности были выбраны биоинформатическим поиском в базах данных возможных последовательностей, кодирующих белки CLC у водорослей.

В собранных транскриптомах были *in silico* идентифицированы контиги, содержащие открытые рамки считывания для трех различных белков, гомологичных белкам семейства CLC, которые мы обозначили как DtCLC1 (857 а.о.), DtCLC2 (809 а.о.), DtCLC3 (768 а.о.).

На рисунке представлено филогенетическое дерево принадлежащих семейству CLC белков из различных организмов, включая идентифицированные *in silico* белки CLC водоросли *D. tertiolecta*. Прежде всего, следует отметить, что найденные белки *D. tertiolecta* высокогомологичны белкам CLC из других водорослей. Один из идентифицированных белков, DtCLC1, сходен с белками высших растений, в частности, с белком *AtCLCd* из *A.thaliana*, который, как предполагается, является Cl⁻/H⁺ антипортером и функционирует в транс-Гольджи сети [Lv et al., 2009]. Два других белка, DtCLC2 и DtCLC3, лежат в одной кладе с белками CLC животных (прежде всего рыб и рептилий), также осуществляющими Cl⁻/H⁺ обмен. Известно, что белки CLC, перенося Cl⁻ через клеточные мембраны, контролируют электрический потенциал на мембранах, pH и состав электролитов во внутриклеточных органеллах [Jentsch, 2008]. Результаты нашего теоретического поиска представляют основу для дальнейших экспериментальных исследований белков CLC у водорослей, выяснения их клеточной локализации и физиологической роли у этих организмов.

Литература

Балнокин Ю.В., Медведев А.В., Калашникова Т.С., Галкина И.В. Ионный гомеостаз в цитозоле одноклеточных водорослей при засолении среды хлористым натрием // Журнал общей биологии. – 1990 – Т. 51, № 2. – С. 234–246.

Масюк Н.П. Морфология, систематика экология, географическое распространение рода *Dunaliella* и перспективы его практического использования. – Киев, Наукова думка, 1973. – 243–244 с.

Попова Л.Г., Балнокин Ю.В. Na⁺-АТФазы галотолерантных микроводорослей // Физиология растений. – 2013 – Т. 60, № 4. – С. 499–511.

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. – 1997. – V. 25. – P. 3389–3402.

Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. – 2014. – btu170.

Feng L., Campbell E.B., Hsiung Y., MacKinnon R. Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle // Science. – 2010 – V. 330. – P. 635–641.

Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D. et al. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis // Nat. protocols. – 2013 – V. 8. – P. 1494–1512.

Jentsch T.J. CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology // Critical reviews in biochemistry and molecular biology. – 2008 – V. 43. – P. 3–36.

Kirst G.O. Ion composition of unicellular marine and fresh-water algae, with special reference to *Platymonas subcordiformis* cultivated in media with different osmotic strengths // Oecologia (Berl.). – 1977. – V. 28. – P. 177–189.

Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nat. Methods. – 2012. – V. 9. – P. 357–359.

Lv Q.D., Tang R.J., Liu H., Gao X.S., Li Y.Z., Zheng H.Q., Zhang H.X. Cloning and molecular analyses of the *Arabidopsis thaliana* chloride channel gene family // Plant Science. – 2009 – V. 176. – P. 650–661.

Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance // Annu. Rev. Plant Biol. – 2008. – V. 59. – P. 651–681.

Teakle N.L., Tyerman S.D. Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance // Plant, cell, environment. – 2010 – V. 33. – P. 566–589.

IN SILICO* IDENTIFICATION OF SEQUENCES ENCODING CLC FAMILY PROTEINS IN THE *DE NOVO* ASSEMBLED TRANSCRIPTOMES OF MARINE ALGA *DUNALIELLA TERTIOLECTA

L.G. Popova¹, A.V. Shuvalov¹, A.A. Yurchenko², D.E. Khramov^{1,3}, D.A. Matalin¹, L.A. Khalilova¹, Y.V. Orlova¹, Y.V. Balnokin^{1,3}

¹K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia, lora_gp@mail.ru

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Saint-Petersburg State University", Theodosius Dobzhansky Center for Genome Bioinformatics, Saint-Petersburg, Russia

³Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. For microalgae *Dunaliella tertiolecta* *de novo* transcriptome assemblies were accomplished using the short-read RNA-seq data deposited in the Sequence Read Archive database (NCBI). In the assembled transcriptomes by *in silico* analysis we found sequences encoding the Cl⁻-transporting proteins of the CLC family: *DtCLC1* (857 a.a.), *DtCLC2* (809 a.a.), *DtCLC3* (768 a.a.). These proteins are similar to the CLC proteins of higher plants and animals (primarily fish and reptiles) that fulfil Cl⁻/H⁺ exchange.

Keywords: *de novo* transcriptome assembly, CLC proteins, marine microalgae, *Dunaliella tertiolecta*

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОБОСОБЛЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ РЕЛИКТОВЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ БАЙКАЛЬСКОЙ СИБИРИ КАК РЕЗУЛЬТАТ ГЛОБАЛЬНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ

М.В. Протопопова¹, В.В. Павличенко¹, В.В. Чепинога^{2,3}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, marina.v.protopopova@gmail.com, vpavlichenko@gmail.com

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт географии им. В.Б. Сочавы Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия, Victor.Chepinoga@gmail.com

Аннотация. Проведено исследование роли климатических изменений в формировании современной филогеографической структуры реликтовых видов растений Южной Сибири с использованием молекулярно-генетических методов. Результаты показали наличие ограниченного переноса генов между популяциями в пределах хр. Хамар-Дабан, непродолжительной изоляции сибирских популяций *Waldsteinia ternata* и *Eranthis sibirica*, невысокой степени дивергенции *Anemone baicalensis* и *W. tenrata* с восточноазиатскими родственными видами.

Ключевые слова: глобальные изменения климата, рефугиум, хребет Хамар-Дабан, неморальные реликты, молекулярно-генетические маркеры

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-983-985

Настоящая работа направлена на исследование роли глобальных климатических изменений в формировании современной филогеографической структуры некоторых реликтовых видов Южной Сибири с использованием молекулярно-генетических методов. На протяжении четвертичного периода растительность Северной Азии претерпевала значительные изменения. Одним из существенных преобразований явилось нарушение целостности некогда сплошной транспалеарктической зоны широколиственных лесов в результате серии похолоданий и усиления аридизации климата в плейстоцене. В настоящее время в пределах Евразии зона широколиственных лесов представлена двумя основным участками: европейским и восточноазиатским, а на территорию Восточной Сибири приходится ее протяженная дизъюнкция. Поддержание преемственности растительности на территории Южной Сибири оказалось возможным, в частности, за счет существования рефугиумов, комплекс мезо- и микроклиматических условий в которых, позволил растениям пережить неблагоприятные для них периоды. Наиболее богатым рефугиумом неморальной флоры Восточной Сибири является северный макросклон хребта Хамар-Дабан [Положий, Крапивкина, 1985]. Хребет Хамар-Дабан является основным местообитанием некоторых неморальных реликтов с дизъюнктивным ареалом, популяции которых встречаются также в других рефугиумах Южной Сибири (Восточный Саян, Западный Саян, Алтай), а некоторые и на Дальнем Востоке. Реконструкция филогенетических взаимоотношений и филогеографических паттернов удаленных популяций таких видов может помочь в понимании процессов формирования растительного покрова в течение глобальных климатических изменений на территории Северной Азии в целом.

В работе проводили изучение нескольких неморальных реликтовых видов растений: *Eranthis sibirica* DC., *Waldsteinia ternata* (Steph.) Fritsch и *Anemone baicalensis* Turcz. Все они являются эндемиками Южной Сибири, имеют сильно фрагментированный ареал и близкородственные таксоны в Восточной Азии. Сбор материала для всех трех видов проводили на хр. Хамар-Дабан (Южное Прибайкалье). Помимо этого, сбор *E. sibirica* и *W. ternata* осуществляли из их изолированных местонахождений в предгорьях Восточного Саяна (р. Белая Зима). В работе также использовали образцы *W. ternata* из популяций, произрастающих в предгорьях Западного Саяна и Надеждинском р-не Приморского края (вблизи пос. Сиреневка и Раздольное), рассматриваемых в настоящее время рядом авторов в качестве самостоятельных видов: *W. tanzybeica* N.V. Stepanov [Степанов, 1994] на Западном Саяни и *W. maximowicziana* (Terpner) Probat. [Пробатова, 2015] в Приморье.

В работе был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей молекулярно-генетических маркеров *ITS1-ITS2*, *trnV*, *rpl20-rps12*, *trnL-trnF* и *psbA-trnH*. ДНК выделяли из высушенных листьев с помощью СТАВ метода [Doyle & Doyle, 1987] с авторскими модификациями [Протопопова и др., 2015, 2016]. ПЦР проводили с использованием универсальных праймеров [Wang et al., 2009; Utelli, 2000]. Ампликоны электрофоретически отделяли от компонентов реакции в агарозном геле, очищали и лигировали в плазмидный вектор pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific) или pMiniT 2.1 (NEB) с последующей трансформацией клеток *E. coli*. Плазмиды и исходные ампликоны секвенировали по методу Сэнгера с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v. 3.1 (Applied Biosystems, США) на генетическом анализаторе серии 3500 (Applied Biosystems, США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью алгоритма MUSCLE, филогенетический анализ – метода максимального правдоподобия с учетом оптимальных моделей нуклеотидных замен в MEGA v.7.0.16. и байесовского анализа на основе метода Монте-Карло для марковских цепей также с учетом оптимальных моделей нуклеотидных замен в MrBayes v. 3.2.5. Для филогенетического анализа в качестве референтных были использованы последовательности из GenBank для близкородственных к исследуемым видам *E. stellata* Maxim., *W. geoides* Willd., *W. fragarioides* (Michx.) Tratt. и *A. flaccida* Schmidt.

Результаты показали, что, несмотря на образование исследованными реликтовыми видами метапопуляций [Чепинога и др., 2015], объединяющих популяции соседних рек, на более протяженных участках ареала вдоль северного макросклона хр. Хамар-Дабан для большинства видов перенос генов является лимитированным. Степень выявленных отличий между сибирскими популяциями *W. ternata* свидетельствует в пользу их непродолжительной изоляции друг от друга, а также, вероятно, о «хамар-дабанском» источнике происхождения восточносаянского и западносаянского генотипов. Для *E. sibirica* в настоящий момент ситуация менее однозначна, и нами не исключается наличие двойного источника происхождения хамар-дабанских популяций. Полученные результаты указывают также на то, что генетическая дистанция между хамар-дабанскими популяциями *Anemone baicalensis* и *W. ternata* и их близкородственными восточноазиатскими видами гораздо меньше, чем это предполагалась ранее на основании данных морфологического анализа и их географического распределения. Для *W. ternata* полученные результаты также свидетельствуют в пользу дальневосточного происхождения сибирских популяций этого вида.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-74-10074) и грантов Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 16-34-60135 мол_а_дк, 16-05-00783). Авторы благодарят ЦКП «Биоаналитика»

СИФИБР СО РАН за предоставленный доступ к оборудованию и ЦКП «Биоресурсный центр» СИФИБР СО РАН за предоставленный доступ к работе с гербарием, Н.С. Пробатову и Е.А. Пименову за помощь в сборе образцов из Приморского края, Н.В. Степанова за предоставление гербарных образцов *W. tanzyubeica*.

Литература

Положий А.В., Крапивкина Э.Д. Реликты третичных широколиственных лесов во флоре Сибири. – Томск: Изд-во Том. гос. ун-та, 1985. – 158 с.

Пробатова Н.С., Валидизация комбинации *Waldsteinia maximowicziana* (Teppner) Prob. (Rosaceae) // Новости систематики высших растений. – 2015. – № 46. – С. 237–238.

Протопопова М.В., Павличенко В.В., Гнутиков А.А., Адельшин Р.В., Чепинога В.В. Использование генетических маркеров для оценки состояния реликтовых видов растений Байкальской Сибири // Вестник РУДН. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2015. – № 4. – С. 28–36.

Протопопова М.В., Павличенко В.В., Коновалов А.Д., Золотовская Е.Д., Байрамова Э.М., Чепинога В.В. Перспективы использования внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) для идентификации редких видов растений на примере рода *Waldsteinia* (Rosaceae) // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». – 2016. – Т. 17. – С. 5–11.

Степанов Н.В. Новый вид рода *Waldsteinia* (Rosaceae) из Западного Саяна // Ботанический журнал. – 1994. – Т. 79, № 9. – С. 109–114.

Чепинога В.В., Мишина А.В., Протопопова М.В., Павличенко В.В., Быстров С.О., Вилор М.А. Новые данные о распространении некоторых неморальных реликтовых растений в предгорьях хребта Хамар-Дабан (Южное Прибайкалье) // Ботанический журнал. – 2015. – Т. 100, № 5. – С. 478–489.

Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. – 1987. – V. 19. – P. 11–15.

Utelli A., Roy B., Baltisberger M. Molecular and morphological analyses of European *Aconitum* species (Ranunculaceae) // Plant Systematics and Evolution. – 2000. – V. 224. – P. 195–212.

Wang L., Abbott R. J., Zheng W., Chen P., Wang Y., Liu J. History and evolution of alpine plants endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau: *Aconitum gymmandrum* (Ranunculaceae) // Molecular Ecology. – 2009. – V. 18, I. 4. – P. 709–21.

GENETIC DIVERGENCE OF RELICT PLANT SPECIES POPULATIONS IN BAIKAL SIBERIA AS A RESULT OF GLOBAL CLIMATE CHANGE

M.V. Protopopova¹, V.V. Pavlichenko¹, V.V. Chepinoga^{2,3}

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, marina.v.protopopova@gmail.com, vpavlichenko@gmail.com

²V.B. Sochava Institute of Geography of Siberian Branch RAS, Irkutsk, Russia

³Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, Victor.Chepinoga@gmail.com

Abstract. The impact of climate change on the current phylogeographic structure of South Siberian relict plant species using molecular genetic methods was studied. The results showed the limited gene flow between the populations of the model species within the Khamar-Daban Ridge, short-term isolation of Siberian populations of *Waldsteinia ternata* and *Eranthis sibirica*, a low level of genetic divergence of *Anemone baicalensis*, and *W. ternata* from their East Asian closely related species.

Keywords: global climate change, refugium, the Khamar-Daban Ridge, nemoral relicts, molecular markers

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЫСОКОГОРЬЯ НА РЯД ХАРАКТЕРИСТИК ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО

Н.В. Реутова¹, М. Б. Малаева², Т.В. Реутова¹, Ф.Р. Дреева¹, А. Х. Мисирова³

¹Центр географических исследований Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр «Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук», Нальчик, Россия, reutova371@mail.ru

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Медицинский консультативно-диагностический центр» Министерства здравоохранения Кабардино-Балкарской Республики, Нальчик, Россия, malaevamarianna@yandex.ru

³Автономная некоммерческая организация «Университет национальной технологической инициативы 2035», Москва, Россия, asia.missirova@gmail.com

Аннотация. Представлены результаты исследования влияния неблагоприятных условий высокогорья на *Taraxacum officinale* Wigg. Были обследованы растения данного вида на высотах 200, 600, 1300, 2000, 2700 и 3000 м над уровнем моря. Влияние экстремальных условий высокогорья на растения одуванчика лекарственного выразилось в снижении плодovitости, увеличении массы семян, возрастании частоты хромосомных аберраций.

Ключевые слова: одуванчик лекарственный, условия высокогорья

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-986-989

Условия высокогорья характеризуются целым рядом неблагоприятных факторов, действие которых нарастает с высотой. Это усиление солнечной радиации, снижение температуры воздуха, значительный суточный перепад температур, особенно в теплые периоды года, падение парциального давления газов и водяных паров, изменение почвенного состава и др. Весьма интересным является вопрос о механизмах приспособления к этому обширному комплексу неблагоприятных воздействий растений, пришедших в высокогорье сравнительно недавно. Примером таких видов являются одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Wigg.) и подорожник большой (*Plantago major* L.), которые поднялись в горах до значительных высот вслед за человеком при строительстве канатных дорог.

Объектом данного исследования является одуванчик лекарственный, который в Кабардино-Балкарской Республике (Центральный Кавказ) стал встречаться на высоте вплоть до 3000 м над уровнем моря в непосредственной близости от станций канатных дорог. Первые станции были введены в эксплуатацию в 1964 году.

Были обследованы растения данного вида на высотах 200, 600, 1300, 2000, 2700 и 3000 м над уровнем моря. Изученными признаками были: морфологические – высота растений, количество соцветий на одно растение, количество семян на одно соцветие, масса семян; физиологические – всхожесть и энергия прорастания (ЭП) семян; генетические – частота мутаций в корневой меристеме проростков из семенного потомства растений, произрастающих на разных высотах. Работы проводились в 2013–2015 годах. На высотах 2700 и 3000 м площадки находились возле станции канатной дороги на г. Чегет. На остальных высотах площадки были расположены в сельских районах, вдали от населенных пунктов и на расстоянии более 200 м от дорог. При отборе растений визуально отмечали площадь (примерно 10000 ± 200 м²), покрытую избранными для исследования видами растений. Всю площадь разбивали по диагонали на участки в 50 м², в каждом из которых проводили измерения. Для каждой высоты обследовали не менее 30 растений.

Для проведения дальнейших исследований не менее чем с 50 растений собирали семена и определяли массу 1000 плодов, всхожесть и энергию прорастания. Все эти показатели определяли в пяти повторностях. Семена проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при комнатной температуре в течение 10 дней. Энергию прорастания определяли как «средний срок прорастания одного семени».

Цитогенетические исследования проводили в клетках корневой меристемы проростков семенного потомства растений, произрастающих на разных высотах. Проростки фиксировали в спирт-уксусной (3:1) смеси не менее 2-х суток. Для длительного хранения зафиксированные проростки тщательно промывали в дистиллированной воде и переносили в 70 °спирт. Хранили при температуре +3-4 °С в холодильнике. Окрашивали ацетоорсеином, готовили временные давленные препараты и проводили анализ по общепринятой методике [Morais Leme, Marin-Morales, 2009].

Статистическую обработку проводили с использованием стандартных методов вариационной статистики, критерия Стьюдента и критерия Фишера для сравнения долей [Урбах, 1963].

В табл. 1 приведены средние за три года результаты по морфологическим признакам растений, произрастающих на разных высотах. Высота растений закономерно уменьшалась с ростом высоты над уровнем моря, что является общеизвестным фактом. Из этой закономерности выбилась высота 2700 м, что явно связано с погодными особенностями 2015 года. В этом году весна была холодная и затяжная. Растения на высотах от 200 до 2000 м собирали в начале и конце мая. Лето было очень жарким, а растения на высотах 2700 и 3000 м изучали в конце июля, и средняя высота 30 растений оказалась $27,37 \pm 1,21$ см и $19,02 \pm 1,32$, соответственно, что значительно больше этих показателей на высотах 1300 и 2000 м.

Таблица 1.
Морфологические признаки растений одуванчика лекарственного (средние 2013–2015 гг.)

Высота над у.м.	Высота растений (см)	Кол-во соцветий на одно растений (шт.)	Кол-во семян на одно соцветие (шт.)
200 м	$26,62 \pm 1,22$	$4,15 \pm 0,53$	$111,81 \pm 7,58$
600 м	$25,31 \pm 1,08$	$2,54 \pm 0,21$	$132,10 \pm 7,17$
1300 м	$16,77 \pm 0,90$	$2,13 \pm 0,21$	$88,14 \pm 6,36$
2050 м	$16,90 \pm 0,79$	$3,92 \pm 0,38$	$142,77 \pm 6,59$
2700 м	$20,83 \pm 1,21$	$3,10 \pm 0,52$	$87,51 \pm 7,81$
3050 м	$14,07 \pm 1,11$	$4,13 \pm 0,44$	$85,40 \pm 5,54$

Количество соцветий на одно растение оказалось очень вариабельным признаком. Из-за этой высокой вариабельности выявленные различия оказались статистически не значимыми. Никакой тенденции с увеличением высоты над уровнем моря по этому показателю не выявилось.

Количество семян на одно соцветие заметно уменьшилось, начиная с высоты 1300 м над у.м. Высота 2000 м значительно отличается по этому показателю от остальных высот, причем эта тенденция наблюдалась все три года. За весь период наблюдения количество семян на одно соцветие на высоте 2000 м над у.м. было самым большим. Явно прослеживалось стимулирующее влияние этой высоты на данный показатель.

В табл. 2 приведены показатели особенностей семенного размножения растений, произрастающих на разных высотах. Всхожесть повышается до высоты 2050 м над у.м, а затем резко снижается. Высоты 2700 и 3000 м характеризуются экстремальными условиями существования, что, по-видимому, и сказалось на всхожести.

По показателю энергии прорастания статистически значимых различий выявлено не было. Что касается веса 1000 плодов, то в целом просматривается тенденция к увеличению этого показателя с ростом высоты над уровнем моря. На самой большой высоте масса плодов снижается, что, скорее всего, связано с постоянным наличием недозрелых плодов.

Таблица 2.
Показатели семенного размножения одуванчика лекарственного (средние 2013–2015 гг.)

Высота над у.м. (м)	Всхожесть (%)	ЭП (сутки)	Масса 1000 плодов (г)
200 м	30,62±2,72	7,17±0,74	0,394±0,005
600 м	56,95±2,73	5,82±0,16	0,481±0,005
1300 м	58,91±2,26	5,94±0,06	0,365±0,004
2050 м	61,87±2,85	6,08±0,31	0,483±0,006
2700 м	38,69±5,59	6,20±0,23	0,792±0,013
3050 м	35,14±2,44	6,48±0,18	0,595±0,074

Кроме ряда морфологических и физиологических показателей мы изучили частоту хромосомных аномалий (ХА) у растений в ана/телофазе в 2014 году. Полученные результаты приведены в табл. 3. На высотах 600 и 1300 м этот показатель не изучали.

Таблица 3.
Частота хромосомных aberrаций у одуванчика лекарственного в ана/телофазе (2014 г.)

Высота над у.м. (м)	Всего клеток	В т.ч. с ХА	%
200 м	1016	91	8,96
2050 м	1017	120	11,80*
2700 м	1040	135	12,98**
3050 м	1035	146	14,11***

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

С ростом высоты над уровнем моря возрастает и частота мутаций в корневой меристеме проростков из семенного потомства растений, произрастающих на разных высотах.

Таким образом, влияние экстремальных условий высокогорья на растения одуванчика лекарственного выразилось в снижении плодовитости, увеличении массы семян, возрастании частоты хромосомных aberrаций.

Литература

Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. – М.: Изд-во Академии наук СССР, 1963. – 306 с.

Morais Leme D., Marin-Morales M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application // Mutat. Res. – 2009. – V. 682. – P. 71–81.

THE INFLUENCE OF HIGH MOUNTAIN CONDITIONS ON SOME CHARACTERISTICS OF THE DANDELION

N.V. Reutova¹, M.B. Malaeva², T.V. Reutova¹, F.R. Dreeva¹, A.Kh. Misirova³

¹Federal State Budgetary Scientific Establishment «Federal Scientific Center Kabardin-Balkar Scientific Center of the Russian Academy of Sciences», Center of Geographical Research, Nalchik, Russia, *reutova371@mail.ru*

²State Budgetary Institution of Health care "Medical consultative and diagnostic center" of the Ministry of health of Kabardino-Balkar Republic, Nalchik, Russia, *malaevamarianna@yandex.ru*

³University of National technological initiative 2035, Moscow, Russia, *asia.misirova@gmail.com*

Abstract. The impact of high mountain adverse conditions on the *Taraxacum officinale* Wigg. was studied. Plants of this species were examined at altitudes of 200, 600, 1300, 2000, 2700 and 3000 m above sea level. The effect of extreme high mountain conditions on plants of *Taraxacum officinale* resulted in the reduction of fertility, the increase in mass of seeds and enhancement of level of chromosomal aberrations.

Keywords: *dandelion, high mountain conditions*

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРИСПОСОБЛЕНИЯ РАСТЕНИЙ К УСЛОВИЯМ ВЫСОКОГОРЬЯ НА ПРИМЕРЕ ДВУХ ВИДОВ

Н.В. Реутова¹, М.Б. Малаева², Т.В. Реутова¹, Ф.Р. Дреева¹, А.Х. Мисирова³

¹Центр географических исследований Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр «Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук», Нальчик, Россия, *reutova371@mail.ru*

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Медицинский консультативно-диагностический центр» Министерства здравоохранения Кабардино-Балкарской Республики, Нальчик, Россия, *malaevamarianna@yandex.ru*

³Автономная некоммерческая организация «Университет национальной технологической инициативы 2035», Москва, Россия, *asia.missirova@gmail.com*

Аннотация. Приведены результаты исследования реакции растений *Taraxacum officinale* Wigg. и *Plantago major* L. на природный стресс (условия высокогорья). Изучали морфологические, физиологические и генетические признаки. Выявленными механизмами приспособления растений к природному стрессу являются увеличение запаса питательных веществ в семенах и возрастание частоты хромосомных aberrаций с ростом высоты над уровнем моря, что говорит о наличии генетического влияния природного стресса на растения.

Ключевые слова: природный стресс, растения, мутации

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-990-992

В данной работе проведено сравнительное изучение двух видов растений – одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) и подорожника большого (*Plantago major* L.), – произрастающих в условиях высокогорья. Оба этих вида поднялись в горы сравнительно недавно (примерно 50 лет назад) вслед за человеком при освоении рекреационной зоны Приэльбрусье. В настоящее время представители данных видов встречаются на высоте до 3000 м над уровнем моря, но подорожник на этой высоте практически не плодоносит.

Таблица 1.
Морфо-физиологические характеристики растений (средние за 2013–2015 годы)

Высота над у.м (м).	Высота растений (см)	Кол-во соцветий на 1 растение (шт.)	Кол-во семян на 1 соцветие (шт.)	Вес 1000 семян (г)	Всхожесть (%)	ЭП (сутки)
Подорожник большой (<i>Plantago major</i> L.)						
200	47,09±2,36	5,35±0,48	468,03±42,24	0,235±0,007	27,38±4,88	5,72±0,12
600	39,71±1,83	5,85±0,48	500,75±19,20	0,258±0,002	15,25±2,72	7,11±0,17
2050	25,35±1,46	6,42±0,89	347,43±22,86	0,281±0,005	41,67±3,90	5,27±0,08
2700*	14,07±0,753	3,3±0,37	450,2±39,49	0,259±0,000	60,25±3,70	5,50±0,11
Одуванчик лекарственный (<i>Taraxacum officinale</i> Wigg.)						
200 м	26,62±1,22	4,15±0,53	111,81±7,58	0,394±0,005	30,62±2,72	7,17±0,74
600 м	25,31±1,08	2,54±0,21	132,10±7,17	0,481±0,005	56,95±2,73	5,82±0,16
1300 м	16,77±0,90	2,13±0,21	88,14±6,36	0,365±0,004	58,91±2,26	5,94±0,06
2050 м	16,90±0,79	3,92±0,38	142,77±6,59	0,483±0,006	61,87±2,85	6,08±0,31
2700 м	20,83±1,21	3,10±0,52	87,51±7,81	0,792±0,013	38,69±5,59	6,20±0,23
3050 м	14,07±1,11	4,13±0,44	85,40±5,54	0,595±0,074	35,14±2,44	6,48±0,18

*данные только 2015 года.

Исследуемыми признаками были: морфологические – высота растений, количество соцветий на одно растение, количество семян на одно соцветие, масса семян; физиологические – всхожесть и энергия прорастания; генетические – частота хромосомных aberrаций (ХА) в корневой меристеме семенного потомства растений, произрастающих на разных высотах.

В табл. 1 приведены выше перечисленные показатели растений. Ожидаемо у обоих видов уменьшалась высота растений с ростом высоты над уровнем моря, что, скорее всего, связано с закономерным снижением температуры воздуха. Каких-либо общих для растений двух разных семейств закономерностей в изменении количества соцветий на одно растение и количества семян на одно соцветие с ростом высоты над уровнем моря не выявилось. Также не выявилось общих закономерностей и по обоим физиологическим признакам – всхожести и энергии прорастания семян.

Масса семян оказалась единственным из изученных признаков, для которого четко просматривается тенденция к изменению. С ростом высоты над уровнем моря у обоих видов закономерно увеличивалась масса семян, причем это имело место каждый год, несмотря на значительные различия в погодных условиях. Только на экстремально больших предельных высотах – 2700 м для подорожника и 3050 м для одуванчика – масса семян снижалась. Таким образом, увеличение запаса питательных веществ в семенах является приспособительным механизмом к условиям высокогорного стресса.

В табл. 2 приведены данные по генетическому влиянию условий высокогорья по сравнению с высотой наклонной равнины (200 м н.у.м.). В этой таблице использованы данные по подорожнику, взятые из ранее проведенных исследований [Реутова и др., 2015]. В 2014 году семена подорожника на высоте 2700 м не вызрели, поэтому в таблице эти данные отсутствуют.

Таблица 2.

Частота хромосомных aberrаций в ана/телофазе

Высота над у.м. (м)	Всего клеток	В т.ч. с ХА	%
Подорожник большой (<i>Plantago major</i> L.) 2013 г.			
200	1042	5	0,48
2050	1033	16	1,55*
2700	871	14	1,61*
Подорожник большой (<i>Plantago major</i> L.) 2014 г.			
200	978	7	0,71
2050	1033	24	2,32**
Одуванчик лекарственный (<i>Taraxacum officinale</i> Wigg.) 2014 г.			
200	1016	91	8,96
2050	1017	120	11,80*
2700	1040	135	12,98**
3050	1035	146	14,11***

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Как видно из табл. 2, с ростом высоты над уровнем моря увеличивается и частота хромосомных aberrаций в клетках корневой меристемы семенного потомства растений, произрастающих на разных высотах. Это является универсальной реакцией растений на условия природного стресса.

В результате проведенных исследований мы пришли к следующим выводам:

– одним из механизмов приспособления растений к условиям высокогорья у видов, заселивших данные территории сравнительно недавно, является увеличение запаса питательных веществ в семенах;

– в условиях высокогорья, начиная с высоты 2000 м, возрастает частота хромосомных aberrаций, что говорит о наличии генетического влияния природного стресса.

Литература

Реутова Н.В., Дреева Ф.Р., Реутова Т.В. Влияние условий высокогорья на морфогенетические характеристики подорожника большого (*Plantago major* L.) // Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН. – 2015. – Т. 64, № 2. – С. 252–257.

SOME ASPECTS OF PLANT ADAPTATION TO HIGH MOUNTAIN CONDITIONS ON THE EXAMPLE OF TWO SPECIES

N.V. Reutova¹, M.B. Malaeva², T.V. Reutova¹, F.R. Dreeva¹, A.Kh. Misirova³

¹Federal State Budgetary Scientific Establishment «Federal Scientific Center Kabardin-Balkar Scientific Center of the Russian Academy of Sciences», Center of Geographical Research, Nalchik, Russia, reutova371@mail.ru

²State Budgetary Institution of Health care "Medical consultative and diagnostic center" of the Ministry of health of Kabardino-Balkar Republic, Nalchik, Russia, malaevamarianna@yandex.ru

³University of National technological initiative 2035, Moscow, Russia, asia.misirova@gmail.com

Abstract. The results of the study of the reaction of plants *Taraxacum officinale* Wigg. and *Plantago major* L. to natural stress (conditions of the highlands) are presented. Morphological, physiological and genetic features were studied. The revealed mechanisms of plants adaptation to natural stress are: an increase in the supply of nutrients in seeds and an enhancement of the frequency of chromosomal aberrations according to increase in the height above sea level, which indicates the presence of the genetic impact of natural stress on plants.

Keywords: *natural stress, plants, mutations*

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ/ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ КАК ОДИН ИЗ ВЕДУЩИХ МЕХАНИЗМОВ ТОНКОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ

И.Ю. Субота, М.В. Кулинченко, Ю.М. Константинов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, isubota@mail.ru

Аннотация. Обратимая ковалентная модификация белков, такая как фосфорилирование/дефосфорилирование и тиол-дисульфидный обмен, имеет ведущее значение в тонкой метаболической регуляции ферментов. Модификации ферментов очень чувствительны к сигналам, в митохондриях важную сигнальную роль играют ионы Ca^{2+} . Проведено исследование уровня фосфорилирования митохондриальных белков в присутствии Ca^{2+} , вызывающих открытие CsA-чувствительной mPTP-поры, и митохондриальных дыхательных комплексов с помощью разделения белковых субъединиц методом 2DBN/SDS-PAGE электрофореза.

Ключевые слова: митохондрии, фосфорилирование/дефосфорилирование белков, ионы кальция

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-993-997

Регуляция ферментов за счет обратимых ковалентных модификаций имеет ведущее значение в так называемом тонком метаболическом контроле. Очевидно, фосфорилирование/дефосфорилирование и тиол-дисульфидный обмен – наиболее распространенные виды обратимых ковалентных модификаций белков у высших эукариот, включая растения. По крайней мере, 7 митохондриальных ферментов, связанных с дыханием растений, контролируются, хотя бы частично, с помощью фосфорилирования. В настоящее время в митохондриях арабидопсиса и гороха идентифицировано более 10 протеинкиназ и одна протеинфосфатаза. Согласно анализу *in silico*, в среднем, в митохондриях растений содержится около 50–200 протеинкиназ, столько же или больше белков-мишеней и 10–30 протеинфосфатаз [Juszczuk et al., 2007].

Обратимые ковалентные модификации ферментов очень чувствительны к сигналам. Среди внутриклеточных мессенджеров, участвующих в передаче сигнала в митохондриях, центральное место, очевидно, занимают ионы Ca^{2+} . Общеизвестно, что свободный кальций играет жизненно важную роль в клеточном развитии и вовлечен во многие физиологические функции, в частности, в развитие апоптоза. В митохондриях как в любом другом компартменте клетки, уровень Ca^{2+} постоянно изменяется в широких пределах. Ряд исследований продемонстрировали, что мембранный потенциал митохондрий и увеличение проницаемости внутренней мембраны митохондрий вовлечены в гомеостаз Ca^{2+} в растительных клетках. Показано, что ионы Ca^{2+} в концентрации 1-2.5 мМ запускают в митохондриях злаков события, связанные с начальными стадиями апоптоза (в частности, высокоамплитудное набухание митохондрий) [Virolainen et al., 2005]. Высокоамплитудное набухание митохондрий связано с открытием неселективной поры, сопровождаемое падением мембранного потенциала митохондрий. Ранее нами было показано, что митохондриальные протеинкиназы/протеинфосфатазы редокс-чувствительны [Субота и др., 2007]. Таким образом, при высокоамплитудном набухании митохондрий может происходить изменение уровня фосфорилирования/дефосфорилирования митохондриальных белков, что, возможно, является одним из этапов ответа на стресс, вызванный высокими концентрациями ионов Ca^{2+} .

В задачи работы входило исследование фосфорилирования/дефосфорилирования митохондриальных белков в присутствии ионов кальция в концентрации, вызывающей открытие CsA-чувствительной mPTP-поры. Кроме того, была проведена оценка активности фосфорилирования митохондриальных дыхательных комплексов с помощью разделения митохондрий на отдельные белковые субъединицы с помощью двумерного электрофореза в ПААГ (2DBN/SDS-PAGE) с последующей окраской флуоресцентным красителем Pro-Q Diamond, который позволяет непосредственно оценивать фосфорилирование белков и детектировать очень небольшие количества фосфопротеинов.

В экспериментах использовали свежевыделенные митохондрии, полученные из колеоптелей 3-х дневных этиолированных проростков кукурузы гибрида ВИР 46 МВ по методу [Konstantinov et al., 1988]. Анализ фосфорилирования белков в изолированных митохондриях проводили согласно методу [Субота и др., 2010] с использованием радиоактивно меченой [γ - 32 P]АТФ (ФГУП “ИРМ”, Россия). Полипептидный состав фосфорилированных белков анализировали в системе Лэммли [Laemmli, 1970] с последующим экспонированием гелей с рентгеновской пленкой. Иммунодетекцию проводили согласно методике [Timmons, Dunbar, 1990].

Как известно, об открытии поры свидетельствует так называемое высокоамплитудное набухание митохондрий. Набухание выделенных митохондрий измеряли спектрофотометрически при длине волны 540 нм в течение 30-40 мин сразу после выделения митохондрий. О набухании судили по падению оптической плотности митохондриальной суспензии. В качестве индукторов высокоамплитудного набухания применяли ионы Ca^{2+} в составе CaCl_2 (0.5 и 2 мМ). Обнаружено, что падение оптической плотности в данный промежуток времени отмечается в митохондриях, обработанных 2 мМ CaCl_2 , но не 0.5 мМ CaCl_2 . При совместном действии ионов Ca^{2+} и CsA (ингибитора mPTP- поры) набухания митохондрий не наблюдалось (рис. 1).

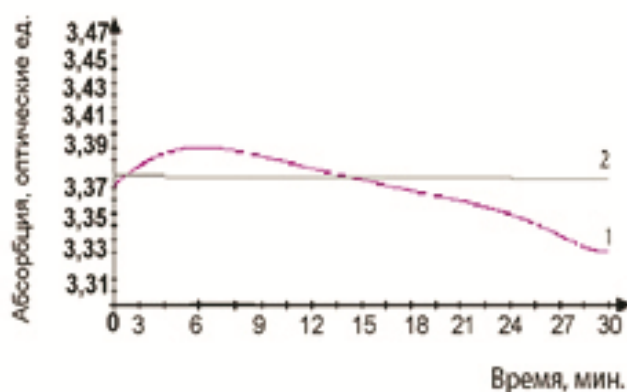


Рис. 1. Действие циклоспорина А на Ca^{2+} -индуцируемое набухание митохондрий, полученных из этиолированных проростков кукурузы. 1 - обработка CaCl_2 (2 мМ); 2 - обработка CaCl_2 (2 мМ)+циклоспорин А.

В наших экспериментах митохондрии находились в набухом состоянии с открытой порой около 15 мин, что приводило к выходу из межмембранного пространства цитохрома *c*. Совместное использование CaCl_2 и CsA предотвращало выход цитохрома *c*, что указывает на вовлеченность феномена неселективной митохондриальной проницаемости. Таким образом, при обработке изолированных митохондрий ионами кальция в концентрации 2 мМ моделировались события, связанные с начальными стадиями апоптоза, т.е. открытием неселективной поры и выходом цитохрома *c* из митохондрий.

Следующим этапом работы было исследование последствий открытия неселективной поры в отношении фосфорилирования/дефосфорилирования митохондриальных белков. С помощью метода фосфорилирования белков *in organello* показано, что обработка CaCl_2 (2 мМ) вызывала увеличение уровня фосфорилирования белков с мол. м. около 74, 61, 60 и 33 кДа. Однако, фосфорилирование белков с мол. м. около 51,5 кДа и 37 кДа в этих условиях было снижено по сравнению с контролем. В присутствии ионов Ca^{2+} в изолированных митохондриях дополнительно фосфорилировались полипептиды с мол. м. 66 кДа (определенный нами ранее как БТШ60) и 57 кДа (α -субъединица F_1 -комплекса АТФазы). Данный факт указывает на то, что в митохондриях кукурузы есть, по крайней мере, одна Ca^{2+} -зависимая протеинкиназа. Обнаружено, что при действии ионов кальция изменяется уровень фосфорилирования субъединиц F_1 -АТФазы, но не изменяется их синтез. Последнее касается как белков, кодируемых ядром (субъединица бета F_1 -АТФазы), так и митохондриями (альфа субъединица F_1 -АТФазы). Полученные нами данные об увеличении уровня фосфорилирования отдельных митохондриальных белков кукурузы под влиянием ионов кальция в концентрации, вызывающей открытие неселективной поры и выход цитохрома *c*, свидетельствуют о наличии тонкой регуляции ответа растительных митохондрий на абиотический стресс.

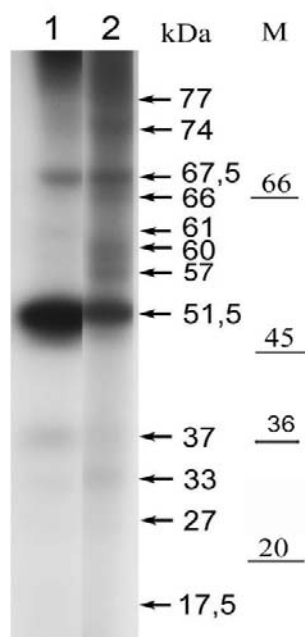


Рис. 2. Эффект ионов Ca^{2+} на уровень фосфорилирования митохондриальных белков кукурузы в системе *in organello*. 1 – контроль; 2 – обработка CaCl_2 (2 мМ). Авторадиограмма фосфорилирования митохондриальных белков.

В настоящее время получено большое количество результатов, свидетельствующих в пользу того, что фосфорилирование и автофосфорилирование комплексов окислительного фосфорилирования может играть значительную роль в регуляции активности этих мультифункциональных структур.

Относительно низкое содержание митохондриальных протеинкиназ в дыхательных комплексах митохондрий значительно ограничивает использование в их исследовании очень информативного подхода – разделения белков с помощью SDS-электрофореза в ПААГ с последующей их идентификацией масс-спектрометрией. В этом аспекте методика скрининга активных митохондриальных протеинкиназ с

помощью окраски фосфобелков специфическим флуоресцентным красителем в сочетании с blue-native электрофорезом (BN-PAGE) дает гораздо более информативные и корректные результаты.

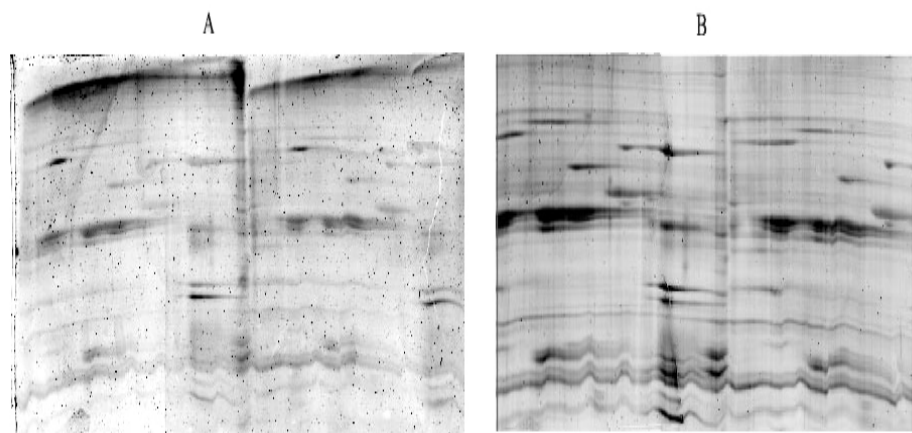


Рис. 3. А – фосфобелки митохондриальных дыхательных комплексов после 2D BN/SDS-PAGE, визуализированные с помощью Pro-Q Diamond; В – митохондриальные белки, окрашенные Sypro Ruby.

Для оценки активности фосфорилирования митохондриальных дыхательных комплексов митохондрии разделяли на отдельные белковые субъединицы с помощью двумерного электрофореза в ПААГ (2DBN/SDS-PAGE). Далее, для оценки эффективности фосфорилирования дыхательных комплексов гель экспонировали с красителем Pro-Q Diamond, анализ наличия фосфобелков и глубину их фосфорилирования проводили с помощью флуоресцентного сканера. Как видно на рис. 3, в митохондриальных мембранных комплексах фосфобелков гораздо меньше, чем белков, не подвергающихся данной посттрансляционной модификации.

Выражаем благодарность и искреннюю признательность к.б.н., н.с. Н.Е. Коротяевой за помощь в работе с флуоресцентным сканером.

Литература

Субота И.Ю., Арзиев А.Ш., Сенженко Л.П., Тарасенко В.И., Константинов Ю.М. Ингибиторный анализ фосфорилирования/дефосфорилирования белков в митохондриях кукурузы в зависимости от редокс-условий // Физиология растений. – 2007. – V. 54. – P. 389–396.

Субота И.Ю., Арзиев А.Ш., Сенженко Л.П., Тарасенко В.И., Невинский Г.А., Константинов Ю.М. Влияние ионов Ca^{2+} и цАМФ на редокс-зависимое фосфорилирование в митохондриях высших растений // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 1. – С. 42–49.

Juszczuk I.M., Bykova N.V., Moller I. M. Protein phosphorylation in plant mitochondria // *Physiol. Plant.* – 2007. – V. 129. – P. 90–103.

Konstantinov Yu.M., Lutsenko G.N., Podsozny V.A. Inhibition of adenine nucleotide translocation in maize seedling mitochondria by anionic detergents // *Physiol. Plant.* – 1988. – V. 72. – P. 403–406.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 174–182.

Timmons T.M., Dunbar B.S. Protein blotting and immunodetection // *Methods Enzymol.* – 1990. – V. 182. – P. 679–701.

Virolainen E., Blokhina O., Fagerstedt K. Ca²⁺-induced high amplitude swelling and cytochrome *c* release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress // Annals of Botany. – 2005. – V. 90. – P. 509–516.

PHOSPHORYLATION/DEPHOSPHORYLATION OF PROTEINS AS ONE OF THE MAIN MECHANISMS OF FINE REGULATION OF METABOLIC FUNCTIONS OF MITOCHONDRIA

I.Y. Subota, M.V. Kulinchenko, Yu.M. Konstantinov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, isubota@mail.ru

Abstract. Reversible covalent modification of proteins, such as phosphorylation/dephosphorylation and thiol-disulfide exchange, has an essential role in the fine metabolic regulation of enzymes. Modification of enzymes is very sensitive to signals, in mitochondria Ca²⁺ ions play an important signaling role. The level of phosphorylation of mitochondrial proteins in the presence of Ca²⁺, causing the opening of the CSA-sensitive mPTP-pore, and of mitochondrial respiratory complexes by separation of protein subunits in 2D BN/SDS-PAGE electrophoresis was studied.

Keywords: mitochondria, phosphorylation/dephosphorylation of protein, Ca²⁺ ions

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ДВОЙНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ RPOТmp ИЗ *ARABIDOPSIS THALIANA* В РАННЕМ РАЗВИТИИ РАСТЕНИЙ И В РЕАКЦИИ НА СТРЕСС

В.И. Тарасенко, Е.Ю. Гарник, А.И. Катышев, В.И. Бельков, Т.В. Яковлева, В.В. Черникова, Ю.М. Константинов, М.В. Кулинченко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *mk100171@yahoo.com*

Аннотация. RPOТmp является белком, локализующимся в митохондриях и в хлоропластах, однако основные функции данной NEP связаны с митохондриями. На основе растений дикого типа арабидопсиса были получены линии с митохондриальной (*Col-M*) и хлоропластной (*Col-P*) гиперэкспрессией RPOТmp. Показано, что, по сравнению с диким типом семена растений *Col-M* и *Col-P* имеют более высокий процент прорастания без стимуляции светом, имеют пониженную чувствительность к репрессирующему действию высоких концентраций сахарозы и к абсцизовой кислоте.

Ключевые слова: митохондрии *Arabidopsis thaliana*, РНК-полимеразы фагового типа, экспрессия генов растительных органелл, регуляция абсцизовой кислотой

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-998-1002

Геномы митохондрий и пластид очень малы по сравнению с геномами их бактериальных предков, однако транскрипционные механизмы этих органелл отличаются большой сложностью. У двудольных растений, включая арабидопсис, транскрипцию генов органелл осуществляют три РНК-полимеразы фагового типа, кодируемые в ядре, RPOТm, RPOТmp и RPOТp (NEP от *nuclear encoded polymerase*). RPOТp наряду с РНК-полимеразой эубактериального типа PEP (от *plastid encoded polymerase*) функционирует в хлоропластах, в митохондриях растений основную функцию выполняет RPOТm. RPOТmp, импортируется как в митохондрии, так и в хлоропласты, и предположительно участвует в контроле экспрессии генов обеих органелл. Роль RPOТmp в митохондриальной транскрипции подтверждается многими исследованиями [Emanuel et al., 2006; Courtois et al., 2007; Kühn et al., 2009 и др.]: было показано, что инсерционный мутант арабидопсиса по гену *rpot2*, кодирующему RPOТmp, характеризуется замедленным ростом, изменениями в морфологии листьев, экспрессии митохондриальных и, возможно, хлоропластных генов, пониженной активностью митохондриальных дыхательных комплексов I и IV [Kühn et al., 2009]. О потенциальном разделении в транскрипционной активности между RPOТm и RPOТmp в митохондриях известно немного. Функции же данной NEP-полимеразы в хлоропластах двудольных растений до сих пор остаются неясными и, вероятнее всего, ограничены ранними стадиями прорастания семян. Предполагают, что NEP-полимеразы транскрибируют гены в нефотосинтезирующих пластидах, поддерживая их метаболическую активность, а также необходимы в пропластидах для запуска транскрипции с участием PEP-полимеразы и их подготовки к дифференцировке в функциональные хлоропласты. Поскольку локализация и активность RPOТmp связана с двумя органеллами, очень различающимися по своим функциям и по типу экспрессии генов, выяснение роли этой РНК-полимеразы, специфика в осуществлении транскрипции генов органелл представляет собой значительный интерес. В то же время, двойная локализация RPOТmp делает весьма затруднительным анализ специфической роли, которую данный фермент играет в каждой из органелл, в особенности на уровне *in vivo*. Целью данной работы является изучение роли RPOТmp

в экспрессии генов органелл и потенциального влияния функций этой РНК-полимеразы на функции других NEP и в регуляции раннего развития растений.

Ранее нами были разработаны две генетические конструкции, в которых последовательность каталитической части гена *rpot2* арабидопсиса объединена с последовательностью, кодирующей транзитный пептид митохондриальной РНК-полимеразы RPOТm или с последовательностью, кодирующей транзитный пептид хлоропластной RPOТр [Tarasenko et al., 2016]. Данные генетические конструкции были использованы для агробактериальной трансформации растений арабидопсиса дикого типа (*Col-0*) и мутантной линии *rpotmp*, у которой в результате инсерции Т-ДНК инактивирован ген *rpot2* и не происходит образования функциональной РНК-полимеразы, с последующим отбором линий, экспрессирующих данную NEP с адресацией либо в митохондрии, либо в хлоропласты [Tarasenko et al., 2016]. На основе растений дикого типа были получены линии с митохондриальной (*Col-M*) и хлоропластной (*Col-P*) гиперэкспрессией RPOТmp; на основе растений мутанта *rpotmp* – линии с комплементацией функций RPOТmp в митохондриях (*Tmp-M*) и хлоропластах (*Tmp-P*). Растения арабидопсиса с гиперэкспрессией и комплементацией функций RPOТmp в митохондриях и хлоропластах представляют собой интересную модельную систему для изучения процессов митохондриально-ядерной и хлоропластно-ядерной ретроградной регуляции экспрессии генов. Известно, что дисфункция органелл является источником сигналов, передающихся в ядро и запускающих регуляторные механизмы, приводящие к изменению экспрессии ядерных генов. Растения, мутантные по компонентам митохондриальной дыхательной цепи (большая часть известных мутантов связана с инактивацией дыхательного комплекса I), широко используются для изучения ретроградной регуляции. Мутант *rpotmp* интересен тем, что имеет дефект функционирования всей дыхательной цепи, обусловленный в первую очередь сниженной активностью комплекса IV, мутанты по которому для арабидопсиса неизвестны. Полученные нами линии *Tmp-P* позволяют исследовать последствия нарушения функционирования дыхательной цепи митохондрий независимо от возможных побочных эффектов отсутствия RPOТmp в хлоропластах, равно как и возможные последствия отсутствия RPOТmp только в митохондриях – линии *Tmp-M*. В свою очередь, повышение уровня RPOТmp в митохондриях/хлоропластах также может активировать ретроградные сигналы, приводящие к изменению экспрессии ядерных генов, поэтому растения-гиперэкспрессоры RPOТmp в различных клеточных компартментах (линии *Col-M* и *Col-P*) могут быть использованы для выявления генов-мишеней подобной регуляции.

С помощью линий *Tmp-M* и *Tmp-P* было проведено исследование, позволившее установить, что функции RPOТmp связаны именно с митохондриями [Tarasenko et al., 2016]. Для дальнейшего изучения роли RPOТmp в экспрессии генов органелл и регуляции раннего развития растений, потенциального влияния функций этой РНК-полимеразы на функции других NEP были использованы линии с гиперэкспрессией RPOТmp, *Col-M* и *Col-P*. Линии трансформантов *Col-M*, в основном, сходны в своих признаках (внешнем облике, скорости роста растений, копийности митохондриального генома) с диким типом; линии трансформантов *Col-P*, в целом, характеризуются большей вариативностью этих признаков, а некоторые из них проявляют черты, сходные с мутантом *rpotmp*. У всех исследованных линий с гиперэкспрессией RPOТmp, вне зависимости от адресации белка, было отмечено отсутствие корреляции между количеством вставок трансгена и такими признаками, как уровень экспрессии рекомбинантной RPOТmp и копийность митохондриального генома. Для всех этих линий на фоне гиперэкспрессии RPOТmp характерно существенное снижение

экспрессии всех трех нативных NEP, что также не коррелирует с фенотипом, проявляемым растениями той или иной линии.

Дальнейшие исследования показали, что семена растений, гиперэкспрессирующих RPO7mp как митохондриальной (*Col-M*), так и пластидной (*Col-P*) адресации, имеют более высокий процент прорастания в полной темноте, без стимуляции светом, что не характерно для семян арабидопсиса дикого типа. Было установлено, что все линии арабидопсиса с гиперэкспрессией RPO7mp (*Col-M* и *Col-P*) демонстрируют пониженную чувствительность к репрессирующему действию высоких концентраций сахарозы при прорастании семян. Мы предположили, что это снижение чувствительности, как и способность семян гиперэкспрессоров к прорастанию без световой стимуляции, обусловлены изменениями в системе передачи/восприятия регуляторных сигналов, связанных с абсцизовой кислотой (АБК). Известно, что повышение уровня абсцизовой кислоты в растительной клетке является естественным физиологическим ответом на повышение уровня сахаров [Ramon et al., 2008]. Нарушения регуляции периода покоя семени также контролируются уровнем АБК.

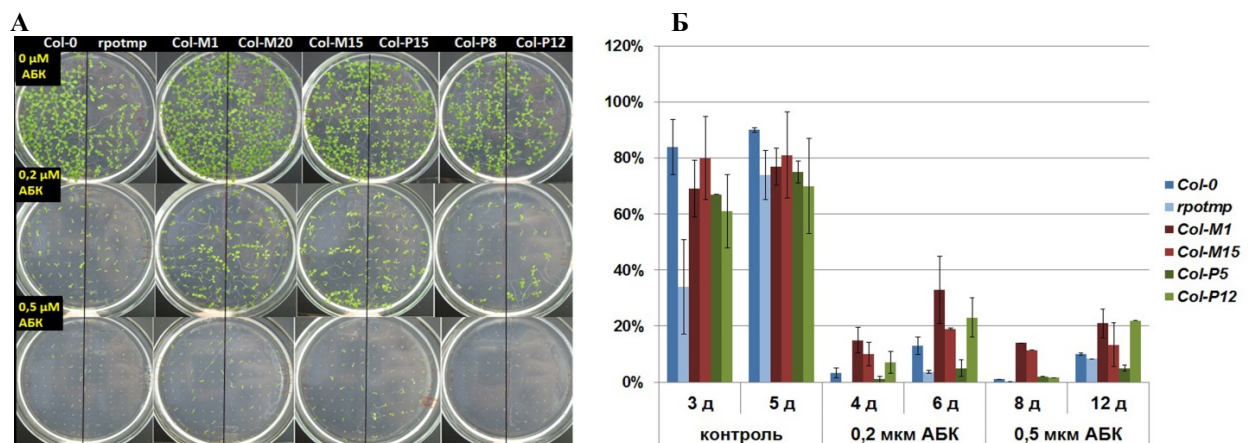


Рисунок. Прорастание семян нескольких линий с гиперэкспрессией RPO7mp, Col-M (M1, M15, M20) и Col-P (P5, P8, P12, P15), мутанта rpotmp и линии дикого типа (Col-0) на среде, содержащей абсцизовую кислоту. А. Прорастание семян на питательных средах, содержащих абсцизовую кислоту (АБК 0, 0,2 μM и 0,5 μM) на 10 сутки после окончания стратификации. Б. График прорастания семян шести линий арабидопсиса (*Col-0*, *rpotmp*, *Col-M1*, *Col-M15*, *Col-P5* и *Col-P12*) на средах, содержащих 0, 0,2 μM и 0,5 μM АБК. Представлен процент проросших семян, определенный от числа посаженных, через 3, 5 (контроль), 4, 6 (0,2 мкM АБК) и 8, 12 (0,5 мкM АБК) суток после окончания стратификации (данные не менее трех независимых биологических повторностей).

С целью выявления возможных физиологических путей регуляции РНК-полимеразы RPO7mp мы провели серию экспериментов, в которой тестировали влияние абсцизовой кислоты на прорастание семян линии дикого типа арабидопсиса *Col-0*, нокаут-мутанта по *rpot2* (*rpotmp*) и нескольких линий гиперэкспрессоров RPO7mp с митохондриальной (*Col-M*) и пластидной (*Col-P*) адресацией. На средах с 0,2 μM АБК доля проросших семян линии дикого типа через 3 и 4 суток после окончания стратификации была очень незначительной по сравнению с контрольными условиями и оставалась сниженной на 6 суток (рисунок, Б). Семена мутанта *rpotmp* начинали прорастать на сутки позже, как в контроле, так и на среде с 0,2 μM АБК. Семена линий гиперэкспрессоров прорастали с близкой к дикому типу всхожестью в контрольных условиях (без АБК). В присутствии 0,2 μM АБК семена линий с гиперэкспрессией RPO7mp начали прорастать через 4 суток после окончания

стратификации, хотя и со значительно более сниженной эффективностью (рисунок, А). При этом прорастание семян линий гиперэкспрессоров на среде с АБК коррелировало не с адресацией RPOTmp, а с фенотипическими признаками этих линий: линии, характеризующиеся фенотипом, близким к дикому типу (*Col-M1*, *Col-M15*, *Col-M20*, *Col-P12*), имели лучшую всхожесть на средах с АБК; линии с фенотипом, близким к *rpotmp* (*Col-P5*, *Col-P8*), проявляли сходную с мутантом чувствительность к АБК. На средах, содержащих 0,5 мМ АБК, прорастание семян дикого типа было отмечено лишь через 8 дней после окончания стратификации, семена мутанта *rpotmp* так и не проросли. Семена линий с гиперэкспрессией *Col-M* начали прорасти через 6-7 суток (рисунок, Б).

На основании данных, полученных с помощью метода ДНК-микрочипов (microarray), был проведен анализ изменения уровня транскриптов ядерных, хлоропластных и митохондриальных генов в линиях с гиперэкспрессией RPOTmp в митохондриях и хлоропластах (*Col-M15*, *Col-M20*, *Col-P5*, *Col-P12*) в сравнении с растениями дикого типа. Большинство генов, для которых было выявлено изменение в экспрессии, являются ядерными, следовательно, наблюдаемые изменения могут быть отнесены к ретроградной регуляции, то есть зависящей от изменений, происходящих в органеллах. Более детальный анализ характера изменения экспрессии генов у исследуемых линий позволил выявить ряд интересных фактов. Повышение уровня экспрессии RPOTmp приводит к запуску каких-то ядерных и цитоплазматических сигналов, изменяющих экспрессию генов ряда регуляторных и метаболических путей, вне зависимости от адресации этой РНК-полимеразы в митохондрии или хлоропласты. Прежде всего, стоит отметить, что наблюдаемая нами повышенная способность семян линий с гиперэкспрессией RPOTmp к прорастанию на средах, содержащих абсцизовую кислоту, в сравнении с диким типом, находит отражение в снижении экспрессии генов, кодирующих белки и факторы, участвующие в механизмах, регулируемых с участием АБК (было выявлено 7 таких генов). Многие другие выявленные гены кодируют продукты, имеющие отношение к реакции растительного организма на стресс.

Мы полагаем, что дальнейшее изучение экспрессии избранных генов во всех имеющихся в нашем распоряжении линиях арабидопсиса с комплементацией функций RPOTmp и с гиперэкспрессией RPOTmp на разных стадиях развития растений и в различных стрессовых условиях позволит нам детально охарактеризовать роль данной NER двойной локализации не только в различных клеточных компартментах, митохондриях и хлоропластах, но и в развитии всего организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-04-00626).

Литература

Courtois F., Merendino L., Demarsy E., Mache R., Lerbs-Mache S. Phage-type RNA polymerase RPOTmp transcribes the *rrn* operon from the PC promoter at early developmental stages in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. – 2007. – V. 145. – P. 712–721.

Emanuel C., von Groll U., Müller M., Börner T., Weihe A. Development- and tissue-specific expression of the RPO gene family of *Arabidopsis* encoding mitochondrial and plastid RNA polymerases // *Planta*. – 2006. – V. 223. – P. 998–1009.

Kühn K., Richter U., Meyer E., Delannoy E., de Longevialle A.F., O'Toole N., Börner T., Millar H., Small I., Whelan J. Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Cell*. – 2009. – V. 21. – P. 2762–2779.

Ramon M., Rolland F., Sheen J. Sugar Sensing and Signaling // *The Arabidopsis Book*. – 2008. – No. 6. – e0117.

Tarasenko V.I., Katyshev A.I., Yakovleva T.V., Garnik E.Y., Chernikova V.V., Konstantinov Y.M., Koulintchenko M. RPOTmp, an Arabidopsis RNA polymerase with dual targeting, plays an important role in mitochondria, but not in chloroplasts // J. Exp. Bot. – 2016. – V. 67. – P. 5657–5669.

**STUDY OF ROLE OF THE ARABIDOPSIS DUAL-TARGETING RNA
POLYMERASE RPOTmp IN EARLY PLANT DEVELOPMENT AND IN STRESS
RESPONSES**

V.I. Tarasenko, E.Yu. Garnik, A.I. Katyshev, V.I. Belkov, T.V. Yakovleva,
V.V. Chernikova, Yu.M. Konstantinov, M.V. Koulintchenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian
Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *mk100171@yahoo.com*

Abstract. RPOTmp is a protein localized both in mitochondria and chloroplasts, but main functions of this NEP are associated with mitochondria. Using the Arabidopsis wild type plants, we obtained lines with the mitochondrial (*Col-M*) and chloroplast (*Col-P*) RPOTmp overexpression. It was shown that compared to the wild type the germination of *Col-M* and *Col-P* seeds is less effected by the absence of light stimulation, less sensitive to the repressing effect of high sucrose concentrations and to abscisic acid.

Keywords: *Arabidopsis thaliana* mitochondria, phage-type RNA polymerase, expression of plant organelle genes, regulation of abscisic acid

**ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ
РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ К СВЕТУ НА МОДЕЛИ БЕСХЛОРОФИЛЬНЫХ
МУТАНТОВ ЗЕЛЕННОЙ ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ВОДОРОСЛИ
*CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

Е.М. Чекунова, А.Б. Матиив, Т.С. Юшкина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия, elena_chekunova@mail.ru

Аннотация. Генетические механизмы адаптации фотосинтезирующей клетки к свету изучали на модели бесхлорофильных, накапливающих протопорфинин, мутантов зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* и их ревертантов. Мутантный фенотип обусловлен подавлением активности фермента биосинтеза хлорофилла – магний-хелатазы (МХ). Обнаружены гены, контролирующие МХ у *C. reinhardtii*: *CHLH*, *LTS3*, *SUP3* и *SUP-1*. Структурный ген *CHLH* кодирует Н-субъединицу МХ. Продукты остальных генов регулируют её активность.

Ключевые слова: хлорофиллы, магний-хелатаза, *Chlamydomonas reinhardtii*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1003-1007

Фототрофные бактерии и пластиды растений содержат бактериохлорофиллы и хлорофиллы (Хл) – тетрапиррольные пигменты фотосинтеза, – биологического процесса, определяющего развитие жизни на Земле. Понимание механизмов биосинтеза, функционирования и регуляции молекул Хл, а также закономерностей эволюционных изменений, которые они претерпели при адаптации к различным экологическим факторам, является фундаментальной проблемой современной науки.

Исследования молекулярно-генетических механизмов адаптации фотосинтезирующей клетки к условиям освещения ведутся на модели одноклеточной зелёной водоросли *Chlamydomonas (C.) reinhardtii* – модельного объекта генетики фотосинтеза. Её способность синтезировать Хл в гетеротрофных условиях позволяет получать мутанты по двум путям биосинтеза – темновому и зависимому от света [Чекунова, Ладыгин, 2014]. Уникальная генетическая коллекция пигментных мутантов *C. reinhardtii*, созданная на кафедре генетики СПбГУ, положила начало исследованиям генетики метаболизма пигментов фотосинтеза – Хл и каротиноидов.

Предмет исследований – бесхлорофильные мутанты зелёной одноклеточной водоросли *C. reinhardtii* по двум генам: *CHLH* и *LTS3*, контролирующим структуру и функции ключевого фермента биосинтеза хлорофилла (БХ) – магний-хелатазы (МХ), их ревертанты и обратные мутанты. Ген *CHLH* кодирует большую субъединицу МХ [Chekunova et al., 2001]. Молекулярная идентификация и анализ структуры гена *LTS3* показали, что он кодирует ДНК-связывающий белок семейства GATA. Эти данные позволили предположить, что белок *LTS3* является фактором транскрипции, который активирует экспрессию генов, кодирующих ферменты БХ: магний-хелатазу (МХ) и комплекса, синтезирующего 5-аминолевулиновую кислоту (АЛК) в темноте, и участвует в адаптации к свету клеток гетеротрофно-выращенных культур [Чекунова, Савельева, 2010]. Методом ОТ-ПЦР было показано, что транскрипция гена *LTS3* в норме негативно регулируется светом и позитивно – ацетатом (основным источником углерода в гетеротрофных условиях роста). У мутантов по гену *LTS3*, выращенных в темноте, нарушено формирование мембранных структур клетки, которые быстро восстанавливаются при освещении. По-видимому, плейотропный эффект мутации *brc-1* в гене *LTS3* состоит в нарушении синтеза глицеролипидов [Semenova et al., 2015].

У ревертантов, полученных на основе бесхлорофильных мутантов *C. reinhardtii*, темновой синтез Хл оказался восстановлен за счет «включения» в результате супрессорных мутаций альтернативных путей биосинтеза. На модели ревертантов, полученных от пигментных мутантов *C. reinhardtii* по гену *LTS3*, был проведен поиск новых компонентов регуляторной машины клетки *C. reinhardtii*, задействованных в контроле БХ в условиях отсутствия функционального белка *LTS3*. Для их обнаружения из клеточной культуры мутанта Вгс-1 по гену *LTS3* был отобран зеленый в темноте спонтанный ревертант Вгс-8. Сходный уровень содержания Хл в его темновых и световых культурах свидетельствовал о восстановлении темнового синтеза Хл.

Способность штамма Вгс-8 зеленеть в темноте – наследуемый признак. Тетрадный анализ показал, что реверсия произошла в результате единичной ядерной рецессивной мутации *sup-3* в гене *SUP-3*, который сцеплен с геном *LTS3 C. reinhardtii*. Эффект мутации не аллелоспецифичен, – она супрессирует обе мутантные аллели гена *LTS3*. Наличие межгенной супрессии и отсутствие её аллельной специфичности свидетельствовало о включении альтернативного механизма регуляции. По-видимому, фактор *SUP-3* в норме репрессирует темновой БХ, а мутация *sup-3* блокирует эту функцию. Учитывая свойства продукта гена *LTS3* активировать в темноте транскрипцию генов БХ, предположили, что в случае его дисфункции в клетках водоросли включается альтернативный путь темновой активации экспрессии этих генов (W2), в норме, находящийся под негативным контролем белка *SUP-3*. Восстановление способности синтезировать Хл у ревертанта Вгс-8 связано с усилением активности МХ в темноте. Она в 7 раз превышала активность этого фермента в темновых культурах исходного мутанта Вгс-1 и снижалась на свету, означая, что путь W2 негативно регулируется светом. *SUP-3* – сильный репрессор, – мутация в гене *SUP-3* вела к двукратному повышению активности МХ в темноте даже по сравнению с диким типом.

Для обнаружения дополнительных факторов активации синтеза Хл в темноте на основе зеленого ревертанта Вгс-8 был получен мутант Т8-3, у которого инсерция *sup-1* привела к возврату фенотипа исходного, оранжевого в темноте, штамма Вгс-1. Пигментный состав темновых культур мутантов Т8-3 и Вгс-1 был одинаков – они накапливали протопорфирин IX и небольшое количество его магниевых производных, однако трансформант утратил способность расти и зеленеть на свету. Методами гибридологического анализа было установлено, что инсерция наследуется по моногенной схеме, и мутации оранжевости не рекомбинируют и не комплементируют. Генетический анализ и изучение пигментного состава клеток Т8-3 позволили определить его генотип: *brc-1, sup-3, sup-1*, подтвердив, что оранжевая в темноте окраска клеток Т8-3 обусловлена мутацией *brc-1* в гене *LTS3*. Высокий уровень активности МХ, выявленный у трансформанта, сопоставимый с таковым у ревертанта Вгс-8, указал, что эффект мутации *sup-3* сохранен в его клетках, но инсерция (*sup-1*) блокировала способность к зеленению. На фоне гомозиготы по мутациям в гене *LTS3* проявление аллели *sup-1*, – потеря способности к зеленению, носит доминантный характер, – признак сохранялся у гетерозигот *sup-1/+*. При этом, дигетерозиготы *lts3/+, sup-1/+* растут на свету фотоавтотрофно. Эффект инсерционной мутации (по доминантному/рецессивному типу) зависит от отсутствия/наличия в клетке продукта гена *LTS3*, означая, что гены *LTS3* и *SUP-1* взаимодействуют, и продукт делетированного гена, названного *SUP-1*, активен при наличии нормального белка *LTS3*. Для идентификации гена *SUP-1 C. reinhardtii* в геноме трансформанта Т8-3 фланкирующие инсерцию нуклеотидные последовательности искали методом «*Ligation-mediated suppression-PCR*». Инсерция оказалась встроенной в хромосому 13 в положении 1194741 пн. В Базе данных геномного проекта была найдена мРНК

(au5.g4469_t1), которая принадлежит гену *SUP-I*, локализованному на хромосоме 13 (в положении 1193966-1195740). Его структура была воссоздана путем сравнения нуклеотидных последовательностей геномной ДНК и транскрипта этого гена. Ген *SUP-I* включает 2 интрона, первый из которых расположен в 5'-некодирующей области. Транскрипт размером 933 пар оснований кодирует белок (виртуальный) из 108 аминокислотных остатков массой 11,5 kDa. Область (-800 – +1) этого гена содержит несколько элементов GATA – мишеней транскрипционной регуляции ZnF_GATA ФТ. Отсутствие хлоропластных и митохондриальных транзитных последовательностей (программы: *ChloroP* и *mitoprot*) и наличие сайта фосфорилирования протеинкиназой С (PKC) свидетельствуют, что, белок SUP-I функционирует в ядре и задействован в сигнальной трансдукции. Оценка его влияния на экспрессию гена *LTS3* показала, что выключение гена *SUP-I* у трансформанта T8-3 резко снижает уровень *LTS3*-транскриптов [Чекунова и др., 2014]. По-видимому, белок SUP-I участвует в активации транскрипции гена *LTS3* в темноте, и оба белка *LTS3* и SUP-I входят в состав регуляторной системы, контролирующей работу MX. Белок SUP-3 в норме подавляет иной путь (W2) активации MX у хламидомонады.

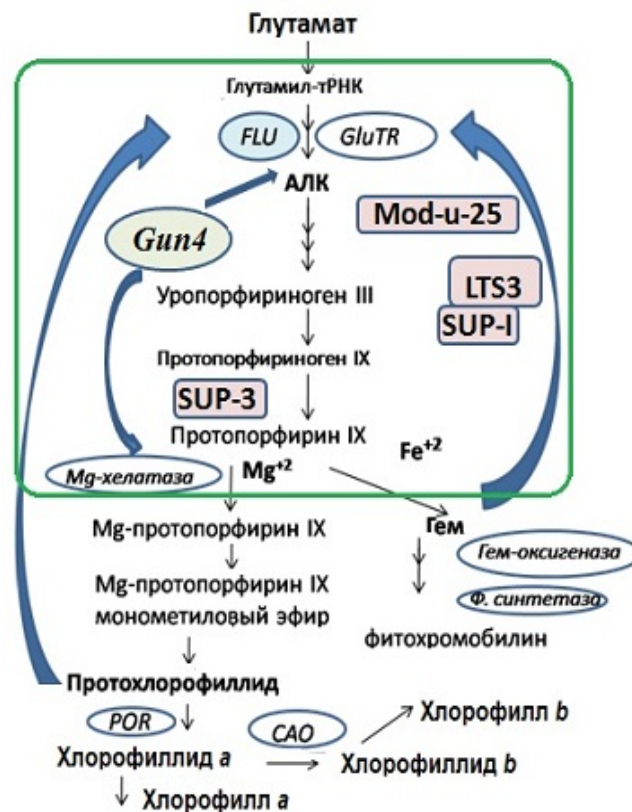


Рисунок. Факторы регуляции синтеза Хл у *C. reinhardtii*. Посттрансляционно синтез АЛК репрессируют (стрелки): протохлорофиллид, связываясь с белком FLU, и гем, взаимодействуя с ферментом глутамил-тРНК редуктазой (GluTR). Белок Gun4 связывает магний-хелатазу (MX) с мембранами хлоропласта, активируя фермент. Новые факторы регуляции, обнаруженные в работе: темновой биосинтез Хл обеспечивается путем транскрипционной регуляции генов, кодирующих MX и АЛК-комплекс. Фактор *LTS3* активует их транскрипцию; фактор *SUP-3* репрессирует MX; фактор *SUP-I* – активатор транскрипции гена *LTS3*; *Mod-u-25* – репрессор синтеза АЛК и MX. Гены, обнаруженные в работе, – в прямоугольниках. Контур – область *feedforward*-транскрипционной регуляции.

К настоящему времени удалось обнаружить несколько генов, контролирующих функционирование МХ у *C. reinhardtii*: *CHLH*, *LTS3*, *SUP3*, *SUP-1* и *Mod-u-25*. Структурный ген *CHLH* оказался геном большой Н-субъединицы МХ. Продукты остальных генов регулируют активность этого фермента. Ген *LTS3* кодирует фактор транскрипционной регуляции – активатор генов МХ в темноте. Продукт гена *SUP-1*, по-видимому, вместе с фактором *LTS3* входит в состав регуляторной системы, координирующей работу МХ. Белок, кодируемый геном *SUP-3*, в норме подавляет иной путь активации МХ у хламидомонады. Таким образом, у *C. reinhardtii* первый специфический фермент биосинтеза Хл – МХ оказался важнейшим компонентом системы регуляции процессов хлорофиллообразования. Удалось обнаружить два пути активации МХ в темноте. В первом пути задействованы факторы транскрипционной регуляции *LTS3* и *SUP-1*. В случае его блокирования возможно переключение на альтернативный путь, в норме репрессированный продуктом гена *SUP3*.

Изучение мутантов-продуцентов протопорфирина привело к обнаружению нового механизма ретроградной (из хлоропласта в ядро) регуляции, препятствующего накоплению этого сильного фотосенсибилизатора, разрушающего клетки *C. reinhardtii* при освещении. Его контролирует ген хлоропласта, названный *Mod-u-25*, – негативный регулятор синтеза АЛК [Чекунова и др., 1993]. Полученные результаты позволяют говорить о существовании в системе регуляции БХ у хламидомонады регуляторного контура, координирующего работу двух ферментативных комплексов – МХ и синтеза АЛК (рисунок). В отличие от известного посттрансляционного механизма обратного ингибирования (*feedback*) АЛК геном и протохлорофиллидом, он, по-видимому, представляет собой систему «*feedforward*», которая осуществляет одновременную «настройку» работы этих двух ферментных комплексов. На посттрансляционном уровне модулятором этого контура служит белок *Gun4*, а за транскрипционную активацию генов обоих ферментных комплексов отвечают продукты генов *LTS3* и *SUP-1*.

Литература

Ладыгин В.Г., Чекунова Е.М., Семенова Г.А., Кособрюхов А.А. Структурно-функциональная организация клеток мутанта *Bgc-1 Chlamydomonas reinhardtii*, накапливающего протопорфирин IX в темноте // Биофизика. – 2014. – Т. 59, Вып. 4. – С. 692–703.

Чекунова Е.М., Ладыгин В.Г. Исследование генетического контроля биосинтеза и метаболизма хлорофилла с использованием мутагенеза и генной инженерии / коллективная монография в двух томах «Фотосинтез: открытые вопросы и что мы знаем о нем» / под ред. Алахвердиева С.И., Рубина А.Б., Шувалова А.В. – Ижевск: Издательство АНО «ИИКИ», 2014. – Т. 2. – С. 169–268.

Чекунова Е.М., Савельева Н.В. Ген *LTS3* контролирует светонезависимый биосинтез хлорофилла у зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Экологическая генетика. – 2010. – № 2. – С. 35–44.

Чекунова Е.М., Шальго Н.В., Яронская Е.Б., Аверина Н.Г., Чунаев А.С. Регуляция биосинтеза предшественников хлорофилла в мутантах зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Биохимия. – 1993. – Т. 58, № 9. – С. 1430–1436.

Чекунова Е.М., Яронская Е.Б., Ярцева Н.В., Аверина Н.Г. Новые факторы регуляции магний-хелатазы у зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиология растений. – 2014. – Т. 61, № 2. – С. 1–9.

Chekunova E.M., Y. Papenbrock, V. Voronetskaya, B. Grimm, C.F. Beck. Molecular characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants defective in H subunit of Magnesium chelatase // Mol. Gen. Genet. – 2001. – V. 266. – P. 363–373.

Semenova G.A., Chekunova E.M., Ladygin V.G. Light-dependent synthesis of cell membranes in the *Chlamydomonas reinhardtii* mutant Brc-1 // Cell and Tissue Biology. – 2015.– V. 9, No. 5.– P. 415–421.

**INVESTIGATIONS OF THE GENETIC MECHANISMS OF PLANT CELL
ADAPTATION TO THE LIGHT ON THE MODEL OF CHLOROPHYLL-LESS
MUTANTS OF UNICELLULAR GREEN ALGAE
*CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

E.M. Chekunova, A.B. Matiiv, T.S. Ushkina

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Saint-Petersburg State University», Saint-Petersburg, Russia, *elena_chekunova@mail.ru*

Abstract. Genetic mechanisms of photosynthetic cell adaptation to light have been studied on the model of chlorophyll-less, accumulating protoporphin mutants of green alga *Chlamydomonas (C.) reinhardtii* and their revertants. The mutant phenotype is due to the suppression of the activity of the chlorophyll biosynthesis (CB) enzyme the magnesium chelatase (MCh). The genes controlling MCh in *C. reinhardtii*: *CHLH*, *LTS3*, *SUP3* and *SUP-1* were detected. The structural gene *CHLH* encodes the H-subunit of MCh. Products of other genes regulate its activity.

Keywords: *chlorophylls, magnesium-chelatase, Chlamydomonas reinhardtii*

УСТОЙЧИВЫЕ К БОЛЕЗНЯМ ДИГАПЛОИДНЫЕ И ИНТРОГРЕССИВНЫЕ ЛИНИИ ПШЕНИЦЫ ДЛЯ ОРГАНИЧЕСКОГО ЗЕМЛЕДЕЛИЯ

В.А. Чудинов¹, Т.В. Савин¹, К. Кожаметов², А.И. Абугалиева²

¹Карабалыкская сельскохозяйственная опытная станция, Карабалык, Казахстан, Savintimur_83@mail.ru

²Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, Алмалыбак, Казахстан

Аннотация. Изучение физиолого-биохимических закономерностей формирования стрессоустойчивости дигаплоидных и интрогрессивных линий яровой пшеницы проведено современными NDVI методами. На фоне эпифитотии стеблевой ржавчины, сложившейся в климатических условиях Карабалыкской СХОС, комплексную устойчивость к двум видам ржавчины по многолетним данным имели сорта Дива, Умай, образцы яровой мягкой пшеницы, полученные от скрещивания с дикими сородичами 6625×*T. timopheevi* и Казахстанская 10×*T. dicocum*.

Ключевые слова: пшеница, дигаплоиды, синтетики, устойчивость к болезням, органическое земледелие

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1008-1011

Бурая ржавчина (*Puccinia triticina*) является наиболее распространенным и вредоносным заболеванием яровой пшеницы на севере Казахстана. Наиболее эффективной мерой борьбы с бурой ржавчиной является создание устойчивых к ним сортов. При их создании наиболее перспективно выявление иммунного материала из коллекционных образцов различного эколого-географического происхождения, скрещивание доноров устойчивости с местными сортами и отбор из гибридных популяций ржавчиноустойчивых форм. Бурая ржавчина проявлялась в различных регионах в той или иной степени практически ежегодно. Наибольшее проявление ржавчины было отмечено в 2000, 2002, 2007, 2008, 2012 и 2013 гг.

Цель исследований – выделение и отбор стрессоустойчивых форм по продуктивности на Севере Казахстана (синтетики и дигаплоидная пшеница) пшеницы и их устойчивости к болезням. Изучение физиолого-биохимических закономерностей формирования засухоустойчивости и устойчивости к болезням на фоне продуктивности ДГЛ яровой пшеницы и интрогрессивных линий в процессе вегетации проведены современными методами NDVI фенотипирования в условиях Севера Казахстана.

Объектом исследований являются дигаплоидные линии яровой мягкой пшеницы, гибридные популяции яровой мягкой пшеницы, полученные с использованием диких сородичей культуры [Кожаметов, 2010].

Фенологические наблюдения, визуальные оценки и учеты, анализ снопового материала проводили согласно [Лукьянова и др., 1981]. Фенотипирование проведено на основе использования GreenSeeker.

В питомнике 2015-2017 года проходили изучение изначально 442, 124 линии и 34 линии, полученные методом отбора из поколения D₃ 2014 года. Скрининг проводился на однородность, продуктивность, устойчивость к болезням и другим стрессовым факторам среды. С целью определения степени стрессоустойчивости измеряли вегетационный индекс, используя прибор Green Seeker Handheld. В результате проведенных исследований в полевых условиях по признаку однородности были убраны 34 линии.

Комплексная оценка дигаплоидных линий сорта Казахстанская раннеспелая показала, что уровень урожайности варьировал от 25,1 до 41,6 ц/га (табл. 1), средняя

урожайность по питомнику составила 34,7 ц/га. В табл. 1 показаны лучшие линии по зерновой продуктивности.

Последние годы (2013-2017 гг.) отличались высокой эпифитотией бурой листовой ржавчины. Как видно из представленной таблицы, все линии питомника поражаются данным патогеном в высокой степени от 50 до 100%, однако при этом сохраняют достаточно высокую зерновую продуктивность.

Комплексная оценка дигиплоидных линий сорта Казахстанская раннеспелая показала, что уровень урожайности варьировал от 15,9 до 24,1 ц/га, средняя урожайность по питомнику составила 21,6 ц/га. При урожайности стандарта 11,0 ц/га в 2017 г.

Таблица 1.
Характеристика лучших дигиплоидных линий яровой мягкой пшеницы в условиях Карабалыкской СХОС, 2016 год

№ линии	Период вегетации, дней	Болезни, %		Ц/га
		бурая ржавчина	стеблевая ржавчина	
107	74	50	50	41,6
9	76	75	50	41,6
21	73	75	25	41,3
62	77	75	15	41,3
95	78	75	15	41,0
58	73	75	15	40,8
101	78	50	25	40,4
55	76	75	25	40,3
104	74	50	15	40,1
115	74	75	15	40,1
20	73	50	15	40,0
27	72	75	15	39,8
33	76	100	25	39,6
109	73	50	25	39,1
111	77	75	15	39,1
90	73	75	15	38,8
23	76	50	25	38,8
52	75	75	15	38,7
37	73	75	15	38,5
92	73	100	25	38,5
93	78	100	25	38,4
110	77	75	25	38,4
94	74	100	15	38,2
60	76	75	10	38,0
49	73	100	15	37,4
65	75	50	25	37,4
117	77	100	25	37,4

В настоящий питомник сортообразцов, устойчивых к бурой листовой ржавчине вошли сорта яровой мягкой пшеницы, в происхождение которых входят источники устойчивости к бурой листовой ржавчине, полученные от диких сородичей пшеницы, а также сортообразцы полбы Гремме и Фараон (Темирбекова С.). Результаты исследований питомника показаны в табл. 2.

На фоне эпифитотии стеблевой ржавчины, сложившейся в климатических условиях Карабалыкской СХОС в 2015-2017 гг., среди состава питомника комплексную

устойчивость к двум видам ржавчины имели сорта Дива, Умай (15%). Из числа образцов яровой мягкой пшеницы, полученных от скрещивания с дикими сородичами, устойчивостью отличились 6625×*T. timopheevi* и Казахстанская 10×*T. dicocum* (5-15%). При этом поражение стандартных сортов составило 100% [Abugaliyeva, 2015].

Таблица 2.

Результаты испытания сортообразцов полбы и яровой мягкой пшеницы, полученных от скрещиваний с дикими формами

Сорт	Урожайность, ц/га				Болезни, %	
	2015	2016	2017	среднее	бурая ржавчина	стеблевая ржавчина
Карабалыкская 90	18,4	35,9	19,1	24,5	100	75
Казахстанская р/с	10,8	37,3	20,0	22,7	100	75
Греммэ	10,5	43,2	22,3	25,3	75	0
Фараон	9,1	39,5	25,6	24,7	75	5
Дива	14,1	44,4	40,2	32,9	15	0
Умай	13,6	43,1	39,4	32,0	15	0
Ильинская× <i>T. timopheevi</i>	10,3	40,3	30,2	26,9	75	50
Казахстанская 10× <i>T. kiharae</i>	10,8	43,3	29,8	27,9	75	50
Каз. Раннеспелая× <i>T. timopheevi</i>	8,6	41,1	35,7	28,5	20	50
6625× <i>T. timopheevi</i>	7,4	42,1	38,4	29,3	15	5
6583× <i>T. timopheevi</i>	9,1	41,2	29,1	26,5	75	75
Казахстанская 10× <i>T. dicocum</i>	9,9	40,6	26,7	25,7	50	10
НСР ₀₅	2,1	3,0	3,7			

В питомнике гибридные популяции мягкой пшеницы с участием диких сородичей проходили испытание: 20 популяций яровой мягкой пшеницы и 3 стандартных сорта.

В условиях отчетного года зерновая продуктивность варьировала от 4,0 до 41,1 ц/га, при уровне урожайности стандартных сортов 9,0–15,8 ц/га. Высокий уровень урожайности показали популяции 6625×*T. timopheevi*-1, 6569×*T. militinae*-2, 6625×*T. timopheevi*-2 и 6628×*T. timopheevi*. Кроме урожайности, все перечисленные популяции имели высокую устойчивость к поражению листовой и стеблевой ржавчиной (5-15%).

В питомнике дигапloidных линий сорта яровой мягкой пшеницы Казахстанская раннеспелая проходили изучение 34 линии, полученные методом отбора из поколения D₃ 2014 года. Скрининг проводился на однородность, продуктивность, устойчивость к болезням и другим стрессовым факторам среды. С целью определения степени стрессоустойчивости путем определения вегетационного индекса использовали прибор Green Seeker Handheld.

Анализ данных урожайности за 2015–2017 гг. показывает, что уровень варьирования составил 0,074 кг/м.пог., в 2016 году при НСР₀₅ равной 2,8ц/га, уровень варьирования составил 16,5 ц/га. Данный показатель в 2017г. равнялся 8,1ц/га при НСР₀₅ – 3,2ц/га. При этом достоверно низкую урожайность показали всего 3 линии питомника, что говорит о высокой выравненности и однородности полученного в результате трехлетнего отбора материала.

Определенный посредством прибора Green Seeker Handheld вегетационный индекс положительно коррелировал с урожайностью по всем датам измерений. Коэффициент корреляции среднего показателя вегетационного индекса и продуктивности равен в 2015г. – $r=0.759$. в 2016 и 2017гг – $r=0.513$.

На фоне эпифитотии стеблевой ржавчины, сложившейся в климатических условиях Карабалыкской СХОС текущего года, среди состава питомника комплексную устойчивость к двум видам ржавчины имели сорта Дива, Умай (15%). Из числа образцов яровой мягкой пшеницы, полученных от скрещивания с дикими сородичами, устойчивостью отличились 6625×*T. timopheevi* и Казахстанская 10×*T. dicoccum* (5-15%). При поражении стандартных сортов 100%.

Высокий уровень урожайности показали популяции 6625 х *T. timopheevi*-1, 6569×*T. militinae*-2, 6625×*T. timopheevi*-2, 6628×*T. timopheevi*. При высокой устойчивости к поражению листовой ржавчиной (5-15%).

Таким образом, использование в селекционном процессе дигаметоидов за счет получения константных форм на ранних этапах селекции позволит сократить сроки выведения новых сортов на 4-5 лет, с 12 лет до 7-9 лет, что в конечном итоге сократит финансовые затраты на выведение нового сорта.

Введение в программы скрещиваний яровой мягкой пшеницы ее диких сородичей направлены на повышение иммунитета вновь создаваемых сортов, а значит на повышение их конкурентоспособности, сокращению затрат на их производство и повышение экономической эффективности и использование их как его основы в органическом земледелии.

Литература

Исмагул А., Искакова Г., Елибай С., Башабаева Б., Аbugалиева А.И. Анализ методов гомозиготизации растений в селекции и разработка протоколов культуры изолированных микроспор казахстанских сортов пшеницы //Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2012. – № 2(54). – С. 17–23.

Кожухметов К.К., Биологические основы селекции зерновых колосовых культур при отдаленной // Дисс. на соиск. уч. ст. докт. наук. – Алмалыбак. – 2010.

Лукиянова М.В., Родионова Н.А., Трофимовская А.Я. (сост.) Методические указания по изучению мировой коллекции ячменя и овса. – ВИР: Л., 1981. – 31 с

Abugaliyeva A.I., Chudinov V., Kozhakhmetov K., Savin T., Cakmak I. Characteristics of introgressive spring wheat forms on resistance, productivity and Zn, Fe content // 9th International Wheat Conference (20-25 September 2015, Sydney, Australia). – Sydney, 2015. – P. 175–176.

SUSTAINABLE DISEASES FOR DOUBLE HAPLOID AND INTROGRESSIVE WHEAT LINES FOR ORGANIC FARMING

V.A. Chudinov¹, T.V. Savin¹, K. Kozhakhmetov², A.I. Abugaliyeva²

¹Karabalyk agricultural experimental station, Karabalyk, Kazakhstan, Savintimur_83@mail.ru

²Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Growing, Almalymbak, Kazakhstan

Abstract. The study of physiological and biochemical regularities of stress-resistance formation of double haploid and introgressive lines of spring wheat was carried out by modern NDVI methods. Against the backdrop of the epiphytosis of the stem rust, the complex resistance to two types of rust developed in the climatic conditions of the Karabalyk station for many years of data was Diva, Umai, spring soft wheat samples obtained from crossing with wild relatives 6625×*T. timopheevi* and Kazakhstan 10×*T. dicoccum*.

Keywords: wheat, double haploids, synthetics, resistance to diseases, organic farming

**СЕКЦИЯ 3.
ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ РАСТЕНИЙ И
МИКРООРГАНИЗМОВ**

NADH И ЕЕ РОЛЬ В ИНАКТИВАЦИИ ТЕХНОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Л.В. Авдеева, Е.А. Саратовских

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химической физики Российской академии наук, Черноголовка, Россия, tuman@cat.icp.ac.ru

Аннотация. В данном исследовании проведено изучение солей тяжелых металлов (Cu, Ni, Co, Zn, Fe), пестицидов и их комплексов с металлами на мММО из *Methylococcus capsulatus* (штамм М): мМГ и NADH-ОР. Показано, что катионы металлов оказывают ингибиторный эффект на ферменты. Наибольшее торможение ферментативной активности наблюдалось для NADH-ОР. Вероятно, такой же эффект можно ожидать и для других NADH-зависимых ферментов.

Ключевые слова: NADH, тяжелые металлы, пестициды, ферментативная активность

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1013-1017

Никотинамидадениндинуклеотид (NADH) – кофермент, имеющийся во всех живых клетках. Он является кофактором для ряда дыхательных ферментов, в частности NADH-оксидоредуктазы (NADH-ОР). NADH-ОР широко распространена в природе и входит в состав как одноклеточных, так и многоклеточных организмов. В данном исследовании нами в качестве объекта исследования была выбрана NADH-ОР из метанооксиляющих бактерий.

Метанооксиляющие бактерии (метанотрофы) широко распространены в природе и насчитывают нескольких сотен видов. Аэробные метанотрофы способны существовать и в экстремальных условиях повышенных или пониженных температур, солености и pH [Троценко, Хмеленина, 2008]. Метанотрофы являются основой бактериальных фильтров, окисляя биогенный метан, который является одним из опасных парниковых газов [Aimen et al., 2018]. Поэтому метанотрофы привлекают внимание исследователей, изучающих глобальное потепление. Суммарная реакция прямого биологического окисления метана кислородом является экзотермической и благодаря ферментам протекает с высокими скоростями и при нормальном давлении субстратов:



Уникальность метанотрофов заключается в том, что они окисляют метан до метанола при нормальных условиях. Ключевым ферментом метанотрофов является метанмонооксигеназа (ММО). ММО существует двух видов: растворимая (рММО) и мембраносвязанная (мММО). Все метанотрофы синтезируют мММО, а рММО могут синтезировать только ограниченное число штаммов. Известно, что рММО является многокомпонентным ферментным комплексом и состоит из: гидроксилазы (рМГ) со структурой $(\alpha\beta\gamma)_2$, где α -, β -, γ - субъединицы с молекулярными массами 61, 45 и 20 кДа соответственно, NADH – ОР (ММО) с молекулярной массой 39 кДа и третьего компонента, известного как регуляторный белок (ММОВ) с молекулярной массой 16 кДа [Rosenzweig et al., 1993]. Также мММО является ферментной системой (рис. 1), в состав которой входит мембраносвязанная метангидроксилаза (мМГ), NADH-ОР, возможно, ряд пока неизвестных переносчиков электрона и активаторов [Lieberman, Rosenzweig, 2005]. Для функционирования обоих типов ММО необходима NADH-ОР, коферментом для которой является NADH.

В последние десятилетия в результате человеческой деятельности резко возрастает в окружающей среде содержание различных токсичных веществ и соединений. В частности к ним относятся пестициды и тяжелые металлы, которые

являются техногенными ксенобиотиками. В связи с важной функцией метанотрофов в глобальном круговороте углерода изучение влияния техногенных загрязнителей окружающей среды на метанотрофы является актуальной задачей.

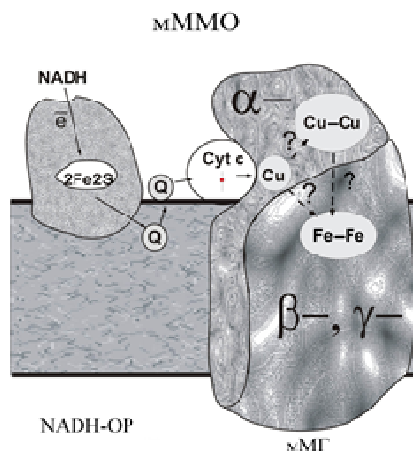


Рис. 1. Предполагаемые пути переноса электронов от NADH-OP в активный центр рМГ в мембране *M. capsulatus* (M) и *M. capsulatus* (Bath) [Гвоздев и др., 2008].

Обозначения: α , β , γ – субъединицы рМГ; Cu – моноядерный, Cu-Cu – биядерный медные центры, расположенные в α -субъединице; М-М – предполагаемый биядерный Fe-Fe центр рМГ, расположенный в β -субъединице, на котором происходит окисление метана до метанола; NADH-OP и Cyt c – неинтегральные мембранные белки; 2Fe2S – железосерный центр NADH-OP; Q – убихиноны; Cyt c – цитохром с.

В данном исследовании проведено изучение влияния тяжелых металлов (сульфаты Cu (II), Ni(II), Co(II), Zn(II), Fe(II)) на активность мМГ и NADH-OP из метаноокисляющих клеток *Methylococcus capsulatus* (штамм M).

Выделение NADH-OP проводили из надосадочной фракции полученной после осаждения разрушенных клеток и фрагментов мембран *M. capsulatus* (M). Активность мМГ в составе мембран определяли по скорости окисления пропилена до окиси пропилена в присутствии в качестве восстановителя NADH или duroxinoла методом газожидкостной хроматографии. Активность NADH-OP определяли спектрофотометрически по скорости восстановления йоднитротетразолия хлорида до формазана в присутствии NADH [Гвоздев и др., 2008].

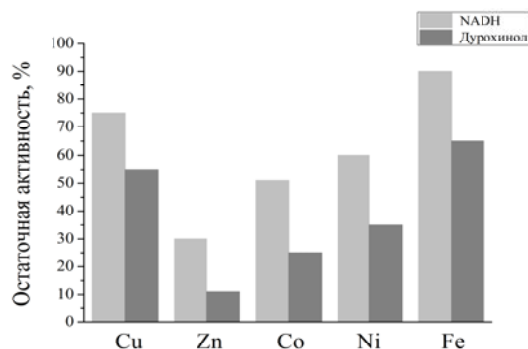


Рис. 2. Остаточная ферментативная активность мембран *M. capsulatus* (M) в реакции окисления пропилена в присутствии 100 мкМ металлов.

Все исследуемые металлы приводили к снижению скорости окисления пропилена, катализируемое мМГ. Наибольшая остаточная активность наблюдалась для Cu и Fe (рис. 2). При этом активность мМГ, определяемая с использованием duroxinoла в

качестве восстановителя была несколько ниже по сравнению с NADH. Такая же зависимость наблюдалась и в контрольном эксперименте (в отсутствии металлов).

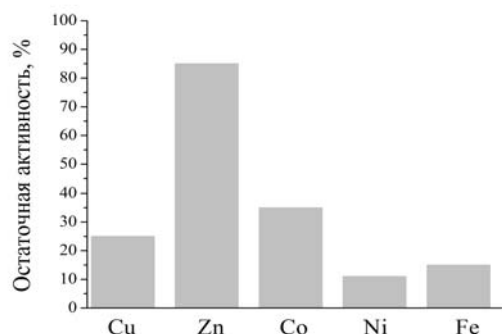


Рис. 3. Остаточная ферментативная активность NADH-OP *M. capsulatus* (M) в присутствии 10 мкМ металлов.

Для мМГ NADH не является непосредственным восстановителем [Гвоздев и др., 2008]. Но электрон-транспортная цепь мММО начинается с окисления NADH (рис. 1). В связи с этим было проведено исследование влияния изучаемых металлов на активность NADH-OP. При тех же концентрациях металлов (100 мкМ) наблюдалось полное ингибирование NADH-OP и денатурация фермента. Для проведения эксперимента концентрация металлов была снижена в 10 раз. Среди изученных металлов только Zn не оказывал существенного влияния на NADH-OP (рис. 3).

Таблица.

Влияние солей металлов, пестицидов и комплексов лонтрела с металлами на НАДН-оксидоредуктазу

Ингибитор	I_{50} , М	V_{max} , М•сек ⁻¹	S_1 , М (НАДН)	$K_i \cdot 10^4$ М НАДН	Т/и	V_{max} , М•сек ⁻¹	S_2 , М (НТ)	$K_i \cdot 10^4$ М НТ	Т/и
лонтр	$1,1 \cdot 10^{-3}$		$1,23 \cdot 10^{-3}$	1,00	к	$1,88 \cdot 10^{-6}$	$6,98 \cdot 10^{-4}$	7,42	б
зенкор	$5,0 \cdot 10^{-4}$		$4,93 \cdot 10^{-3}$	0,25	к	$0,23 \cdot 10^{-6}$	$3,39 \cdot 10^{-4}$	8,94	б
базагр	$6,0 \cdot 10^{-4}$	$1,82 \cdot 10^{-6}$	$1,83 \cdot 10^{-4}$	12,80	б	$0,26 \cdot 10^{-6}$	$2,55 \cdot 10^{-4}$	8,40	б
раунд	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$3,33 \cdot 10^{-6}$	$6,17 \cdot 10^{-4}$	22,00	н	$0,21 \cdot 10^{-6}$	$2,00 \cdot 10^{-4}$	42,9	б
кузагар	$2,7 \cdot 10^{-2}$		$9,86 \cdot 10^{-3}$	14,00	к		$5,72 \cdot 10^{-3}$	159	к
сетокс.	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$2,00 \cdot 10^{-6}$	$7,59 \cdot 10^{-4}$	397,5	н		$11,00 \cdot 10^{-3}$	8,04	к
тачигар	$2,7 \cdot 10^{-3}$		$2,47 \cdot 10^{-3}$	21,00	к		$5,30 \cdot 10^{-3}$	4,55	к
тилт	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$5,98 \cdot 10^{-4}$	23,00	н		$13,00 \cdot 10^{-3}$	1,52	к
MgL ₂	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$1,66 \cdot 10^{-6}$	$8,97 \cdot 10^{-4}$	12,67	н		$23,83 \cdot 10^{-3}$	3,55	к
MnL ₂	$3,0 \cdot 10^{-3}$		$4,93 \cdot 10^{-3}$	3,80	к	$1,72 \cdot 10^{-6}$	$1,81 \cdot 10^{-3}$	22,3	с
ZnL ₂	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$2,00 \cdot 10^{-6}$	$8,22 \cdot 10^{-4}$	10,19	н	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$1,72 \cdot 10^{-3}$	2,46	с
CuL ₂	$3,3 \cdot 10^{-4}$		$32,88 \cdot 10^{-3}$	0,06	к	$0,44 \cdot 10^{-6}$	$9,37 \cdot 10^{-4}$	4,01	н
CoL ₂	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$2,20 \cdot 10^{-6}$	$7,89 \cdot 10^{-4}$	13,73	н	$1,68 \cdot 10^{-6}$	$1,40 \cdot 10^{-3}$	13,1	с
NiL ₂	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$1,80 \cdot 10^{-6}$	$1,23 \cdot 10^{-3}$	12,36	н	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$3,11 \cdot 10^{-3}$	11,7	н
FeL ₂	$1,1 \cdot 10^{-3}$		$8,97 \cdot 10^{-3}$	1,13	к	$1,54 \cdot 10^{-6}$	$2,20 \cdot 10^{-3}$	11,7	н
MoL ₂	$8,5 \cdot 10^{-4}$		$19,72 \cdot 10^{-3}$	0,13	к		$47,62 \cdot 10^{-3}$	0,41	к
Cu(ac) ₂	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$	3,92	1,15	с		13,19	0,67	к
Mo(am)	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$1,39 \cdot 10^{-6}$	3,03	8,83	с		6,60	4,40	к
Mn(ac) ₂	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$9,66 \cdot 10^{-7}$	1,15	0,014	б		8,80	0,02	к
Fe(ac) ₂	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$2,75 \cdot 10^{-6}$	4,55	14,23	к		4,40	4,13	к
Ni(ac) ₂	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$7,66 \cdot 10^{-7}$	3,17	0,88	с		14,66	0,70	к

Пестицид или комплекс – без ингибитора: $V_{max}=7,40 \cdot 10^{-6}$ М•сек⁻¹; $S_1=6,58 \cdot 10^{-3}$ М; $S_2=2,65 \cdot 10^{-3}$ М.
Соль – без ингибитора: $V_{max}=2,75 \cdot 10^{-6}$ М•сек⁻¹; $S_1=1,54 \cdot 10^{-4}$ М; $S_2=3,30 \cdot 10^{-4}$ М. Тип ингибирования (Т/и):
 к – конкурентный; н – неконкурентный; б – бесконкурентный; с – смешанный

Результаты подробного исследования действия на NADH-OP пестицидов, солей металлов и комплексов гербицида лонтрел с металлами [Саратовских и др., 2005, 2007] представлены в таблице.

Показано, что как по донору, так и по акцептору электронов, так и соединения ведут себя по-разному. Однако с разными константами все они ингибирует NADH-OP. Очевидно, что происходит присоединение функциональных групп субстрата и ингибитора к разным местам активного центра фермента. Антиредуктазная активность возрастает при переходе от соли к пестициду и к комплексу. В поведении солей определяющим фактором является ион металла и строение его электронных оболочек, поэтому рассмотренные соли металлов не конкурируют с NADH за место связывания. В комплексах металлов доминирующим влиянием обладает лигандное окружение. Пиридиновое кольцо имеет строение близкое к NADH, т.е. способно занять место субстрата на белке, а атом азота может отдать неподелённую пару электронов. Изменение координационной сферы металла (лигандного окружения), приводит к кардинальным изменениям в характере ингибирования. Выше нами показано, что металлы в комплексах проявляют высокие степени координации могут образовывать полимерные цепочки, где лиганд выполняет роль «мостика»: L-M-L-Fe-NADH-OP, согласно рис. 4.

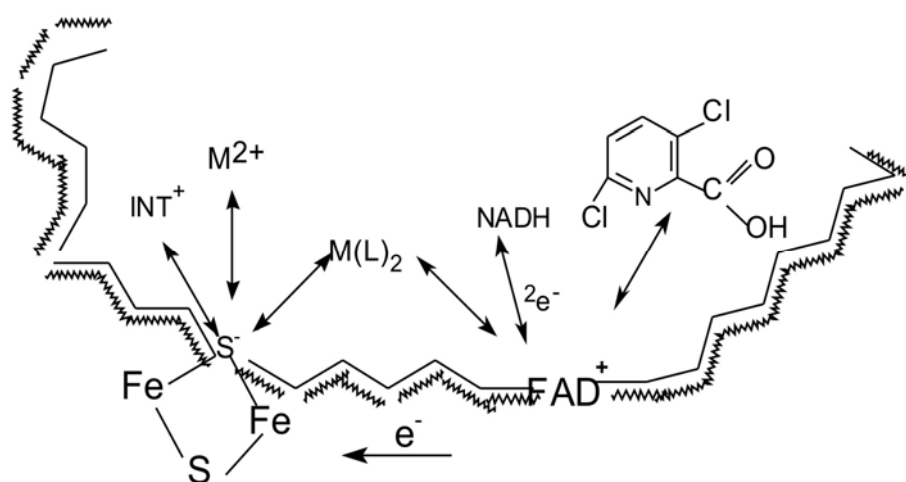


Рис. 4. Схема направлений атаки токсикантов в активном центре NADH-OP [Саратовских и др., 2007].

В целом соли металлов, пестициды и комплексы гербицида лонтрел оказали ингибиторный эффект на NADH-OP, что может служить механизмом их токсического действия по отношению к метанооксиляющим бактериям.

Литература

Гвоздев Р.И., Тухватуллин И.А., Туманова Л.В. Очистка и свойства мембраносвязанной метангидроксилазы из *Methylococcus capsulatus* (Штамм М) // Известия АН, серия биологическая. – 2008. – № 2. – С. 186–195.

Саратовских Е.А., Коршунова Л.А., Гвоздев Р.И., Куликов А.В. Ингибирование НАДН-оксидоредуктазной реакции гербицидами и фунгицидами различного строения // Известия АН. Сер.хим. – 2005. – № 5. – С. 1284–1289.

Саратовских Е.А., Коршунова Л.А., Рощупкина О.С., Скурлатов Ю.И. Кинетика и механизм ингибирования ферментативных процессов металлами // Химическая физика. – 2007. – Т. 26, № 8. – С. 46–53.

Троценко Ю.А., Хмеленина В.Н. Экстремофильные метанотрофы. – Пушино: ОНТИ ПИЦ РАН, 2008. – 205 с.

Aimen H., Khan A.S, Kanwal N. Methanotrophs: The Natural Way to Tackle Greenhouse Effect // Journal of Bioremediation & Biodegradation. – 2018. –V. 9. – P. 432.

Lieberman R.L., Rosenzweig A.C. Crystal structure of a membrane - bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane // Nature. – 2005. – V. 434. – P. 177–182.

Rosenzweig A.C., Frederick C.A., Lippard J.S., Nordlund P. Crystal structure of a bacterial nonheme iron hydroxylase that catalyses the biological oxidation of methane // Nature. – 1993. – V. 366. – P. 537–543.

NADH AND ITS ROLE IN INACTIVATION OF TECHNOGENIC POLLUTION OF ENVIRONMENT

L.V. Avdeeva, E.A. Saratovskikh

Institute of problems of chemical physics RAS, Chernogolovka, Russia,
tuman@cat.icp.ac.ru

Abstract. In this study, the effect of heavy metals (Cu, Ni, Co, Zn, Fe) on MMO from *Methylococcus capsulatus* (strain M): pMH and NADH-OR has been studied. It was shown that metal cations have an inhibitory effect on this enzymes. The greatest inhibition of enzymatic activity was observed for NADH-OR. Probably the same effect can be expected for other NADH-dependent enzymes.

Keywords: *NADH, heavy metals, pesticide, enzymatic activity*

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧЕЙ НА ПОПУЛЯЦИЮ МНОГОКОРЕННИКА ОБЫКНОВЕННОГО *SPIRODELA POLYRHIZA* (L.) SCHLEID

С.И. Алексеева, Ж.М. Охлопкова

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Северо-Восточный федеральный государственный университет им. М.К. Аммосова, Якутск, Россия, alekseeva.sargy@mail.ru

Аннотация. В данной работе исследовано влияние ультрафиолетовых лучей на динамику роста и развития генетически однородных линий многокоренника обыкновенного *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. Действие жесткого УФ-излучения на *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. заключается в снижении скорости размножения, развитии хлорозов/некрозов, уменьшении линейных размеров, диссоциации групп.

Ключевые слова: *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid., культивирование, тест-объект, питательная среда

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1018-1020

Ультрафиолетовые лучи представляют собой мощный фактор воздействия на организмы и растительные организмы в частности. Своеобразное действие УФ радиации на одноклеточные и многоклеточные организмы давно привлекало внимание исследователей. Причины столь пристального внимания к УФ лучам были связаны с их необычайно высокой реактивностью, намного превосходящей эффективность лучей видимого спектра, не объясняемой простой разницей в величине квантов. Углублённые исследования позволили сделать вывод, что основой многообразных ответов организма на воздействие УФ радиации и высокой их реактивности является наличие большого числа органических соединений, активно поглощающих УФ лучи. Ультрафиолетовые лучи обладают способностью изменять химическую структуру тканей и клеток [Алехина и др., 2005].

Изучение адаптационных механизмов к различного рода стресс-факторам является в настоящее время одним из приоритетных направлений экофизиологии. Усиление антропогенной нагрузки на биосферу может привести не только к появлению «искусственно» созданных стресс-факторов, но и к существенному увеличению дозы естественных, после чего они могут оказать стрессовое воздействие на организм. Одна из таких негативных тенденций обусловлена истощением озонового слоя, что существенно повысит дозу УФ радиации и этот естественный фактор может стать стрессовым для всех живых объектов, в том числе и для растений [Алехина и др., 2005; Дубров, 1963].

УФ радиация в зоне 280-320 нм для многих растений является стрессовым фактором. Поэтому даже при незначительном уменьшении стратосферного озонового слоя можно ожидать относительно большого биологического эффекта УФ излучения, выраженного в изменении видового состава и продуктивности растений. УФ радиация может изменить характер сложившихся конкурентных отношений между растениями. Виды менее чувствительные к УФ излучению могут становиться доминантами и существенно изменять структуру наземных экосистем [Дубров, 1963].

В настоящее время продолжается разрушение озонового слоя под действием антропогенного фактора. В этой связи изучение влияния ультрафиолетовой радиации на живые организмы, в том числе и растительные, является весьма актуальным как с теоретической, так и с практической точек зрения.

Целью работы является изучение влияния ультрафиолетовых лучей на популяцию многокоренника обыкновенного *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. в условиях учебно-научной лаборатории.

Ряски – важные модельные растения для биологии [Scherr et al., 2008]. Поскольку ряски небольшие, морфологически (хотя и с корневой и листообразной структурой) быстрорастущие, легко культивируемые в асептических условиях, они являются идеальной системой для биологических исследований [Stomp, 2005; Les et al., 2002].

В последние десятилетия ряски рассматриваются как ценный экспериментальный объект для лабораторных исследований благодаря ряду положительных качеств. При относительной простоте строения и вегетативном размножении, растение обладает быстрым ростом, высокой чувствительностью к поллютантам. Неприхотливость ряски к среде обуславливает легкость культивирования в лабораторных условиях на синтетических питательных средах с использованием света и тепла определенной интенсивности. Возможность обеспечения оптимальных условий для лабораторного выращивания рясок позволяет проводить исследования в течение года, независимо от вегетационного сезона в естественных условиях [Leblebici, Aksoy, 2011].

Образцы многокоренника обыкновенного были собраны из диких популяций на водоемах пригородной территории г. Якутска и в течение нескольких лет получали и поддерживали на $\frac{1}{4}$ питательной среды Гельригеля. Маточные культуры *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. содержались на данной среде в колбах (250 мл) при комнатной температуре и интенсивности света 3 тыс. люкс со световым периодом 24 ч/сут. в зимний период и 12 ч/сут. в летний период.

Состав $\frac{1}{4}$ питательной среды Гельригеля для культивирования объектов исследования: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,123 г, K_2HPO_4 0,034 г, MgSO_4 0,015 г, KCl 0,0186 г, FeCl_3 0,0062.

Ряски можно вырастить на различных минеральных питательных средах с преобладающим содержанием известняка. Стерильные культуры хорошо растут на чисто минеральных смесях, однако добавление сахарозы значительно ускоряет рост. Важной составляющей успешного культивирования водных растений является правильный подбор солевого состава среды.

Важным условием культивирования рясковых является правильный подбора освещения. Оптимальный интервал – 7-14 тыс. люкс. Желательно непрерывное освещение, прирост многокоренника обыкновенного наблюдается при 3 тыс. люкс. Оптимальная температура выращивания равна 22-37 °С, минимальная 4-18 °С.

Таким образом, можно отметить, что действие жесткого УФ излучения на *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. заключается в снижении скорости размножения, развитии хлорозов/некрозов, уменьшении линейных размеров, диссоциации групп. Деформация молодых, растущих листочков, вероятно, связана с тем, что УФ излучение повреждало верхнюю поверхность листочка, нарушая способность клеток делиться. Клетки нижней вентральной поверхности продолжают делиться в продольном направлении, так как УФ лучи не достигают этого слоя. Это приводило к неравномерному росту листочка: более быстрому снизу и замедленному сверху, что проявлялось в искривлении, деформации.

Литература

Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др. (ред. Ермаков И.П.). Физиология растений: учебник для студ. Вузов. – М.: «Академия», 2005. – 640 с.

Дубров А.П. Действие ультрафиолетовой радиации на растения. – М.: АН СССР, 1963.

Scherr C, Simon M, Spranger J, Baumgartner S. Test system stability and natural variability of a *Lemna gibba* L. bioassay // PLoS One. – 2008. – No. 3. – P. 1–7.

Stomp A. M. The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing // Biotechnology Annual Review. – 2005. – No. 11. – P. 69–99.

Les D.H., Crawford D.J., Landolt E., Gabel J.D., Kimball R.T. Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family // Systematic Botany. – 2002. – No. 2. – P. 221–240.

Leblebici Z., Aksoy A. Growth and lead accumulation capacity of *Lemna minor* and *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae): interactions with nutrient enrichment // Water Air Soil Pollut. – 2011. – P. 175–184.

INFLUENCE OF ULTRAVIOLET RAYS ON THE POPULATION OF THE *SPIRODELA POLYRHIZA* (L.) SCHLEID

S.I. Alekseeva, Zh.M. Okhlopkova

Molecular-genetic and cell technologies of the Institute of Natural Sciences, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, alekseeva.sargy@mail.ru; zhm.okhlopkova@s-vfu.ru

Abstract. In this study the influence of ultraviolet rays on the dynamics of growth and development of genetically homogeneous lines of the *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid is investigated. The effect of hard UV radiation on *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. is to reduce the rate of reproduction, the development of chlorosis / necrosis, a decrease in linear dimensions, dissociation of groups.

Keywords: *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid., cultivation, test object, nutrient medium

ОЦЕНКА ФИТОРЕМЕДИАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ СРЕДНЕЙ ПОЛОСЫ РОССИИ ДЛЯ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ ОТ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

В.Э.К. Аль Харбавии, Д.И. Башмаков, А.С. Лукаткин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва», Саранск, Россия, aslukatkin@yandex.ru

Аннотация. В модельных опытах анализировали возможность использования *Chenopodium album* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Taraxacum officinale* Wigg., *Arctium tomentosum* Mill., *Medicago sativa* L. для очистки сточных вод предприятий от тяжелых металлов (ТМ). Растения выращивали 1–2 недели на растворах с моно- и полизагрязнением ТМ в концентрациях 1 мкМ – 1 мМ или на образцах промышленных вод. Люцерна и лопух наиболее эффективно очищали промышленные воды предприятий от ТМ.

Ключевые слова: растения, сточные воды, фиторемедиация, тяжелые металлы

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1021-1024

В настоящее время растущее поступление сточных вод в природные водоемы и водотоки приобретает характер глобальной экологической угрозы и все сильнее привлекает внимание ученых и исследователей всего мира. Стоки предприятий различных отраслей промышленности содержат многочисленные токсиканты, среди которых особую опасность представляют тяжелые металлы (ТМ). Наносящие серьезный экологический ущерб тяжелые металлы обладают биологической активностью, мутагенными и канцерогенными свойствами, приводящими к повреждению и гибели организмов. Для минимизации отрицательного влияния ТМ на гидросферу необходимы усовершенствование существующих и разработка новых методов очистки стоков путем снижения концентраций токсикантов до принятых нормативов водопользования. Наиболее эффективными, рациональными и экологичными могут стать способы очистки, основанные на сочетании ризофилтрации и способности растений аккумулировать токсиканты. Изучение процессов фиторемедиации тяжелых металлов из сточных вод с помощью различных металлоустойчивых растений-аккумуляторов, как и поиск гипераккумулирующих видов флоры, имеют фундаментальное и практическое значение.

Растения популяций, продолжительно произрастающих в условиях антропогенного или естественного загрязнения ТМ, способны адаптироваться к повышенному содержанию металлов в среде [Ernst, 2006]. Поэтому для проведения исследований нами были отобраны несколько видов сорной флоры средней полосы России (*Chenopodium album*, *Amaranthus retroflexus*, *Taraxacum officinale*, *Arctium tomentosum*), произрастающих на загрязненных ТМ территориях (промышленные пустыри с преимущественным загрязнением Pb, Cu, Ni и Zn), а также люцерна посевная (*Medicago sativa*), которые известны как металлоустойчивые растения [Bashmakov et al., 2008; Шоу и др., 2009; Башмаков, Лукаткин, 2009; Al Harbawee et al., 2017; Башмаков и др., 2017]. Свежесобранные семена закладывали в песок и хранили около 3 месяцев при температуре 2–4 °С для прохождения холодной стратификации [Журбицкий, Ильин, 1968].

Семена проращивали в водной культуре в факторостатируемых условиях (освещенность около 80 мкМ фотонов/м²·с, фотопериод 14 ч, температура 21 °С) на растворах, содержащих смесь эквимольных растворов солей четырех ТМ (Pb(NO₃)₂; ZnSO₄·7H₂O; CuSO₄·5H₂O; NiSO₄·7H₂O – все квалификации чда) в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ, 0,1 мМ и 1 мМ, или на растворах отдельных солей металлов в тех же концентрациях. Тестирующие концентрации подобраны в ранее проведенных

экспериментах с учетом уровня загрязнения почв металлами из мест произрастания и охватывали диапазон от дефицитных и оптимальных до сублетальных и летальных [Башмаков, Лукаткин, 2009]. Контролем служили растения, выращенные в дистиллированной воде. На 7-е сутки роста определяли воздушно-сухую массу, а также концентрацию ТМ в побегах и корнях на атомно-адсорбционном спектрометре Shimadzu AA-7000 [ГОСТ 30692-2000; Методические указания..., 1992].

Для определения способности растений удалять ТМ из промышленно-загрязненных вод были взяты образцы промышленных вод с двух предприятий по производству сухих и жидких батарей (завод № 1 и завод № 2), а также на очистных сооружениях компании по производству аккумуляторов. Основными загрязняющими ТМ в образцах воды были Pb, Zn, Cu и Ni в концентрациях от 0,25 г/л (3,8 мМ/л) до 7,51 г/л (127,9 мМ/л). В лаборатории была проведена фильтрация образцов для избавления от примесей. Семена исследуемых растений выращивали на каждом из образцов воды в течение 14 суток, затем определяли содержание ТМ в органах растений.

Все лабораторные опыты проводили три раза, каждый опыт состоял из 100–200 семян или проростков в каждом варианте. Для определения содержания ТМ и сухой массы отбирали по 20–40 растений из каждой повторности, образец (вариант) включал 3 повторности. Существенность различий оценивали по критерию Дункана при уровне значимости 95%. Результаты обрабатывали статистически с использованием программ «MS Excel» и «Statistica», в таблицах представлены средние значения из всех опытов с их стандартными ошибками.

Анализ накопления ТМ в органах исследуемых растений позволил разделить растения на группы по способности накапливать ТМ. Поскольку амарант аккумулировал ТМ в большей степени в корнях, чем в надземных органах, его можно отнести к видам-исключителям ТМ. У мари белой ТМ накапливались преимущественно в надземных органах при низком загрязнении среды ионами Pb^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} , что характеризует мари как аккумулятор, а при высоком уровне – в корнях, т.е. растение принадлежит к исключителям. При экспозиции люцерны на растворах, содержащих одиночные ТМ, металлы аккумулировались в корнях в большей степени, чем в надземных органах, на основании чего люцерну можно отнести к исключителям; однако при экспозиции на растворе, содержащем смесь ТМ (что приближено к естественной среде), люцерна выступает как ярко выраженный аккумулятор как при низком, так и высоком уровне загрязнения среды. Лопух можно отнести к аккумуляторам цинка и исключителям остальных ТМ. При выращивании одуванчика на растворе, содержащем один ТМ, этот вид принадлежит к аккумуляторам меди, а также цинка при низком содержании металла в среде; однако в варианте с экспозицией на смеси ТМ одуванчик выступает в качестве выраженного аккумулятора всех изученных ТМ и при низкой, и при высокой дозе ТМ в среде.

Исследованные растения были гипераккумуляторами только при высоких дозах ТМ в среде. Так, содержание ТМ в растениях амаранта превышало 1 г/кг сухой массы при высокой концентрации Pb^{2+} , Zn^{2+} и Ni^{2+} в среде, но не в варианте с миксом металлов в среде. Мари являлась гипераккумулятором свинца и цинка как в варианте с монозагрязнением данными металлами, так и в варианте со смесью ТМ в среде. В варианте с загрязнением одним ТМ люцерна является гипераккумулятором только свинца, а одуванчик – цинка. У растений лопуха ни в одном из вариантов эксперимента содержание металла не превышало 1 г/кг сухой массы.

Мы рассчитали примерное количество ТМ, которое можно будет удалить из сточных вод предприятий при использовании исследуемых растений (табл. 1).

Проанализировав способность растений аккумулировать ТМ, а также ответные физиологические и биохимические реакции растений на действие ТМ, можно заключить,

что все исследуемые виды можно использовать в качестве фиторемедиантов, а биомасса растений, содержащих извлеченные из загрязненной среды ТМ, может быть использована для получения металлов. Однако, с учетом развиваемой биомассы, среди исследованных растений наилучшие показатели извлечения металлов из 1 м³ сточной воды предприятий были у лопуха, с помощью которого можно извлечь от 0,9 до 1,5 мг Zn, и, особенно, люцерны – от 35 до 70 мг Ni, от 17 до 18,6 мг Pb и от 5,4 до 9,4 мг Cu.

Таблица 1.

Количество металлов, расчетно извлекаемое за одну процедуру фиторемедиации при помощи исследованных растений, мг ТМ на 1 м³ воды за 2 недели

	<i>Arctium tomentosum</i>	<i>Taraxacum officinale</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Amaranthus retroflexus</i>	<i>Chenopodium album</i>
Pb _{max}	13,3±4,2	10,7±3,8	18,7±7,2	8,6±2,8	9,0±0,3
Pb _{min}	13,1±4,1	10,9±4,4	16,9±6,4	8,0±2,8	9,9±0,4
Zn _{max}	1,5±0,2	0,9±0,2	1,1±0,2	0,6±0,0	0,8±0,1
Zn _{min}	0,9±0,1	0,6±0,2	0,8±0,1	0,4±0,0	0,6±0,1
Cu _{max}	9,4±1,0	6,5±1,3	11,8±1,4	3,1±0,1	2,7±0,2
Cu _{min}	5,4±0,1	4,6±1,5	5,9±1,2	2,2±0,1	1,8±0,2
Ni _{max}	60,9±6,2	47,1±8,6	70,4±6,8	25,7±1,2	28,4±2,0
Ni _{min}	36,3±0,5	33,6±10,0	35,0±6,4	17,3±1,0	18,9±2,1

Также были выявлены наиболее эффективные потенциальные биоремедиаторы сточных вод. В таблице 2 приведена эффективность одной процедуры фиторемедиации, оцененная по степени очистки воды.

Таблица 2.

Степень очистки промышленных сточных вод при проведении одной процедуры фиторемедиации, % от исходного количества ТМ за 2 недели

	<i>Arctium tomentosum</i>	<i>Taraxacum officinale</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Amaranthus retroflexus</i>	<i>Chenopodium album</i>
Pb _{min}	0,27±0,08	0,22±0,08	0,38±0,15	0,17±0,06	0,18±0,01
Pb _{max}	0,93±0,33	0,77±0,34	1,20±0,50	0,57±0,22	0,70±0,12
Zn _{min}	0,36±0,03	0,24±0,07	0,31±0,06	0,17±0,01	0,22±0,03
Zn _{max}	0,59±0,08	0,34±0,07	0,62±0,11	0,24±0,01	0,33±0,04
Cu _{min}	0,45±0,01	0,38±0,13	0,49±0,10	0,18±0,01	0,15±0,02
Cu _{max}	0,78±0,09	0,54±0,11	0,98±0,11	0,25±0,01	0,22±0,01
Ni _{min}	0,48±0,01	0,45±0,13	0,47±0,08	0,23±0,01	0,25±0,03
Ni _{max}	0,81±0,08	0,63±0,11	0,94±0,09	0,34±0,02	0,38±0,03

Люцерна и лопух наиболее эффективно очищали промышленные воды предприятий от свинца (вынос Pb составил 0,93–1,2% от валового содержания этого металла в воде), цинка (вынос из воды 0,31–0,62 и 0,36–0,59, соответственно), меди (0,49–0,98 и 0,45–0,78%, соответственно). Однако все эти данные приведены для очень малых растений (которые росли в течение 2 недель). Если же продлить срок выращивания до 3–4 месяцев, когда растения растут и развивают большую биомассу (до 300 г сухой массы/растение), то эффективность фиторемедиации может достигать 26–58%.

Таким образом, ряд видов сорной флоры средней полосы России (*Chenopodium album*, *Amaranthus retroflexus*, *Taraxacum officinale*, *Arctium tomentosum*), а также люцерна посевная (*Medicago sativa*) показали высокую степень аккумуляции ТМ в различных частях растений, и могут рассматриваться как потенциально высокоэффективные фиторемедиаторы загрязненных тяжелыми металлами сточных вод

промышленных предприятий. Поскольку все эти виды могут произрастать на загрязненных ТМ территориях и представляют собой металлоустойчивые растения, их эволюционно детерминированная высокая устойчивость к ТМ представляет основу ремедиационного потенциала.

Литература

Башмаков Д.И., Лукаткин А.С. Ростовые характеристики и металлоустойчивость экотипов *Chenopodium album* L. s. l. города Саранска (Россия) // Проблемы биогеохимии и геохимической экологии. – 2009. – № 1 (9). – С. 116–119.

Башмаков Д.И., Аль-Харбави Е.Д.В., Башмакова Д.Д., Лукаткин А.С. Исследование потенциальной способности *Amaranthus retroflexus* L. к фиторемедиации загрязненных тяжелыми металлами почв // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2017. – №3 (1). – С. 29–35.

ГОСТ 30692-2000 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Атомно-абсорбционный метод определения содержания меди, свинца, цинка и кадмия. – М., 2002.

Журбицкий З.И., Ильин М.В. Теория и практика вегетационного метода. – М.: Наука, 1968. – 224 с.

Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства. (Изд. 2-е, переработанное и дополненное). – М., 1992.

Шоу Б.П., Прасад М.Н.В., Джа В.К., Саху Б.Б. Механизмы детоксикации / защиты у подвергнутых действию металлов растений // Микроэлементы в окружающей среде: биогеохимия, биотехнология и биоремедиация / Под ред. М.Н.В. Прасада, К. С. Саджвана, Р. Найди; Перевод с англ. к.б.н. Д.И. Башмакова и д.б.н. А.С. Лукаткина. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2009. – Гл. 16. – С. 340–380.

Al Harbawee W.E.Q., Kluchagina A.N., Anjum N.A., Bashmakov D.I., Lukatkin A.S., Pereira E. Evaluation of cotton burdock (*Arctium tomentosum* Mill.) responses to multi-metal exposure // Environmental Science and Pollution Research. – 2017. – V. 24, I. 6. – P. 5431–5438.

Bashmakov D.I., Tserkovnova M.V., Lukatkin A.S., Teixeira da Silva J.A. Variability in heavy metal tolerance between Saransk (Russian) *Taraxacum officinale* populations // Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology. – 2008. – V. 2, No. 1. – P. 19–24.

Ernst W.H.O. Evolution of metal tolerance in higher plants // For. Snow Landsc. Res. – 2006. – V. 80, No. 3. – P. 251–274.

ASSESSMENT OF PHYTOREMEDIATION POTENTIAL OF HERBACEOUS PLANTS FROM CENTRAL RUSSIA FOR INDUSTRIAL WASTEWATER CONTAINING HEAVY METALS

W.E.Q. Al-Harbawee, D.I. Bashmakov, A.S. Lukatkin

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «National Research Ogarev Mordovia State University», Saransk, Russia, aslukatkin@yandex.ru

Abstract. In model experiments, we analyzes potential use of *Chenopodium album* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Taraxacum officinale* Wigg., *Arctium tomentosum* Mill., *Medicago sativa* L. for industrial wastewater treatment from heavy metals (HMs). Plants were grown for 1–2 weeks on solutions with mono- and polycontamination by HMs at concentrations from 1 μ M to 1 mM, or on samples of industrial wastewaters. Alfalfa and burdock purified industrial water from HMs most effectively.

Keywords: plants, wastewater, phytoremediation, heavy metals

ВОДОПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ ПАРАМАГНИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ

А.В. Анисимов, И.Ф. Ионенко, М.А. Суслов

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия, anisimov@kibb.knc.ru

Аннотация. Показано, что парамагнитные комплексы гадолиния GdDTPA и GdCl₃, используемые в спин-эхо ЯМР экспериментах на растительных тканях для релаксационного подавления сигнала намагниченности от внеклеточной воды могут быть блокаторами межклеточного переноса воды.

Ключевые слова: водопроницаемость корней, парамагнитные ионы, ЯМР, релаксация, диффузия

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1025-1028

Развитие промышленности привело к появлению и концентрированию в среде обитания ксенобиотиков, содержащих парамагнитные элементы. На фоне широко известных парамагнетиков, таких, как медь, марганец, кислород и другие, менее «на слуху» находятся лантаноиды, относящиеся к редкоземельным элементам, и в их числе гадолиний. Редкоземельные парамагнетики заслуживают специального внимания, поскольку из-за рассеянности в земной коре «природа не позаботилась» о защите биологических объектов от их влияния и это первый мотив к исследованию. С другой стороны, парамагнитные ионы марганца (Mn²⁺) и гадолиния (Gd³⁺), благодаря способности даже в небольшой концентрации резко ускорять процесс магнитной релаксации воды активно используются в магниторезонансной томографии (МРТ) для контрастирования МРТ-изображений [Carr et al., 1984]. В физиологии растений эти парамагнетики используются в спин-эхо ЯМР экспериментах для релаксационного подавления нежелательного сигнала намагниченности от внеклеточной воды [Анисимов и др., 2004]. Очевидно, что наряду с функцией подавления сигнала намагниченности, парамагнетики могут быть физиологически активными соединениями, что мотивирует постановку задачи на изучение их влияния на плазматическую мембрану клеток, как первую мишень воздействия.

В настоящей работе градиентным методом спин-эхо ЯМР на примере корней проростков кукурузы исследуется влияние ионов Gd³⁺, Mn²⁺ и комплекса GdDTPA (gadolinium-diethylene triamine pentaacetic acid) на межклеточный перенос воды.

В качестве растительных объектов использовались сегменты всасывающей зоны корней 5-7 дневных проростков кукурузы (*Zea mays*), выращенных на растворе CaCl₂ (2,5×10⁻⁴ М) при 23 °С, 16 часовом фотопериоде и освещении 15 Вт /м². В качестве парамагнетиков использовались растворы солей GdCl₃, MnCl₂ и комплекс GdDTPA. Последний из-за большого размера молекул априори не проникает через нативную плазмалемму в клетки и менее подвержен диссоциации. Как известно, с величиной коэффициента водопроницаемости мембран связана величина коэффициента диффузии и значения скорости магнитной релаксации молекул воды. Названные величины измерялись единым релаксационно-диффузионным комплексом спин-эхо техники ЯМР. Релаксационный метод основан на чувствительности времен магнитной релаксации воды в клетках к скорости трансмембранного водообмена, зависящей, в свою очередь, от уровня мембранной проницаемости. Скорость трансмембранного обмена может быть определена путём решения обратной задачи обмена на полном наборе экспериментально измеренных времен спин-решеточной и спин-спиновой

релаксации и долевых вкладов фракций внутри- и внеклеточной воды, соответственно. Диффузионный метод оценки проницаемости основан на зависимости трансляционного диффузионного пробега молекул воды за некоторый экспериментально обусловленный интервал времени диффузии – t_d от уровня проницаемости межклеточных барьеров. Детальный анализ диффузии в биологических объектах осложняется необходимостью учета суммы факторов макроскопической надклеточной и внутриклеточной неоднородности объектов. В сравнительных экспериментах зачастую достаточно качественно сравнивать релаксационные (РЗ) и диффузионные затухания (ДЗ) сигналов эха для контрольного и опытного образцов, и именно этот подход использован в данной работе. В релаксационных экспериментах регистрировалось релаксационное затухание (РЗ) спинового эха в импульсной последовательности Карра-Парселла-Мейбума-Джилла (КПМД), обусловленное спин-спиновой релаксацией [Meiboom, Gill, 1958]. В диффузионных экспериментах регистрировалось диффузионное затухание сигналов стимулированного эха в трехимпульсной р\ч последовательности ($90^\circ-90^\circ-90^\circ$), с импульсным градиентом магнитного поля [Tanner, 1970]. Измерялась относительная амплитуда сигналов эха (фактор $R = A(g, t_d)/A(g=0, t_d)$) в зависимости от амплитуды g и длительности δ импульсов градиента магнитного поля, при вариации времени диффузии t_d как параметра [Tanner, Stejskal, 1968].

Величина среднего эффективного коэффициента диффузии D_{eff} определялась из соотношения: $R = \exp[-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D_{eff}]$, согласно условию, приведенному в [Valiullin, Skirda 2001], т.е. по начальному участку зависимости R от $(\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d)$, где γ -гиромагнитное отношение для протонов

Для обеспечения высокого отношения сигнал\шум и достижения должного усреднения биологической вариации образец составлялся из 30 сегментов корней из всасывающей зоны.

Результаты исследования. На рис. 1 величина фактора $R(g^2)$ приведена в зависимости от *обобщенной координаты* $b = \gamma^2 \delta^2 g^2 t_d$, для сегментов корня в норме и под влиянием GdDTPA и GdCl₃. Для контроля характерна не экспоненциальная зависимость $R(b)$, которая становится близкой к экспоненциальной под влиянием парамагнетиков.

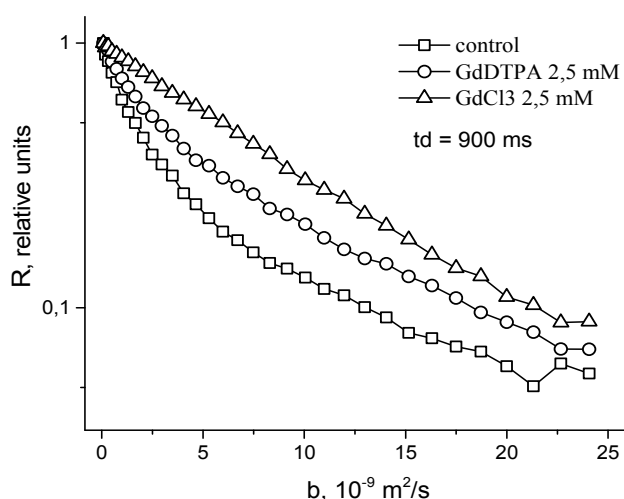


Рис. 1. Диффузионные затухания сигналов эха для воды сегментов корней кукурузы после обработки их растворами парамагнетиков.

Поскольку парамагнетик во внеклеточном пространстве релаксационным образом подавляет сигнал эха от внеклеточного компонента воды, остающиеся наблюдаемые

сигналы ДЗ характеризуют воду симпласта. Уменьшение крутизны ДЗ для $GdCl_3$ по сравнению с $GdDTPA$ свидетельствует о том, что $GdCl_3$ является более эффективным блокатором межклеточного переноса воды по симпласту, чем $GdDTPA$.

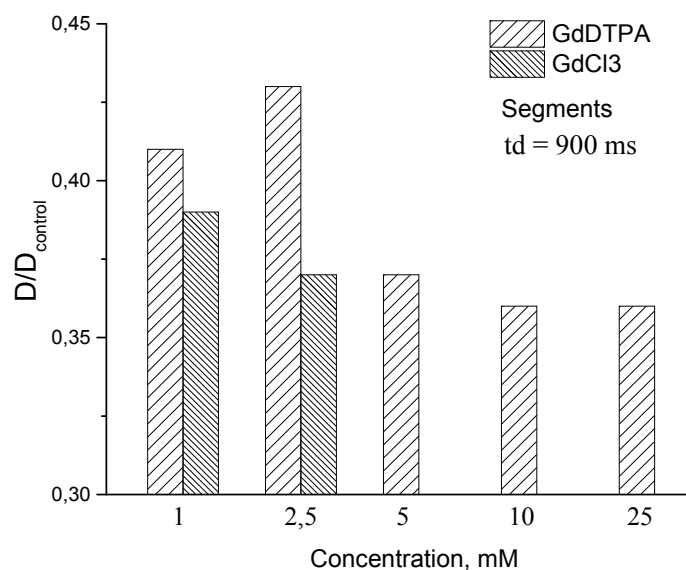


Рис. 2. Зависимость относительного коэффициента диффузии воды в сегментах корней от концентрации растворов парамагнетиков в среде инкубации.

Концентрационные зависимости демонстрируют монотонное снижение относительного коэффициента диффузии воды (опыт\контроль) с ростом концентрации парамагнетика (рис. 2).

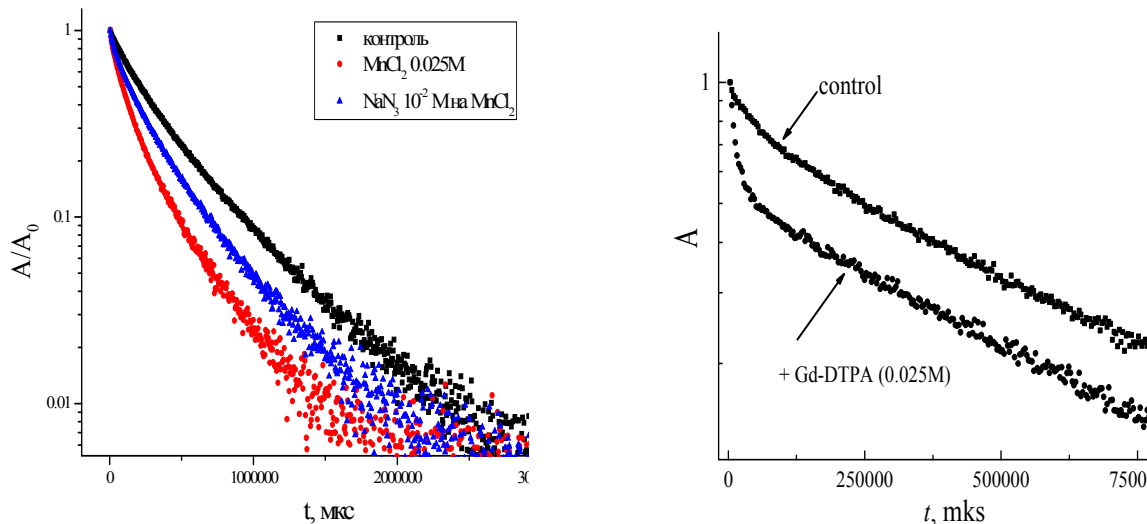


Рис. 3. Релаксационные затухания сигналов эха для воды сегментов корней кукурузы после обработки их растворами парамагнетиков: а – $MnCl_2$, NaN_3 ($10^{-2}M$) на фоне $MnCl_2$; б – $GdDTPA$.

При близкой релаксационной эффективности ионов марганца и гадолиния ускорение релаксационного затухания РЗ для варианта $MnCl_2$ (0,025 M) значительно превосходит таковое для $GdDTPA$ (рис. 3). Этот факт объясняется проникновением

марганца в клетки и, соответственно, ускорением релаксации внутриклеточной воды. Тем не менее, даже при вакуумной инфльтрации сегментов корней в 0.025М растворе $MnCl_2$ в течение 20 мин, что способствует активному проникновению марганца в клетки, время релаксации внутриклеточной воды продолжает контролироваться трансмембранным обменом. В пользу этого заключения говорит уменьшение скорости релаксационного затухания намагниченности при приложении к образцу сегментов на фоне марганца блокатора переноса – азид натрия (NaN_3 , 10^{-2} М). Реакция на азид натрия свидетельствует о сохранении в варианте с $MnCl_2$ динамического диапазона регуляции переноса. В целом, и релаксационные и диффузионные данные свидетельствуют о том, что ионы гадолиния, в том числе в комплексе GdDTPA, являются блокаторами переноса воды, как через плазмалемму, так и по симпласту, причем $GdCl_3$ является более эффективным блокатором. Уровень блокировки монотонно увеличивается с ростом концентрации. Полной блокировки, по крайней мере, до концентрации 25 мМ не происходит, сохраняется динамический диапазон регуляции к дальнейшему снижению переноса воды. Ионы марганца по сравнению с гадолинием не проявляют заметной блокировки переноса воды, но проигрывают гадолинию по пункту проникновения в клетки. По совокупности свойств соль $GdCl_3$ вполне конкурирует с комплексом GdDTPA, который априори не проникает в клетки, благодаря «прицепу DTPA», но $GdCl_3$ является значительно более доступным и дешевым реагентом.

Литература

Анисимов А.В., Ионенко И.Ф., Романов А.В. Метод спин-эхо ЯМР в исследованиях трансляционной диффузии воды селективно по апопласту, цитоплазматическому и вакуолярному симпласту растений // Биофизика. – 2004. – Т. 49. – С. 891–896.

Carr D.H., Brown J., Bydder G.M. et al. Gadolinium-DTPA as a contrast agent in MPI: Initial clinical experience in 20 patients // Am. J. Radiol. – 1984. – V.143. – P. 215–224.

Meiboom S., Gill V. Spin-echo method for measuring nuclear magnetic relaxation times // Rev. Sci. Instrum. – 1958. – V. 29, No. 8. – P. 688–691.

Tanner J.E. Use of the stimulated echo in NMR diffusion studies // J. Chem. Phys. – 1970. – V. 2. – P. 2523–2526.

Tanner J.E., Stejskal E.O. Restricted self-diffusion of protons in colloidal systems by the pulsed-gradient spin-echo method // J. Chem. Phys. – 1968. – V.19. – P. 1768–1777.

Valiullin R., Skirda V.D. Time dependent self-diffusion coefficient of molecules in porous media // J. Chem. Phys. – 2001. – V. 114. – P. 452–458.

WATER PERMEABILITY OF PLANT CELL MEMBRANES UNDER THE EFFECT OF PARAMAGNETIC COMPLEXES

A.V. Anisimov, I.F. Ionenko, M.A. Suslov

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Science Center of the Russian Academy of sciences, Kazan, Russia, anisimov@kibb.knc.ru

Abstract. It is shown that paramagnetic gadolinium complexes GdDTPA, $GdCl_3$ used in NMR spin-echo measurements of plant tissues for inhibition of intercellular water magnetization signal can perform as intercellular water transfer blockers.

Keywords: root water permeability, paramagnetic ions, NMR, relaxation, diffusion

ЭКЗОГЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ХВОЙНЫХ И ЛИСТВЕННЫХ ПОРОД В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ

Ж.М. Анисова, М.М. Сак, Т.А. Будкевич, Б.И. Якушев

Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь, *anisova_z@mail.ru*

Аннотация. Дана оценка эффективности использования метода агрохимической мелиорации как способа ослабления токсического влияния засоления почвы хлоридом натрия на жизнедеятельность хвойных и лиственных древесных пород. Выявлена видовая специфичность физиологической реакции древесных растений на воздействие соли и применение доломитовой муки в качестве мелиоранта.

Ключевые слова: засоление, древесные породы, агрохимическая мелиорация, минеральное питание, ризосфера

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1029-1033

Введение. Засоление почвенной среды (природное и техногенное) до настоящего времени рассматривается как один из наиболее действенных стрессовых факторов, оказывающих угнетающее воздействие на рост и развитие растений [Удовенко и др., 1977; Еремченко и др., 2005; Аверина и др., 2011; Кусакина и др., 2011; Yamaguchi et al., 2005]. Цель работы – эколого-физиологическое исследование реакции корневых систем и надземных органов древесных растений на загрязнение почвенной среды антигололедными реагентами, экспериментальная разработка способа снижения ингибирующего влияния засоленности почвы хлористым натрием на жизнедеятельность хвойных и лиственных пород и оценка эффективности действия разработанного способа в модельных и природных условиях произрастания.

Объекты и методы исследований. Объектами исследования выступали: 1) сосновые (60 лет) и еловые (80 лет) насаждения вдоль кольцевой автомагистрали г. Минска на территории Минского леспархоза: 2) 2-летние сеянцы ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) и сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), 3) 3-летние сеянцы дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), липы мелколистной (*Tilia cordata* Mill.), клена остролистного (*Acer platanoides* L.), в модельных и природных условиях выращивания.

Проверку эффективности приема агрохимической мелиорации при выращивании древесных растений на почвах с повышенной концентрацией основного компонента антигололедной смеси – хлорида натрия осуществляли по следующей схеме: 1) внесение соли NaCl (300г/м²); 2) внесение соли NaCl (300г/м²)+доломитовая мука (Дм) (450г/м²), 3) внесение соли NaCl (100г/м²), 4) внесение соли NaCl (100 г/м²)+Дм (150 г/м²). В соответствии со схемой опыта соль NaCl и смесь хлорида натрия с доломитовой мукой (CaCO₃+MgCO₃) в соотношении 1:1,5 вносили в бороздки глубиной 5 см между рядками сеянцев. Опыт проведен на делянках площадью 1 м² в 3-кратной повторности по каждому варианту. Выкопку сеянцев для биометрического анализа производили без повреждения корневых систем с сохранением их архитектоники. Суммарное содержание растворимых солей в почве ризосферы оценивали по показателям гальванической активности (мкА) по шкале, разработанной Б.И. Якушевым [Якушев, 1988]. У сеянцев измеряли: высоту надземной части, длину корней, диаметр стволика у корневой шейки. После разделения растений на отдельные органы, надземную часть сеянцев высушивали в термостате при 105 °С и определяли сухую массу хвои и стволика с ветвями в расчете на модельное растение. Корневые системы отмывали от почвы дистиллированной водой и фиксировали в воздушно-сухом состоянии при 20 °С. Эффект от воздействия повышенных доз хлорида натрия в

почве и внесения соли совместно в мелиорантом на поступление минеральных элементов Na, K и Ca из почвы в древесные растения оценивали по их содержанию в фотосинтезирующих органах растений. Измерения проведены пламенно-фотометрическим методом на фотометре ФТА-2-01 (Беларусь).

Результаты исследований и их обсуждение. Известно [Почвы Белорусской ССР, 1974; Якушев, 1988], что определяющими компонентами катионного состава жидкой фазы почв лесной зоны, влияющими на уровень минерального питания растений, являются катионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+ , Na^+ , H^+ . На долю Ca^{2+} и Mg^{2+} в почвах этой зоны приходится 95% суммарного содержания катионов, на долю K^+ и Na^+ около 4-5%, на долю H^+ приходятся сотые доли процента. Из анионов больше всего в почвенном растворе содержится анионов угольной, соляной и серной кислот, в гораздо меньших количествах – фосфорной и азотной кислот. Внесение в почву высоких доз соли NaCl резко понижает показатели pH_{KCl} почвенного раствора, поскольку катионы Na^+ вытесняют из почвенного поглощающего комплекса значительное количество H^+ .

В полевых экспериментах, проведенных в питомнике ГЛХУ «Молодечненский лесхоз», установлено эффективное воздействие мелиоранта (Дм) на рост и развитие надземных органов и корневой системы ели европейской. В сравнении с контрольным вариантом (засоление ризосферы NaCl) у сеянцев ели на делянках с применением доломитовой муки отмечено утолщение корневой шейки и возрастание корневой массы в 1,3 раза, увеличение в 1,3-1,6 раза биометрических параметров надземных органов – высоты растений, массы хвои и стволика с ветвями. Морфометрический анализ 2-летних сеянцев сосны обыкновенной показал, что внесение в почву доломитовой муки в смеси с хлоридом натрия практически не оказало влияния на их состояние, достоверные различия в параметрах роста и развития растений на делянках с засолением и примененной агрохимической мелиорации не отмечены (рисунок).

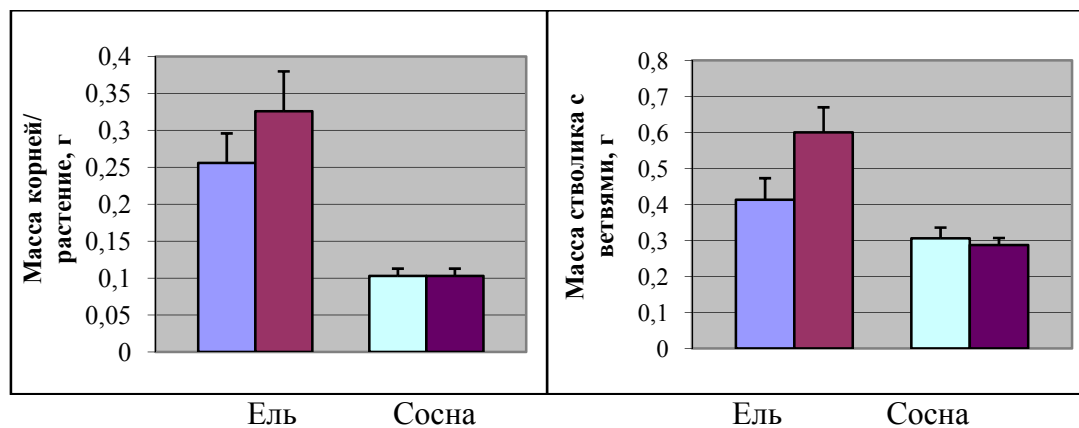


Рисунок. Действие доломитовой муки на рост и развитие сеянцев ели и сосны: 1 – 300 г NaCl/м² площади насаждения, 2 - 300 г NaCl+450 г мелиоранта/м² площади насаждения.

Результаты проведенных нами натурных экспериментов в природных условиях произрастания древесных растений при засолении ризосферы хлоридом натрия и применении приема агрохимической мелиорации для ослабления токсического действия соли на минеральное питание различных пород деревьев выявили видовые особенности накопления основных биогенных минеральных элементов – калия и кальция в фотосинтезирующих органах растений (хвое и листьях) на фоне высокого уровня засоления почвы и проявившееся в различной степени под воздействием мелиоранта снижение соотношения Na/Ca и Na/K в ассимиляционных тканях, что

можно рассматривать как один из физиологических механизмов повышения устойчивости древесных пород в условиях засоления почвы.

В насаждениях ели европейской (Минский леспаркхоз) вдоль автомагистрали Минск-Брест влияние агрохимической мелиорации на опытных площадках с уровнем NaCl 300 г/м² площади питания растений выразилось в существенном (2-2,5-кратном) снижении содержания Na в хвое 1-го года жизни при одновременном 2-3-кратном повышении содержания Ca и практически не изменяющихся показателях содержания K. Для хвои более старшего возраста характерно, что под воздействием мелиоранта при неизменяющейся концентрации Na и более слабом, чем у однолетней хвои увеличении содержания Ca, до 1,5-3-х раз возрастает содержание K.

В условиях производственного опыта с 2-летними сеянцами ели в питомнике Молодечненского лесхоза в хвое ели более четко проявилась зависимость эффективности действия мелиоранта на приоритет участия Ca и K в транспорте в фотосинтезирующие органы растения от концентрации NaCl в почвенном растворе (табл. 1). При добавлении мелиоранта в почву при дозе NaCl 300 г/м² в хвое наиболее существенно – более, чем на порядок возрастала концентрация Ca; при дозе NaCl 100 г/м² помимо кальция под воздействием мелиоранта в такой же степени увеличивалась концентрация K, при этом транспорт Na в хвою практически сводился до минимума.

Таблица 1.

Воздействие доломитовой муки на содержание и баланс минеральных элементов Na, K и Ca в хвое сеянцев ели европейской, произрастающих на дерново-подзолистой супесчаной почве, загрязненной хлоридом натрия

Вариант опыта	% на абсолютно-сухое вещество			Na/K	Na/Ca
	Na	K	Ca		
NaCl 300	0,14	0,86	0,01	0,16	14,0
NaCl 300+Дм 450	0,16	0,95	0,14	0,17	1,14
NaCl 100	0,10	0,66	0,02	0,15	7,25
NaCl 100+Дм 150	0,01	1,05	0,12	0,01	0,08
Контроль (без внесения NaCl и Дм)	0,12	0,68	0,04	0,18	3,0

Проведенная на объектах Городокского лесного питомника производственная проверка эффективности использования разработанного метода агрохимической мелиорации на сеянцах лиственных пород – дуба черешчатого, клена остролистного и липы мелколистной показала, что в диапазоне содержания хлорида натрия в ризосфере исследуемых культур 100-300г/м² площади насаждения устойчивость сеянцев, по данным параметров их морфоструктуры и продукционных характеристик, последовательно снижается в ряду: дуб черешчатый – липа мелколистная – клен остролистный. Доза 300 г NaCl/м² для сеянцев клена остролистного оценивается как летальная, механизм действия мелиоранта на поступление Na, K и Ca в листья клена аналогичен действию мелиоранта, проявляющемуся в вариантах опыта с елью европейской (табл. 2). Показатели роста и массы надземных органов и корней у липы мелколистной при высоком уровне засоления снижаются относительно контроля до 48-80%, у дуба черешчатого практически не изменяются.

Анализ изменения под воздействием доломитовой муки содержания K и Ca в ассимилирующих тканях у лиственных пород показал, что степень и направленность изменений также носит видоспецифичный характер, который, по-видимому, обусловлен электрофизиологическими параметрами клеток корней и регулируется через изменение состояния плазматической мембраны в зависимости от концентрации ионов H⁺, Na⁺, Ca²⁺, K⁺ во внешней среде и растительной клетке [Юрин и др., 1991].

Таблица 2.

Воздействие доломитовой муки на содержание и баланс минеральных элементов Na, K и Ca в листьях семян клена остролистного, произрастающих на дерново-подзолистой супесчаной почве, загрязненной хлоридом натрия

Вариант опыта	% на абсолютно-сухое вещество			Na/K	Na/Ca
	Na	K	Ca		
NaCl 300	Усыхание и отпад семян				
NaCl 300+Дм 450	0,11	1,11	0,40	0,10	0,28
NaCl 100	0,13	1,21	0,81	0,10	0,16
NaCl 100+Дм 150	0,02	1,28	0,71	0,02	0,03
Контроль (без внесения NaCl и Дм)	0,04	1,28	0,66	0,03	0,06

Заклучение. Изучены видовые особенности физиологической реакции корневых систем и надземных органов хвойных и лиственных древесных пород на повышенные концентрации соли NaCl в ризосфере. Для древесных растений, неустойчивых к солевому загрязнению почвы, определены концентрации хлорида натрия, ингибирующие ростовые и продукционные процессы у данных видов за счет нарушения баланса катионов Na⁺, K⁺ и Ca²⁺, поступающих из почвы в растительный организм и транспортируемых в ассимиляционные органы. Разработан прием агрохимической мелиорации с использованием доломитовой муки, ослабляющий токсическое действие NaCl на жизнедеятельность изученных видов древесных пород.

Литература

Аверина Н.Г., Грицкевич Е.Р., Самович Т.В., Усатов А.В., Яронская Е.Б. Влияние солевого стресса на систему биосинтеза гема в альбино-ткани растений ячменя (*Hordeum vulgare*), обработанных стрептомицином // Вести НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2011. – № 1. – С. 62–66.

Еремченко О.З., Лымарь О.А., Орлова Н.В. Солевой обмен растений в условиях техногенного засоления // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2005. – Вып. 6. – С.164–167.

Кулаковская Т.Н., Роговой П.П., Смян Н.И. (ред.). Почвы Белорусской ССР. – Минск: Ураджай, 1974. – 312 с.

Кусакина М.Г., Еремченко О.З., Четина О.А. Влияние разного уровня техногенного засоления на некоторые показатели обмена веществ растений // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2011. – Вып. 1. – С. 73–77.

Удовенко Г.В. Солеустойчивость культурных растений. – Л.: Колос, 1977. – 215 с.

Юрин В.М., Соколик А.И., Кудряшов А.П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. – Минск: Наука и техника, 1991. – 272 с.

Якушев Б.И. Исследование растений и почв. Эколого-физиологические методы. – Минск: Наука и техника, 1988. – 72 с.

Yamaguchi T., Blumwald E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities // Trends in Plant Sciences. – 2005. – V. 10. – P. 615–620.

EXOGENETIC REGULATION OF THE MINERAL NUTRITION OF CONIFEROUS AND LEAF-BEARING SPECIES IN THE SOIL SALINIZATION CONDITIONS

Z.M. Anisova, M.M. Sak, T.A. Budkevich, B.I. Yakushev

V.F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus, *anisova_z@mail.ru*

Abstract. The effectiveness of the use of agrochemical melioration method as the way of weakening of toxic influence of the soil salinization by sodium chloride on the activity of coniferous and leaf-bearing tree species was estimated. The species specificity of the physiological reaction of wood plants to the influence of salt and use of dolomite powder as an ameliorant was revealed.

Keywords: *soil salinization, tree species, agrochemical melioration, mineral nutrition, rhizosphere*

СОДЕРЖАНИЕ ПИГМЕНТОВ В ХВОЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В МОЛОДНЯКАХ ЕСТЕСТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ПРОЙДЕННЫХ РУБКАМИ УХОДА РАЗНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

Н.В. Астраханцева, Л.И. Романова, Д.С. Собачкин

Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения Федеральный исследовательский центр Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия, *institute_forest@ksc.krasn.ru; astr_nat@mail.ru*

Аннотация. Изучали изменения концентрации фотосинтетических пигментов в хвое соснового молодняка на протяжении вегетации и в зависимости от плотности насаждений. Показано, что густота произрастания сосновых молодняков оказывает значимое влияние на концентрацию фотосинтетических пигментов в хвое деревьев, тем самым обуславливая их фотоассимиляционную способность в соответствии с условиями местообитания.

Ключевые слова: рубки ухода, фотосинтетические пигменты

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1034-1037

Лесоведам широко известен тот факт, что в соответствующих почвенно-климатических условиях рубки ухода являются эффективным средством улучшения качества и состояния древесных насаждений.

Поскольку одним из важнейших показателей условий роста служит деятельность фотоассимиляционного аппарата, то с целью выяснения реакции сосны обыкновенной на рубки ухода проводили исследования фотосинтетических пигментов в сосновых молодняках естественного происхождения, возникших на старопахотных землях в окружении сосняков зеленомошно-разнотравных на дерново-подзолистой почве в Емельяновском районе Красноярского края. Опытные площадки площадью 0,04 га были заложены в 2009 году сотрудниками лаборатории лесоведения в следующих вариантах: 1 – контроль (40700 шт./га), 2 – слабое прореживание (16800 шт./га, интенсивность рубки 59%), 3 – среднее прореживание (9500 шт./га, 77%), 4 – сильное прореживание (2900 шт./га, 93%). Возраст деревьев на момент закладки опыта 7-8 лет.

В течение последующих вегетационных периодов в однолетней хвое господствующих деревьев определяли содержание хлорофиллов а и b, а также каротиноидов.

Установлено, что на участке с максимальным осветлением через месяц после вырубки первичная реакция выразилась в существенном увеличении содержания хлорофилла b (до 160%) и каротиноидов (до 140%) в хвое верхней части кроны деревьев, а в остальных вариантах в умеренном (5–12%) увеличении всех фотосинтетических пигментов. В хвое нижней части кроны появилась тенденция к снижению количества хлорофиллов, содержание каротиноидов было менее переменным.

Через 8 лет после начала эксперимента длина однолетней хвои и масса сухой хвоинки в верхней части кроны увеличивались от контроля (п.п. 1) к пробной площади с максимальным прореживанием (п.п. 4) от 7,6 до 8,8 см и от 25 до 31 мг соответственно. Исключение составила площадь со слабым прореживанием (п.п. 2), где отмечалось снижение как длины ($7,2 \pm 0,2$ см), так и массы хвоинки ($21,5 \pm 1,1$ мг).

На всех опытных площадках наблюдалось увеличение суммарного количества фотосинтетических пигментов в хвое как верхней, так и нижней части кроны с середины мая по сентябрь (рис. 1).

Возрастание, по сравнению с контролем, количества пигментов в хвое верхней части кроны на слабо изреженной площади (п.п. 2) происходило в мае за счёт существенного (147-155%) увеличения содержания каротиноидов и хлорофилла а (рис. 2). Эти данные согласуются с оценкой уровня фото- и биосинтетической активности насаждений, растущих при разной густоте [Бузыкин и др., 2002], которые выяснили, что у наиболее осветлённых деревьев эффективность деятельности фотосинтетического аппарата примерно в три раза ниже, чем у деревьев в ценозе. В плотных же древостоях фотосинтетический аппарат работает на пределе адаптационных возможностей из-за резкого снижения соотношения величины кроны к остальным частям растения, а после исчерпания существующего потенциала, наступает отпад отставших в росте растений.

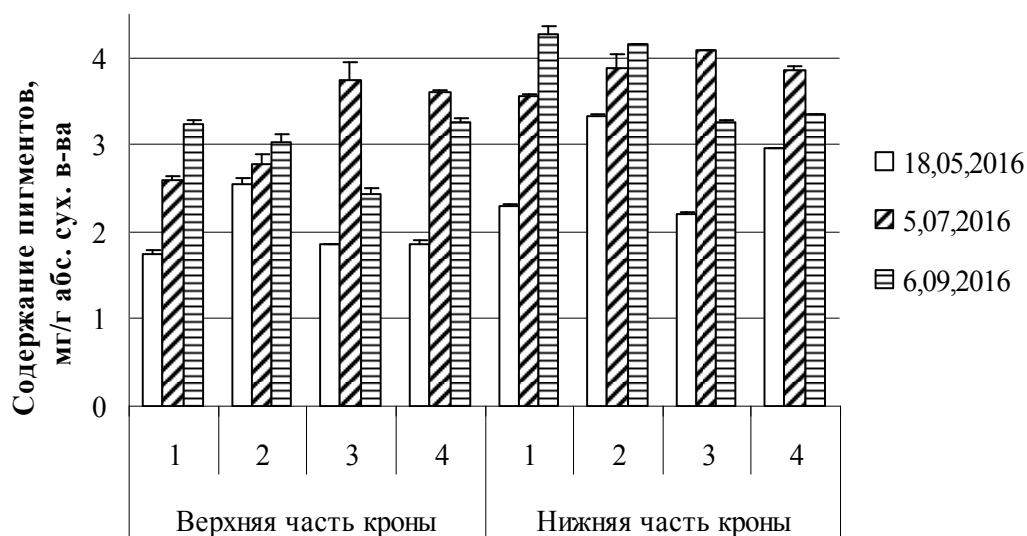


Рис. 1. Изменение содержания суммы фотосинтетических пигментов в ходе вегетации 2016 г. в однолетней хвое сосны обыкновенной на опытных площадках, пройденных рубками ухода разной интенсивности: 1 – контроль, 2 – слабое прореживание, 3 – среднее, 4 – сильное прореживание.

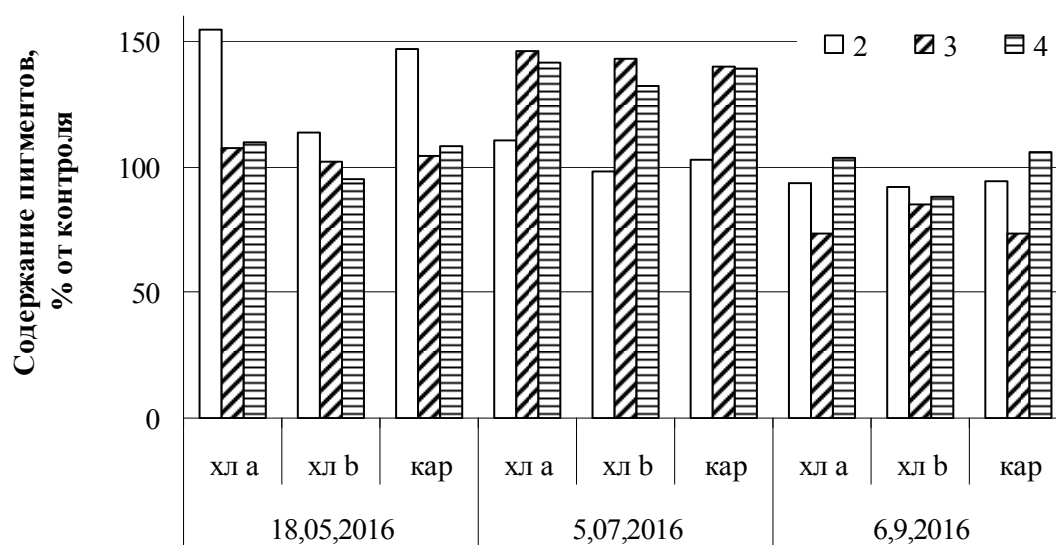


Рис. 2. Относительное содержание хлорофилла а, хлорофилла b и каротиноидов в однолетней хвое в верхней части кроны, % от контроля. Обозначения как на рис. 1.

У деревьев на опытных площадках с более сильным прореживанием максимальное содержание всех пигментов в верхней части кроны отмечено в середине лета (132-146% от контроля), к осени оно снижалось, особенно на п.п. 3, где заметно падало количество хлорофилла а и каротиноидов. В целом, на большей части площадей содержание пигментов в верхней части кроны близко к контролю в начале и конце вегетации, в середине вегетации сходство наблюдалось между контролем и п.п. 2, тогда как на п.п. 3 и 4 отмечен максимум пигментов.

Через 8 лет после начала эксперимента длина однолетней хвои и масса сухой хвоинки в нижней части кроны постепенно увеличивались от контроля к пробной площади с максимальным прореживанием от 4,5 до 5,2 см и от 9,7 до 11,4 мг соответственно. Сумма пигментов в вариантах с рубками была выше, чем в контроле в начале и середине вегетации, в конце вегетации на п.п. 3 и 4 сумма пигментов снижалась, а в контроле и п.п. 2 росла (рис. 1).

Самое высокое, относительно контроля, содержание пигментов в нижней части кроны (134-149%), особенно хлорофилла а, отмечено в начале вегетации на пробной площади со слабым прореживанием (рис. 3), что совпадало с картиной в верхней части кроны (рис. 2). На п.п. 4 (максимальное прореживание) увеличение относительного содержания пигментов было сходным с п.п. 2, но меньшим по значению (108-135%). В середине вегетации на всех пройденных рубками ухода площадях содержание фотосинтетических пигментов было несколько выше, чем в контроле, особенно содержание хлорофилла b (117-128%). В конце вегетации содержание хлорофиллов и каротиноидов на п.п. 3 и 4 снижалось более равномерно, чем в верхней части кроны.

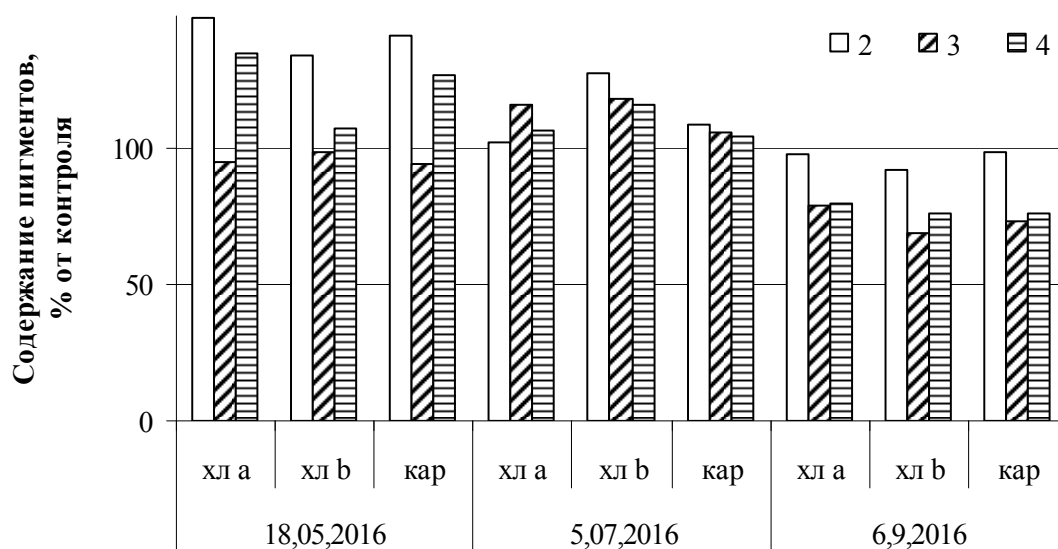


Рис. 3. Относительное содержание хлорофилла а, хлорофилла b и каротиноидов в однолетней хвое в нижней части кроны, % от контроля. Обозначения как на рис. 1.

Сопоставление данных по изменению содержания пигментов на площадях, пройденных рубками ухода, не показало какой-либо четкой зависимости между степенью прореживания и фракционным составом пигментов, важнее было их общее содержание. В начале вегетации самое высокое содержание пигментов в верхней и нижней частях кроны отмечали на п.п. 2, в середине вегетации – на п.п. 3 и 4, в конце вегетации – на п.п. 1 и 2.

Известно, что с увеличением густоты древостоя масса хвои уменьшается как в целом, так и по отношению к объему стволовой части [Бузыкин и др., 2002]. При

пересчете содержания пигментов на вес одной хвоинки оказалось, что количество пигментов было максимальным в варианте с сильным прореживанием на протяжении всей вегетации. Далее максимумы располагались: в середине вегетации – на п.п. 3, в конце вегетации – на п.п. 1, в начале вегетации – на п.п. 2 (потом значения здесь стали ниже, чем в контроле). Учитывая, что основная масса фотоассимилятов аккумулируется в середине вегетационного сезона, следовало ожидать снижения прироста биомассы ствола от площади с сильным прореживанием к площади со средним, далее к контролю и площади со слабым прореживанием. Это было подтверждено изучением приростов ксилемы модельных деревьев.

Выводы. В целом, можно сказать, что в молодняках сосны обыкновенной с уменьшением густоты древостоя в результате рубок ухода улучшались морфометрические показатели однолетней хвои верхней части кроны, показатели хвои в нижней части кроны росли, но различия были небольшие.

Варьирование компонентного состава фотосинтетических пигментов не позволяло выделить роль определенного хлорофилла или каротиноидов в реакции на рубки ухода, важнее оказалось общее содержание пигментов. Максимальное количество пигментов фиксировалось в середине вегетации у особей с пробных площадей со средним и сильным прореживанием в период основного роста ствола в высоту и по диаметру.

Таким образом, наряду с большим количеством других внешних факторов, густота произрастания сосновых молодняков оказывает значимое влияние на концентрацию фотосинтетических пигментов в хвое деревьев, обуславливая их фотоассимиляционную способность в соответствии с условиями местообитания.

Литература

Бузыкин А.И., Пшеничникова Л.С., Суховольский В.Г. Густота и продуктивность древесных ценозов. – Новосибирск: Наука, 2002. – 152 с.

THE PIGMENTS CONTENT IN SCOTS PINE NEEDLES FROM THE NATURAL YOUNG STANDS TREATED BY THINNING OF DIFFERENT INTENSITY

N.V. Astrakhantseva, L.I. Romanova, D.S. Sobachkin

Sukachev Institute of Forest SB RAS, Krasnoyarsk, Russia,
institute_forest@ksc.krasn.ru, astr_nat@mail.ru

Abstract. The change in the content of photosynthetic pigments depending on the density of stands in the one-year-old needles of young Scots pine trees were studied. The density of stands has a significant effect on the concentration of photosynthetic pigments in the needles of trees, thereby causing their photo assimilation ability in accordance with habitat conditions.

Keywords: *thinning, photosynthetic pigments*

УСТОЙЧИВОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ ТЕХНОГЕННЫХ ЭКОТОПОВ К ДЕЙСТВИЮ ПИРИДИНА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Е.Н. Виноградова

Государственное учреждение «Донецкий ботанический сад», Донецк, Украина,
donetsk-sad@mail.ru

Аннотация. Выявлено снижение сродства к субстратам и чувствительности к пиридину, ингредиенту эмиссий, пероксидазы *Populus deltoides* техногенных насаждений, что может быть одним из механизмов адаптации, который заключается в защитных модификациях молекул ключевых ферментов. Снижение чувствительности к пиридину пероксидазы семенного потомства *Bromopsis inermis* техногенной популяции свидетельствует об определенной генотипической дифференциации, что проявляется в наследовании устойчивости к токсикантам.

Ключевые слова: пероксидаза, устойчивость, техногенное загрязнение, пиридин, механизмы адаптации

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1038-1042

Растения популяций, формирующихся на загрязненных территориях, могут проявлять более высокую устойчивость к основным ингредиентам загрязнения среды [Игошина, Косицын, 1990; Фазлиева, 2012]. Дифференциация растительности и изменение структуры популяций может происходить за счет ослабления роста и снижения конкурентоспособности наиболее чувствительных видов и особей, то есть загрязнение среды, действуя как фактор отбора, способствует формированию устойчивых генотипов [Rout Gyana, 2000]. В реализации адаптивного потенциала растений важную роль играют качественные изменения ключевых ферментных систем, обеспечивающих возможность существования в условиях техногенного загрязнения. Одним из возможных физиолого-биохимических механизмов адаптации может быть снижение чувствительности отдельных ферментов к прямому действию токсикантов. [Игошина, Косицын, 1990; Феник, 1995]. Не исключено формирование подобных механизмов адаптации и в процессе онтогенеза в клетках древесных растений, произрастающих в зоне влияния промышленных предприятий.

В этой связи представляется актуальным исследование чувствительности ключевых ферментов, выделенных из листьев растений техногенных экотопов, к прямому влиянию ингредиентов промышленных эмиссий. К таким ферментам относится пероксидаза, которой принадлежит значительная роль в адаптивных реакциях растений, поскольку она способна обезвреживать токсичные перекисные соединения, образующиеся в клетке при воздействии стрессовых факторов [Scandalios, 2005]. Данный фермент принимает участие во многих процессах жизнедеятельности растений, поэтому его изучению уделяется пристальное внимание [Рогожин, 2004; Passardi, 2005]. Однако в большинстве публикаций анализируется изменение активности и компонентного состава фермента, механизмы регуляции его активности при поступлении в клетки растений токсичных веществ в полной мере не определены и остаются предметом исследований.

Анализировали устойчивость к влиянию пиридина, одного из органических компонентов выбросов химических и коксохимических производств, а также субстратную специфичность пероксидазы, выделенной из листьев тополя дельтовидного (*Populus deltoides* Marsh.), насаждения которого произрастали в санитарно-защитных зонах коксохимического (КХЗ) и фенольного (ФЗ) заводов.

Уступая в валовом объеме промышленных выбросов таким аэрополлютантам, как оксиды азота и серы, органические токсиканты часто являются наиболее опасными в экологическом плане [Тарабрин и др., 1986]. В модельных экспериментах изучали устойчивость к пиридину пероксидазы, выделенной из листьев трехнедельных проростков бромопсиса безостого (*Bromopsis inermis* (Leys.) Holub), выращенных из семян, собранных с растений популяции, нормально развивающейся в условиях действия выбросов коксохимического завода. Контролем служили растения *P. deltoides*, произрастающие в условиях фонового уровня загрязнения, и семенное потомство *B. inermis* популяции залежной степи. Анализировали влияние пиридина на активность пероксидазы в условиях *in vitro*, поскольку закономерности, полученные при действии поллютантов на интактные растения, могут быть вызваны не только прямым, но и опосредованным их действием [Гуральчук, 1994]. Для удаления эндогенных соединений, способных связывать и, таким образом, инактивировать пиридин, проводили очистку пероксидазы с помощью высаливания сульфатом аммония и последовательных гель-фильтраций на сефадексах G-25 (*P. deltoides*) или G-50 (*B. inermis*) и G-100. Сродство фермента к пероксиду водорода, а также к эндогенному (хлорогеновая кислота) и синтетическому (гваякол) фенольным соединениям оценивали по значениям константы Михаэлиса (K_m), равной концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимальной. Для определения устойчивости к пиридину очищенные препараты фермента инкубировали с водными растворами токсиканта в диапазоне концентраций 0,25–2,50 М (*P. deltoides*) и 0,60–4,40 М (*B. inermis*). Пиридиновые основания, проникая в растительную клетку, связываются с такими внутриклеточными рецепторами, как кислоты, вода и атомы переходных металлов, в том числе и входящие в активные центры ферментов [Тарабрин и др., 1986]. Способность пиридина связываться с водой в значительной степени снижает его токсичность и объясняет факт достижения ингибирующего эффекта на растения лишь при достаточно высоких концентрациях токсиканта. Устойчивость определяли по значению коэффициента устойчивости (K_y), который равен отношению активности фермента в пробе с токсикантом к активности контрольной пробы [Игошина, Косицин, 1990]. Достоверность результатов оценивали по стандартным методикам с использованием программ Excel.

Для пероксидазы, выделенной из листьев растений *P. deltoides*, подверженных в ходе онтогенеза влиянию техногенных эмиссий, K_m выше, соответственно, сродство по отношению к исследованным субстратам ниже, по сравнению с ферментом контрольных растений. Изменение субстратной специфичности возможно вследствие структурных перестроек активного центра или всей молекулы фермента. Для осуществления ферментативного катализа необходимы конформационные переходы молекулы белка, связанные с изменением слабых взаимодействий его пространственной структуры [Лютова, 1995]. Определенные конформационные перестройки молекул ферментов, в том числе и пероксидазы, могут происходить при действии на растения стрессовых факторов [Савич, 1989; Лютова, 1995].

Модификации пероксидазы из листьев растений техногенных насаждений, вызывающие снижение субстратсвязывающей способности фермента, вероятно, могут способствовать снижению его чувствительности к прямому влиянию аэрополлютантов. Для проверки данного предположения была проанализирована устойчивость пероксидазы *P. deltoides* техногенных и контрольных насаждений к действию пиридина в условиях *in vitro*. Выявлена четкая концентрационная зависимость снижения под влиянием пиридина активности пероксидазы из листьев растений всех исследованных насаждений. Для всего градиента концентраций токсиканта K_y был минимальным для фермента контрольных растений, а максимальным – для фермента растений,

испытывавших в ходе онтогенеза влияние выбросов ФЗ (рис. 1). Статистическая достоверность более высоких значений K_y пероксидазы растений ФЗ по сравнению с контролем подтверждена для всех исследованных концентраций пиридина, за исключением минимальной. Для пероксидазы растений КХЗ устойчивость к действию пиридина больше, чем в контроле, при действии концентраций токсиканта свыше 1 М. Максимальная концентрация пиридина снижает K_y пероксидазы контрольных растений на 77%, растений КХЗ – на 58% и ФЗ – на 55%.

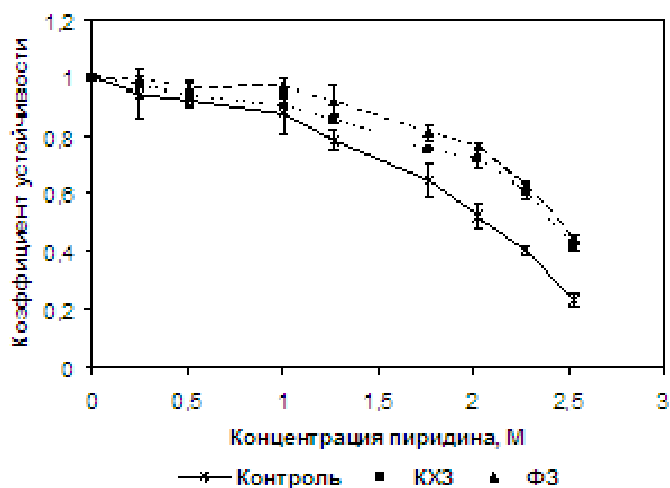


Рис. 1. Устойчивость к влиянию пиридина пероксидазы, выделенной из листьев растений *Populus deltoides* Marsh. произрастающих в условиях фонового уровня загрязнения (контроль), коксохимического (КХЗ) и фенольного (ФЗ) заводов.

Выявленная более высокая устойчивость к действию пиридина пероксидаз *P. deltoides* промышленных насаждений может быть результатом адаптивных изменений, происходящих в органах растений в ходе онтогенеза в условиях хронического действия эмиссий. Поскольку инактивация пероксидазы пиридином может осуществляться путём связывания с ее активным центром, возможные механизмы адаптации могут быть связаны с модификациями, способствующими защите активного центра фермента от прямого действия поступающих в клетку токсикантов, что одновременно вызывает уменьшение его субстратсвязывающей способности. Учитывая, что экспрессия изопероксидаз может меняться в процессе онтогенеза растений, наряду с изменением свойств ферментов на функциональном уровне, возможен также синтез изоформ с новыми свойствами [Nair, 1996].

При изучении влияния пиридина на пероксидазу, выделенную из листьев проростков *B. inermis*, выявлено, что начальные концентрации градиента вызывают повышение активности фермента, более существенное для потомства популяции, адаптированной к условиям эмиссий КХЗ (рис. 2). Так, активирование под влиянием пиридина пероксидазы потомства контрольной популяции наблюдалось только при минимальной его концентрации, а техногенной – и при более высоких концентрациях токсиканта (до 1,90 М). Дальнейшее повышение концентрации пиридина в реакционной смеси вызывает снижение активности фермента. Для всех исследуемых концентраций токсиканта, за исключением минимальной, более высокой устойчивостью характеризовалась пероксидаза проростков популяции КХЗ. Максимальная испытываемая концентрация пиридина вызывает снижение K_y фермента потомства контрольной популяции *B. inermis* на 74%, а техногенной – на 38%.

Повышенная устойчивость к ингредиентам эмиссий пероксидазы из листьев семенного потомства *B. inermis*, адаптированного к условиям промышленной площадки

предприятий, может быть одним из механизмов формирования устойчивых популяций на загрязненных территориях. Адаптация к условиям техногенного загрязнения происходит, вероятно, как за счёт элиминации чувствительных особей и отбора изначально устойчивых генотипов, так и за счет физиолого-биохимических изменений, расширяющих или смещающих диапазон нормы их реакции. Очевидно, что адаптивные модификации могут быть эффективными лишь до определённого уровня накопления токсиканта в клетках растений, превышение которого вызывает инактивирование фермента.

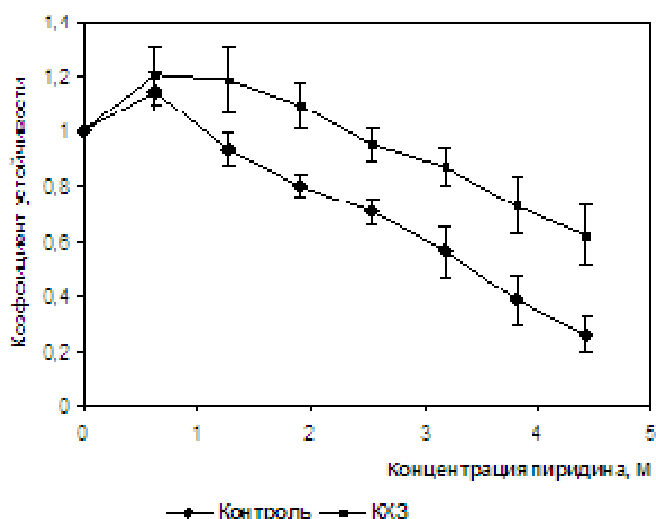


Рис. 2. Устойчивость к влиянию пиридина пероксидазы, выделенной из листьев семенного потомства популяции *Bromopsis inermis* (Leyss.) Holub, адаптированной к условиям залежной степи (контроль) и эмиссий коксохимического завода (КХЗ).

Литература

- Гуральчук Ж.З. Механизмы устойчивости растений к тяжёлым металлам // Физиология и биохимия культурных растений. – 1994. – Т. 26, № 2. – С. 207–217.
- Игошина Т.И., Косицин А.В. Устойчивость к свинцу карбоангидразы *Melica nutans* (Poaceae) // Ботанический журнал. – 1990. – Т. 75, № 8. – С. 1144–1150.
- Лютова М.И. Изменение термостабильности и кинетических свойств ферментов при адаптации растений к температуре // Физиология растений. – 1995. – Т. 42, № 6. – С. 929–941.
- Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. – С.- Пб.: ГИОРД, 2004. – 240 с.
- Савич И.М. Пероксидазы – стрессовые белки растений // Успехи современной биологии. – 1989. – Т. 107, вып. 3. – С. 406–417.
- Тарабрин В.П., Кондратюк Е.Н., Башкатов В.Г. и др. Фитотоксичность органических и неорганических загрязнителей. – Киев.: Наук. думка, 1986. – 216 с.
- Фазлиева Э.Р., Киселева И.С., Жуйкова Т.В. Антиоксидантная активность листьев *Melilotus albus* и *Trifolium medium* из техногенно нарушенных местообитаний Среднего Урала при действии меди // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 3. – С. 369–375.
- Феник С.И., Трофимьяк Т.Б., Блюм Я.Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжёлым металлам // Успехи современной биологии. – 1995. – Т. 11, № 3. – С. 231–275.
- Nair A.R., Showalter A.M. Purification and characterization of a wound-inducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1996. – V. 226. – P. 254–260.

Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunandi C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife // *Plant Cell Reports*. – 2005. – V. 24, No. 5. – P. 255–265.

Rout Gyana R., Samantaaray Sanghamitra, Premananda Das. Effects of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and non-tolerant populations of *Echinochloa colona* (L.) Link // *Chemosphere*. – 2000. – V. 40, No. 8 – P. 855–859.

Scandalios J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // *Braz. J. Med. and Biol. Res.* – 2005. – V. 38, No. 7. – P. 995–1014.

THE STABILITY OF PEROXIDASE FROM THE LEAVES OF PLANTS IN TECHNOGENIC ECOTOPES TO THE ACTION OF PYRIDINE *IN VITRO*

E.N. Vinogradova

Public Institution "Donetsk Botanical garden», Donetsk, Ukraine, donetsk-sad@mail.ru

Abstract. The decrease of affinity to substrates and sensitivity to pyridine, emission ingredient, and peroxidase of *Populus deltoides* of man-made plantations was revealed, which may be one of the adaptation mechanisms that consisting in protective modifications of molecules of key enzymes. The decrease in sensitivity to pyridine peroxidase of the seed offspring of the *Bromopsis inermis* of the technogenic population indicates its achievement of the genotypic differentiation manifested in the inheritance of resistance to toxicants.

Keywords: *peroxidase, resistance, technogenic pollution, pyridine, adaptation mechanisms*

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ГРУПП БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛИСТЬЯХ БОЯРЫШНИКА ОБМАНЧИВОГО

Н.А. Виноградова¹, Е.Н. Виноградова²

¹Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецк, *Arina0@meta.ua*

²Государственное учреждение «Донецкий ботанический сад», Донецк, *donetsk-sad@mail.ru*

Аннотация. Представлены результаты количественного определения некоторых групп биологически активных веществ (флавоноидов, дубильных веществ и аскорбиновой кислоты) в листьях *Crataegus fallacina* Klokov растений, произрастающих на участках с различной степенью техногенного загрязнения. Оценено соответствие листьев *C. fallacina*, собранных на территории Донецкого региона, требованиям Европейской фармакопеи по содержанию действующих веществ.

Ключевые слова: *Crataegus fallacina* Klokov, техногенное загрязнение, флавоноиды, танины, аскорбиновая кислота

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1043-1046

В настоящее время актуальна проблема техногенного загрязнения окружающей среды. Важным и недостаточно изученным является исследование динамики содержания биологически активных веществ в лекарственных растениях в зависимости от степени загрязнения [Загурская, 2013; Дьякова, 2014; Ханина, 2015]. Данная проблема является значимой для такого высокоразвитого промышленного региона как Донбасс, особенно на данный момент в связи с утратой традиционной сырьевой базы лекарственных растений.

Интерес официальной медицины к использованию лекарственных препаратов на основе растительного сырья неуклонно растет, что обусловлено сочетанием хорошего терапевтического эффекта фитопрепаратов с их относительной безвредностью [Соколов, 2000; Pittler, 2002]. К одной из злободневных задач современной фармацевтической науки необходимо отнести поиск растительных источников биологически активных веществ и создание на их основе препаратов сердечнососудистого действия [Машковский, 2012].

К группе растений, используемых для профилактики сердечнососудистых заболеваний, относятся растения рода Боярышник (*Crataegus* L.). Ценность препаратов боярышника обусловлена содержанием в них значительного количества биологически активных веществ, прежде всего фенольных соединений [Котов, 2004; Морозова, 2015; Самылина, 2010]. В Российской Федерации официально разрешено использование в фармации плодов боярышника [Государственная Фармакопея РФ, 2013]. Однако в Фармакопеи других стран (например, Европейскую, Белорусскую и Американскую травяную фармакопеи) включены также цветки и листья данного растения [Государственная фармакопея Республики Беларусь, 2007; European pharmacopea, 2010; American herbal pharmacopea, 2014]. Они входят в состав более чем 100 зарубежных лекарственных препаратов, в основном это сосудистые, антиаритмические, кардиотонические, гериатрические группы, а также препараты для лечения и профилактики атеросклероза [Родионова, 2008; Морозова, 2015].

К растениям природной флоры Донбасса относится боярышник обманчивый (*Crataegus fallacina* Klokov). Это нефармакопейный вид и его химический состав практически не изучен. Исследование содержания биологически активных веществ в

сырье *C. fallacina*, собранного на территории Донбасса, важно для расширения сырьевой базы лекарственных фитопрепаратов в регионе.

Целью данной работы было изучение содержания биологически активных веществ в листьях *Crataegus fallacina*, а также их динамики в зависимости от степени техногенного загрязнения среды.

Сбор листьев *C. fallacina* проводился на территории Донбасса, в условиях, значительно отличающихся интенсивностью техногенной нагрузки: урочище Балка Певчая (экологически чистая территория, выбранная в качестве контроля), Донецкий ботанический сад, расположенный на окраине г. Донецка (фоновый уровень загрязнения), а также вдоль городской автотрассы с интенсивным движением (высокий уровень загрязнения).

Заготовку сырьевой части растений проводили в 2017 г по мере достижения ими соответствующего фенологического состояния. Собранное сырье сушили естественной сушкой (воздушно-теновой). Все расчеты по содержанию различных групп биологически активных веществ приведены на абсолютно сухую массу. Достоверность результатов оценивали по стандартным методикам с использованием программ Excel. Биологическая повторность опытов – пятикратная, аналитическая – трехкратная.

Основные группы биологически активных веществ идентифицировали с помощью фармакопейных качественных реакций, для количественного определения использовали инструментальные фармакопейные методы определения [Государственная Фармакопея РФ, 2013]. Для количественного определения дубильных веществ (в пересчете на танин) и аскорбиновой кислоты применяли титриметрические методы. Определение содержания флавоноидов (в пересчете на гиперозид) проводили спектрофотометрическим методом.

Результаты количественного определения некоторых групп биологически активных веществ в листьях *C. Fallacina* растений, произрастающих в различных экологических условиях, представлены в таблице.

Таблица.

Содержание биологически активных веществ в листьях *Crataegus fallacina* Klokov

Группа биологически активных веществ	Место сбора сырья		
	автотрасса	ботанический сад	балка (контроль)
флавоноиды (в %, в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье)	2,03±0,05***	1,83±0,03***	1,53±0,02
дубильные вещества (в %, в пересчете на танин и абсолютно сухое сырье)	18,25±0,03***	10,27±0,04***	7,85±0,04
аскорбиновая кислота (в %, в пересчете на абсолютно сухое сырье)	0,13±0,01**	0,21±0,003*	0,18±0,01

Примечание: *различие с контролем достоверно при уровне значимости $p \leq 0,05$; **различие с контролем достоверно при уровне значимости $p \leq 0,01$; ***различие с контролем достоверно при уровне значимости $p \leq 0,001$

Основными действующими веществами листьев боярышника считаются флавоноиды [Родионова, 2008; Самылина, 2010; Морозова, 2015]. В Европейской фармакопее стандартизация листьев боярышника проводится по содержанию флавоноидов в пересчете на гиперозид. Выявлено, что содержание флавоноидов в листьях *C. fallacina* достоверно увеличивается с повышением уровня техногенного загрязнения. Вероятно, данные вещества принимают участие в реакциях адаптации растений к неблагоприятным условиям среды. Содержание флавоноидов в листьях *C.*

fallacina всех исследуемых образцов соответствует требованиям Европейской фармакопеи (не менее 1,5%).

Аналогичная динамика в зависимости от уровня антропогенного прессинга характерна для другой группы фенольных соединений *C. fallacina* – дубильных веществ (танинов). Установлено, что с повышением техногенной нагрузки происходит достоверное увеличение содержания дубильных веществ в листьях *C. fallacina*. Эти метаболиты обладают вяжущими, антиоксидантными и ангиопротекторными свойствами [Ковалев, 2000; Соколов, 2000]. С помощью фармакопейной качественной реакции с раствором железа хлорида (III) было установлено, что в данном сырье преобладает группа конденсируемых дубильных веществ. Содержание танинов в листьях *C. fallacina* сравнимо с содержанием данных веществ в таком известном фармакопейном их источнике как кора дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) (согласно требованиям Государственной Фармакопеи РФ: не менее 8%), что обуславливает перспективность использования исследуемого сырья для изготовления противовоспалительных и вяжущих препаратов.

Одним из биохимических параметров, отражающих влияние загрязняющих веществ на растительные организмы, является содержание аскорбиновой кислоты. Это важнейшее полифункциональное соединение автотрофных организмов. Она принимает участие в таких процессах как фотосинтез, дыхание, рост, развитие, устойчивость и др. [Чиркова, 2002]. Содержание аскорбиновой кислоты тесно связано с условиями произрастания и физиологическим состоянием растительного организма [Бухарина, 2007; Зарипова, 2015]. Наиболее высокое содержание аскорбиновой кислоты характерно для листьев *C. fallacina*, собранных на территории с фоновым уровнем загрязнения. Увеличение концентрации этого вещества свидетельствует о его участии в нейтрализации свободных радикалов и интенсификации окислительно-восстановительных процессов. Однако в листьях *C. fallacina*, собранных на территории с высоким уровнем загрязнения, содержится в 1,4 раза меньше аскорбиновой кислоты, чем в листьях с контрольной территории. Вероятно, это можно объяснить истощением адаптационных возможностей защитной системы, в которой принимает участие витамин С.

Таким образом, листья *C. fallacina* соответствуют требованиям Европейской фармакопеи по содержанию действующих веществ и являются перспективным сырьем для изготовления лекарственных препаратов, обладающих кардиотоническим, антиоксидантным и противовоспалительным действием. Необходимо дальнейшее изучение сырья *C. fallacina*, собранного на Донбассе, для оценки его экологической безопасности. Значительное увеличение содержания дубильных веществ и флавоноидов в листьях *C. fallacina* в загрязненных регионах по сравнению с контролем свидетельствует о возможности использования данных показателей в биоиндикационных целях при оценке степени воздействия техногенной среды на растения.

Литература

Бухарина И.Л., Поварницкая Т.М., Ведерников К.Е. Эколого-биологические особенности древесных растений в урбанизированной среде: монография. – Ижевск: ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2007. – 216 с.

Государственная фармакопея Республики Беларусь: Т. 2. (под общ. ред. А.А. Шерякова). – УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» – Минск, 2007. – 471 с.

Государственная Фармакопея РФ: Т 2. – 13-е изд. – МЗ РФ, М.: 2015. – 1004 с.

Дьякова Н.А., Кукуева Л.Л., Гапонов С.П., Сливкин А.И. Влияние антропогенной нагрузки на содержание биологически активных соединений в лекарственном

растительном сырье города Воронежа и его окрестностей // Известия ВГПУ. Естественные науки. – №1 (262). – Изд-во ВГСПУ «Перемена», 2014. – С. 266 – 270.

Загурская Ю.В. и др. Качество сырья лекарственных растений при выращивании в антропогенно нарушенных регионах Западной Сибири на примере *Hypericum perforatum* L. и *Leonurus quinquelobatus* Gilib // Химия растительного сырья. – 2013. – № 4. – С. 141–150.

Зарипова Р.С., Кузьмин П.А. Влияние антропогенного стресса на динамику аскорбиновой кислоты в растениях // Инновационная наука. – 2015. – № 5. – С. 24–25.

Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М., 2012. – 420 с.

Морозова Т.В., Куркин В.А., Куркина А.В., Правдивцева О.Е. Фармакогностическое и фармакологическое исследование сырья боярышника // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Т. 17, № 5(3). – С. 959–963.

Ковальов В.М., Павлій О.І., Ісакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин. – Харків.: Прапор, 2000. – 704 с.

Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Товмасын Э.К. Вопросы введения в государственную фармакопею Украины монографии «Плоды боярышника» // ФАРМАКОМ. – Харьков, 2004. – №4. – С. 1–8.

Самылина И.А., Сорокина А.А., Пятигорская Н.В. Боярышник (*Crataegus*): возможности медицинского применения // Фарматека. – 2010. – № 8. – С. 83–85.

Соколов С.Я. Фитотерапия и фитофармакология. – М.: Медицинское информационное агентство, 2000. – 147 с.

Родионова Т.В., Хишова О.М. Стандартизация листьев боярышника // Вестник фармации. – 2008. – № 2 (40). – С. 70–79.

Ханина М.А. Загрязнение окружающей среды и биологически активные вещества листьев березы // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2015. – № 6. – С. 121–132.

Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та. – 2002. – 244 с.

American herbal pharmacopea 37: The National Formulary 32. – New York, 2014. – 2569 p.

European pharmacopea: 7-th ed. – V. 1. – Strasbourg, France, 2010. – 1297 p.

Pittler M.H., Guo R., Emst E. Who monographs on selected medicinal plants // World Health Organization. – Geneva, 2002. – V. 2. – P. 142–145.

THE INFLUENCE OF TECHNOGENIC CONTAMINATION ON THE CONTENT OF SOME GROUPS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN THE LEAVES OF *CRATAEGUS FALLACINA* KLOKOV

N.A. Vinogradova¹, E.N. Vinogradova²

¹Donetsk national medical university named after M. Gorky, Donetsk, Arina0@meta.ua

²Public Institution «Donetsk Botanical Garden», Donetsk, donetsk-sad@mail.ru

Abstract. The results of quantitative determination of some groups of biologically active substances (flavonoids, tannins and ascorbic acid) in the leaves of *Crataegus fallacina* Klokov, growing under different levels of technogenic pollution are presented. The correspondence of *C fallacina* leaves collected in the territory of the Donetsk region to the requirements of the European Pharmacopoeia for the content of substances that determine the pharmacological action of this medicinal plant material.

Keywords: *Crataegus fallacina* Klokov, technogenic pollution, flavonoids, tannins, ascorbic acid

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА В ХВОЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PINUS SYLVESTRIS* L.) В ПОСТПИРОГЕННЫЙ ПЕРИОД

И.Г. Гетте¹, Н.Е. Коротаева², И.В. Косов³, Г.Б. Боровский²

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия, getteirina@yandex.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, knev73@yandex.ru

³Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

Аннотация. В работе приведены результаты по измерению полуколичественного содержания белков теплового шока (heat shock proteins, Hsp) хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) как критерия в оценке общего физиологического статуса. Экспериментальные данные отражают содержание Hsp в ответ на прямое (через отклик деревьев на воздействие огня) и косвенное воздействие пожара (через отклик на послепожарную трансформацию условий среды).

Ключевые слова: лесные пожары, белки теплового шока, сосна обыкновенная, постпирогенный период

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1047-1051

Одним из наиболее актуальных экологических факторов, которым регулярно подвергаются лесные биоценозы в условиях Сибири, являются пожары [Иванова и др., 2014]. Распределение лесных пожаров по территории Сибири неравномерно, в основном, они затрагивают районы с насаждениями лиственницы сибирской и сосны обыкновенной, которые характеризуются повышенной пожароопасностью. Именно на сосновые леса приходится до 60% от общего количества лесных пожаров, большинство из которых – низовые [Korovin, 1996]. Во время огневого воздействия деревья подвергаются интенсивному нагреву за счет конвекционного тепла. Подобного рода высокотемпературное воздействие можно отнести к стрессовому фактору с коротким интервалом действия высоких температур, но продолжительным периодом влияния изменённых условий среды, называемым «постпирогенный период». Ряд авторов отмечает наличие компенсационных эффектов в послепожарный период, как на морфологическом уровне, так и на физиолого-биохимическом [Фурьев, Фурьев, 2008; Цветков, 2011]. Однако остается открытым вопрос об особенностях восстановления метаболизма древостоя, а также о продолжительности сохранения акклимационных эффектов, имеющих важное практическое значение. Конвективный поток низового пожара оказывает непосредственное влияние на вегетативные органы растений, что впоследствии сказывается на состоянии организма в целом. Среди защитно-приспособительных механизмов растений к действию различных стрессовых факторов выделяют изменение экспрессии генов и рост синтеза белков теплового шока (heat shock proteins, Hsp) [Кулаева, 1997]. Таким образом, цель работы заключалась в определении содержания белков теплового шока в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), накапливающихся как во время низового пожара, так и в постпирогенный период.

Для проведения исследования было подобрано два участка с насаждениями сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) зеленомошно-разнотравной группы типов леса I и II классов возраста, расположенных в одном таксационном выделе в Красноярской

лесостепи в Емельяновском районе Красноярского края. На обоих участках проводилось экспериментальное выжигание методом отжига от одной стороны участка, имитирующего кромку низового пожара слабой силы [Курбатский, 1962]. На первом экспериментальном участке (ЭУ) контролируемое выжигание было проведено в летний период 2014 г., на втором экспериментальном участке – в вегетационный период 2017 года. Во время экспериментов фиксировались высота пламени, скорость продвижения кромки пожара, глубина прогорания лесных горючих материалов. Температура конвективного потока в кроне модельных деревьев фиксировалась автономными регистраторами температуры Eclerk («РЭЛСИБ», Россия) с разрешающей способностью в 1 с.

Для оценки первичной стрессовой реакции и в кратковременной динамике отбор хвои проводили перед выжиганием 2017 года (контроль), через 30 минут и спустя 2 и 5 суток. Для установления различия в начальном содержании белков, а также в темпах его синтеза для хвои, сформированной после контролируемого выжигания 2014 года, был применен прием повторного стрессирования побегов в термостате (1ч при 45 °С). В данном случае, для сравнения был подобран контрольный участок с аналогичными климатическими и эдафическими условиями, при этом древостой ранее не был затронут низовым пожаром.

Для оценки содержания стрессовых белков в хвое использован современный высокочувствительный аналитический метод выделения и полуколичественной оценки содержания белков теплового шока растений (Вестерн-блоттинг). Общий белок выделяли по ранее опубликованной методике [Korotaeva et al., 2012].

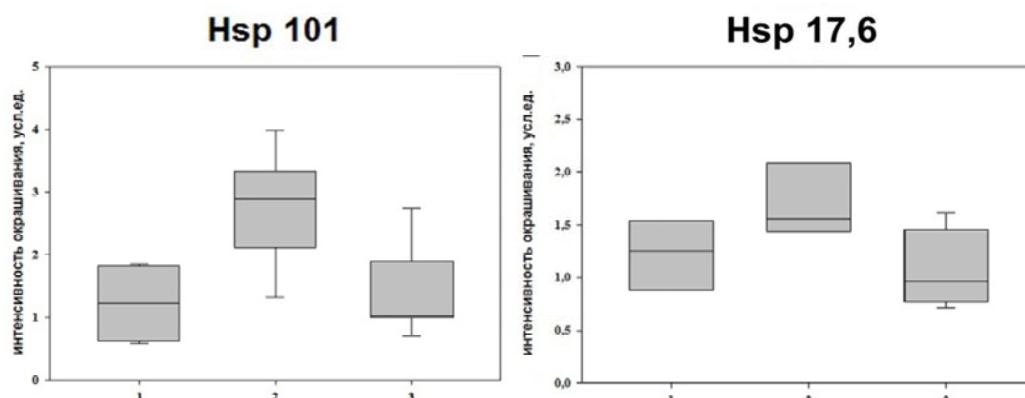


Рис. 1. Изменение содержания Hsp101 и Hsp 17,6 в хвое сосны обыкновенной сразу после проведения искусственного выжигания и в краткосрочной динамике. Представлен результат денситометрической оценки интенсивности окрашивания белковых пятен после экстракции общего белка, электрофореза в ПААГ и Вестерн Блот. 1 -пробы отбирались через 30 мин после выжигания; 2 - через 2 суток после выжигания; 3 - через 5 суток после выжигания. Интенсивность окрашивания каждого белка представлена в условных единицах относительно контроля, принятого за 1. Ме [25%; 75%], бары показывают минимальное и максимальное значения.

По данным, полученным с температурных датчиков, закрепленных на момент проведения экспериментов в кроне молодых деревьев, средние температуры составили около 46 ± 7 °С. Температуры выше 30 °С оказывали влияние в диапазоне от 5.5 до 15 минут, при этом максимальные значения могли варьировать от 48 °С до 80 °С. Именно это непродолжительное влияние высоких температур на крону деревьев, сопровождающееся обгоранием стволов, а также продолжительным тлением подстилки может запускать в растениях многочисленные структурные и функциональные изменения. Одним из проявлений защитных механизмов в фотосинтезирующих органах растений является накопление белков теплового шока. При этом реализация

функций высокомолекулярных Hsp (Mг 110-50 кДа) осуществляется с участием низкомолекулярных стрессовых белков (Mг 40-15 кДа) [Al-Whaibi, 2011]. Для наглядности, на рисунке 1 и 2 представлены данные по определению содержания Hsp 101 и Hsp 17,6.

На рис. 1 представлены данные, характеризующие краткосрочную динамику изменения содержания белков теплового шока в хвое в результате проведения контролируемого выжигания в вегетационный период 2017 года.

Спустя 30 минут после непродолжительного высокотемпературного воздействия, накопление стрессовых белков было довольно слабым по сравнению с контрольным уровнем. Такое слабое накопление может говорить либо о кратковременности воздействия, недостаточной для активации защитных механизмов на уровне белкового синтеза, либо о сильных барьерных свойствах наружных структур хвои [Загирова, 1999]. В пробах, отобранных через 2 суток, отмечено наибольшее содержание стрессовых белков, при этом содержание Hsp 101 выше по сравнению с пробами, отобранными через 30 мин и на 5 суток. Содержание Hsp на 5 сутки существенно не отличалось от их содержания спустя 30 минут после выжигания (для Hsp 101) и от содержания в контроле (для Hsp 17,6). Сохранение относительного количества Hsp 101 на уровне выше контрольного на 5 сутки может говорить в пользу сохранения стрессирующего эффекта, либо продолжения восстановительных процессов, для которых наличие стрессового белка может быть необходимо.

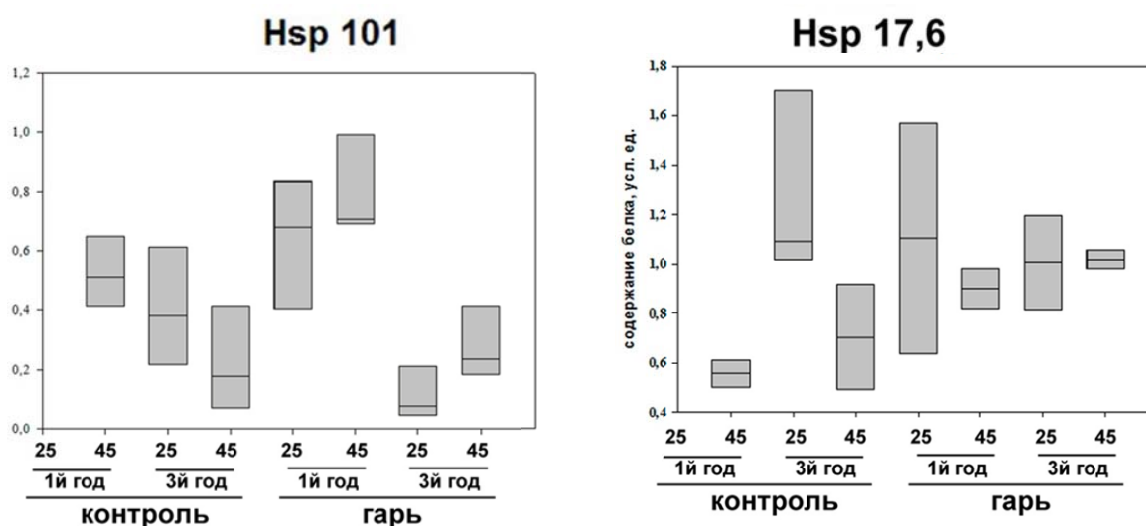


Рис. 2. Изменение содержания Hsp101 и Hsp 17,6 в хвое сосны обыкновенной, сформированной после искусственного выжигания 2014 г. Представлен результат денситометрической оценки интенсивности окрашивания белковых пятен: контроль – экспериментальной участок без огневого воздействия; гарь – экспериментальный участок после контролируемого выжигания 2014 года (25 – начальное содержание Hsp, после суток акклиматизации в лабораторных условиях; 45 – содержание Hsp, после обработки температурой 45 °С, в течение 1 часа). Интенсивность окрашивания каждого белка представлена в условных единицах относительно контроля, принятого за 1. Ме [25%; 75%], бары показывают минимальное и максимальное значения.

На рис. 2 представлены результаты по оценке содержания белков в хвое 1 и 3 года, сформированной в восстановительном периоде, т.е. не испытывающей влияние высоких температур при контролируемом выжигании 2014 года. Исследование содержания Hsp проводилось в хвое побегов, отобранных в период выхода из покоя (апрель), после суток акклиматизации в лабораторных условиях. Можно отметить, что в хвое 1 года жизни содержание Hsp101 немного выше относительно хвои 3 года жизни

как с контрольной пробной площади, так и с участка, на котором было проведено экспериментальное горение.

Термическая обработка (45 °С/1 час) не привела к накоплению Hsp 101, Hsp 17,6 в хвое контрольных деревьев, напротив наблюдается снижение в содержании данных белков, относительно начального уровня. В данном случае снижение способности растительных клеток к экспрессии белков теплового шока, возможно, может определять отсутствие резистентности к тепловому стрессу во время выхода из состояния зимнего покоя. Видимо, даже предварительная акклимация побегов при комнатной температуре не смогла полностью активировать тепловую регуляцию хвои. Однако термическая обработка для хвои 1 и 3 года жизни с деревьев, произрастающих на пробной площади после выжигания, привела к накоплению Hsp 101 относительно исходного содержания. Однако существенного накопления Hsp17,6 в послепожарной хвое постле стрессирования при 45 °С не произошло. Таким образом, хвоя сосны обыкновенной, сформированная после низового пожара, в результате повторного прогревания накапливает Hsp 101 и, возможно, обладает большей устойчивостью к повторному действию сублетальных температур.

Проведенное исследование выявило признаки стрессового состояния древостоя в виде накопления Hsp в краткосрочном послепожарном периоде. В дальнейшем сформированные «постпирогенные условия» могут способствовать повышению устойчивости организма в целом, что может определять его резистентность к повреждающим факторам среды. По нашим сведениям это первое исследование динамики содержания стрессовых белков в хвое сосны обыкновенной на различных этапах постпирогенного периода.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-34-50051 «мол_нр» (Оценка содержания стрессовых белков в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) после низовых пожаров в условиях Красноярской лесостепи).*

Литература

- Загирова С.В. Структура ассимиляционного аппарата и СО₂-газообмен у хвойных. – Екатеринбург: Российская АН, 1999. – 108 с.
- Иванова Г.А., Конард С.Г., Макрае Д.Д. Воздействие пожаров на компоненты экосистемы среднетаежных сосняков Сибири. – Новосибирск: Наука, 2014. – 232 с.
- Кулаева О.Н. Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессу // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 2. – С. 5–13.
- Курбатский Н.П. Техника и тактика тушения лесных пожаров. – Москва: Гослесбумиздат, 1962. – 154 с.
- Фуряев В.В., Фуряев Е.А. Пирозкологические свойства сосны обыкновенной в Средней Сибири // Хвойные бореальной зоны. – 2008. – № 1-2. – С. 103–108.
- Цветков П.А. Пирогенные свойства древесных пород // Лесоведение. – 2011. – № 2. – С. 25–31.
- Al-Whaibi Mohamed H. Plant heat-shock proteins: a mini review // Journal of King Saud University – Science. – 2011. – V. 23. – P. 139–150.
- Korotaeva N.E., Oskorbina M.V., Kopytova L.D., Suvorova G.G., Borovskii G.B., Voinikov V.K. Variations in the content of stress proteins in the needles of common pine (*Pinus sylvestris* L.) within an annual cycle // Journal of Forest Research. – 2012. – V. 17, No. 1. – P. 89–97.
- Korovin G.N. Analysis of the distribution of forest fires in Russia // Fire in Ecosystems of Boreal Eurasia. – Dordrecht; Boston; London: Kluwer Academic Publishers, 1996. – P. 112–128.

DETERMINATION OF THE HEAT SHOCK PROTEINS IN THE NEEDLES OF *PINUS SYLVESTRIS* L. IN POST-FIRE PERIOD

I.G. Gette¹, N.E. Korotaeva², I.V. Kosov³, G.B. Borovskii²

¹Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia, *getteirina@yandex.ru*

²Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *knev73@yandex.ru*

³«Sukachev Institute of Forest SB RAS», Krasnoyarsk, Russia

Abstract. The paper presents the experimental results of measuring the semiquantitative content of heat shock proteins (Hsp) of pine needles (*Pinus sylvestris* L.) as a criterion for assessing the overall physiological status. Our results are reflective of Hsp content in needles to a direct (response of trees to the fire effect) and the indirect effect of fire (response on the features of environment in post-fire period).

Keywords: *forest fires, heat shock proteins, scots pine, post-fire period*

РОЛЬ СИСТЕМЫ ПРОТЕОЛИЗА И ЛЕКТИНОВ В МЕХАНИЗМАХ АДАПТАЦИИ КУЛЬТУРНЫХ И ДИКОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ЛЭП

В.И. Домаш, О.Л. Канделинская, О.А. Иванов, Е.Р. Грищенко, Т.П. Шарпио, С.А. Забрейко

Государственное научное учреждение «Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь, valdomash@mail.ru

Аннотация. Установлено угнетающее действие электромагнитного излучения ЛЭП на морфометрические и биохимические показатели озимой пшеницы и дикорастущих видов растений. Нивелирование ингибиторного действия ЛЭП отмечено по мере удаления от источника излучения. Установлена роль компонентов системы протеолиза и лектинов в адаптации растений к стрессу.

Ключевые слова: Электромагнитное излучение, озимая пшеница, дикорастущие растения, адаптация

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1052-1054

В настоящее время считается общепризнанным, что электромагнитное поле (ЭМП) искусственного происхождения является важным экологическим фактором с высокой биологической активностью. Более того, в 1995 году Всемирная Организация Здравоохранения включила проблему глобального электромагнитного загрязнения окружающей среды в перечень приоритетных для человечества [Новицкий, 1984].

Основным источником электромагнитного загрязнения промышленной частоты, в том числе за пределами урбанизированных территорий, являются линии электропередач (ЛЭП), которые вместе с трансформаторными и преобразующими электростанциями формируют электросеть, – основное звено энергетической системы. При этом в зону влияния электромагнитного излучения ЛЭП попадают значительные площади обрабатываемых земель сельскохозяйственного назначения и дикорастущая флора. Однако вопросы, касающиеся механизмов адаптации растений к действию электромагнитного излучения ЛЭП, остаются все еще недостаточно изученными [Плеханов, 1994; Шакирова, 2001].

Целью данной работы являлось изучение влияния электромагнитного излучения ЛЭП на функциональную активность компонентов протеиназно-ингибиторной системы и лектинов в растениях культурной и дикорастущей флоры Беларуси.

Объекты и методы исследований. Объектами исследований являлись озимая пшеница и дикорастущие виды растений (осина обыкновенная, золотарник канадский, сныть обыкновенная и бодяк полевой). Для оценки влияния электромагнитного излучения на биохимические показатели растений были заложены ключевые участки с пятью пробными площадками (ПП): под и вблизи высоковольтных ЛЭП (330 кВ). ПП размером 10 м² прямоугольной конфигурации представляли собой однородные по почвенным и гидрологическим условиям участки. Первая опытная ПП располагалась непосредственно под высоковольтной линией электропередач, граница которой определялась с помощью измерителя напряженности электрического поля ВЕ-50 (в кВ/м), на регистрируемой высоте 50 см от поверхности почвы; вторая – на расстоянии 15 м от кабеля ЛЭП и параллельно ему; третья (контроль, или фоновая напряженность электромагнитного поля) – на расстоянии 90 м от ЛЭП. По вариантам опыта отбирали по 10 образцов растений каждого вида.

Активность белков-ингибиторов трипсина определяли по уменьшению скорости гидролиза субстрата ферментом в присутствии белков-ингибиторов [Гофман, Вайсблай, 1975]. Активность нейтральных протеиназ определяли по методу Ансона [Anson, 1938]. Активность БАПАазы определяли по методу Эрлангера [Erlanger, 1961]. Активность эндогенных лектинов определяли с помощью реакции агглютинации эритроцитов кролика посредством микротитрования на иммунологических планшетах с U-образными лунками [Бабоша, Ладыгина, 1992]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Excel.

Результаты исследований. Показано, что в условиях действия электромагнитного излучения ЛЭП в исследуемых растениях наблюдались несколько типов ответных реакций. Так, у растений озимой пшеницы увеличение напряженности электромагнитного излучения ЛЭП по сравнению с фоновым вызывало угнетение роста и развития уже в фазе кущения (таблица).

Таблица.

Влияние электромагнитного излучения ЛЭП на морфометрические показатели растений озимой пшеницы в фазе кущения

Варианты опыта	Высота растения, мм	% к контролю	Зеленая масса надземной части одного растения, г	% к контролю	% абс. сух. массы
Контроль (0,015 кВ/м)	411,0±8,7	100	7,19±1,81	100	22,09
1 кВ/м	364,0±26,7	88,6	5,57±1,37	77,5	21,99
2 кВ/м	352,5±27,2	85,7	5,29±1,97	73,6	21,01

Так, согласно данным таблицы, высота растений снижалась по отношению к контролю при напряженности электромагнитного излучения 1 кВ/м на 11,4%, а при напряженности 2 кВ/м – на 14,3%. Показатель зеленой массы также снижался до 26,4% при напряженности электромагнитного излучения ЛЭП, равной 2 кВ/м. Было отмечено также, что повышение напряженности электромагнитного излучения способствовало в растениях озимой пшеницы активации гидролитических ферментов – нейтральных протеиназ на 13% и на 50% в фазе кущения и в фазе трубкования, соответственно. Повышение активности щелочной протеазы БАПАазы составляло 35%. Кроме того, у пшеницы в фазе кущения имело место временное ингибирование активности лектинов в листьях более чем на 20%, однако к фазе трубкования наблюдалось нивелирование различий по мере отдаления от источника излучения. На фоне отмеченных биохимических изменений масса зерна с одного растения озимой пшеницы при напряжении электромагнитного излучения ЛЭП, равном 2 кВ/м, снижалась на 8,3%, что вызывало в среднем и снижение урожайности до 8%.

Показано также, что в листьях осины и сныти в ответ на воздействие ЛЭП напряжением 110 кВ наблюдалось повышение активности нейтральных протеаз на 88,5 и 87%, соответственно, а при повышении напряжения ЛЭП до 330 кВ в 3 раза. У этих же растений при 330 кВ наблюдалось повышение активности щелочной протеазы БАПАазы в 3 и 2,2 раза соответственно. Результаты исследований позволили установить повышение активности ингибиторов трипсина в листьях осины, соответственно на 23,4 и на 33,5% по отношению к контролю при возрастании напряженности поля под ЛЭП. В листьях сныти, бодяка полевого и золотарника канадского более интенсивное излучение повышало активность ингибиторов трипсина соответственно на 18,4, 12,7 и 15%.

По показателю активности лектинов было отмечено либо ингибирование их активности у осины и сныти на 30 и 60%, соответственно, либо стимуляция активности данных белков до 30% (золотарник канадский).

Полученные данные свидетельствуют о видоспецифичности адаптивных процессов у растений при действии электромагнитного излучения ЛЭП. Показано, что система протеолиза и лектины вовлечены в процессы адаптации исследованных видов к действию электромагнитного излучения ЛЭП. Повышение напряженности электромагнитного излучения ЛЭП вызывает у отдельных представителей культурной и дикорастущей флоры стресс-индуцированные изменения активности компонентов системы протеолиза и лектинов, что оказывает негативное влияние на отдельные параметры роста и развития.

Литература

Бабоша А.В., Ладыгина М.Е. Определение фитогемагглютининов в связи с вирусоустойчивостью картофеля // Физиолого-биохимические и биофизические методы диагностики степени устойчивости растений к патогенам и другим факторам / Под ред. Ладыгиной М.Е. – Москва: МГУ, 1992. – С. 43–52.

Гофман Ю.Я., Вайсблай И.М. Определение активности ингибиторов трипсина в семенах гороха // Прикладная биохимия и микробиология. – 1975. – Т. 11, вып. 5. – С. 777–787.

Новицкий Ю.И. Параметрические и физиологические аспекты действия постоянного магнитного поля на растения // Дис. ...докт. биол. наук, М., 1984. – 443 с.

Плеханов Г.Ф. Основные закономерности низкочастотной электромагнитобиологии. – Томск: Изд-во Томского ун-та, 1994. – 184 с.

Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.

Anson M.Z. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Genet. Physiol. – 1938. – V. 22, No. 1. – P. 79–89.

Erlanger F., Kokowsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. and Biophys. – 1961. – V. 96. – P. 271–278.

THE ROLE OF PROTEOLYSIS SYSTEM AND LECTINS IN THE MECHANISMS OF ADAPTATION OF CULTURAL AND WILD PLANT TO THE ACTION OF ELECTROMAGNETIC RADIATION OF POWER LINES

V.I. Domash, O.L. Kandelinskaya, O.A. Ivanov, E.R. Grischenko, T.P. Sharpio, S.A. Zabreiko

V.F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of NAS of Belarus, Minsk, Belarus, valdomash@mail.ru

Abstract. The depressing effect of electromagnetic radiation from power lines on morphometric and biochemical indicators of winter wheat and wild plant species has been established. Levelling of the inhibitory effect of power lines was observed as far away from the radiation source. The role of components of proteolysis system and lectins in plant adaptation to stress was noted.

Keywords: *electromagnetic radiation, winter wheat, wild plants, adaptation*

ДЕЙСТВИЕ СЛАБОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ЭНДОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАТАЛАЗЫ И ПЕРОКСИДАЗЫ МИКРОМИЦЕТОВ – АКТИВНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Д.А. Ключев, И.О. Макаров, Н.В. Дикарева

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования национальной исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия, biodeg@mail.ru

Аннотация. Отмечено, что воздействие слабого магнитного поля и низкоинтенсивного лазерного излучения на активность эндоцеллюлярных каталазы и пероксидазы неоднозначно и имеет дозозависимый характер. Не выявлено какой-либо прямой или обратной зависимости эффекта воздействия от интенсивности применяемого фактора.

Ключевые слова: мицелиальные грибы, низкочастотное импульсное магнитное поле, низкоинтенсивное лазерное излучение, каталаза, пероксидаза

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1055-1056

Микромицеты известны как организмы, обладающие системами высокоактивных окислительных, гидролитических и других ферментов, осуществляющих разнообразные химические превращения сложных субстратов, часто труднодоступных или недоступных многим другим микроорганизмам [Leja, Lewandowicz, 2010]. В связи с этим весьма актуальными становятся исследования, рассматривающие как те или иные факторы влияют на активность этих систем и, следовательно, способность микромицет к биодegradации различных субстратов. В качестве исследуемых факторов, как одни из наиболее используемых и представляющих научный интерес, были выбраны низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) и слабое магнитное поле (МП) [Тгеу, Lamøy, 2016., Долгова, Абакумова, 2014]. В качестве объектов исследования выбраны характерные представители деструкторов полимерных материалов – *Alternaria alternata*, *Penicillium cyclopium* и *Aspergillus niger*. В ходе исследования рассматривалось воздействие данных факторов на активность ряда эндооксидоредуктаз – каталазы и пероксидазы.

Для создания МП использовали источник VL 2 (пачки по 20 импульсов длительностью 227 мкс с амплитудой магнитной индукции 1.5 мТл, следующие с частотой 15 Гц). В качестве источника НИЛИ использовался многомодовый полупроводниковый InGaP/GaAs/InGaAs лазер полоскового типа, изготовленный в НИФТИ ННГУ. Режим работы лазера непрерывный, длина волны генерации 980 нм. Изучалось воздействие лазера на двух показателях мощности – 0.3 Вт и 0.7 Вт.

Показано, что оба фактора имеют дозозависимый эффект, при этом сила воздействия и изменение активности ферментов не имеют прямой или обратной зависимости. Также отмечено, что эффект действия исследуемого фактора зависит от вида грибов, что, по всей видимости, связано с их физиолого-биохимическими особенностями, позволяющими по-разному реагировать на МП и НИЛИ. Активность каталазы *A. niger* при воздействии МП возрастала при всех вариантах, воздействие НИЛИ показало снижение активности при 0,3 Вт, 5 мин и 0.3 Вт, 10 мин, при этом стоит отметить, что при максимальной мощности и времени воздействия НИЛИ активность каталазы по сравнению с контролем не изменялась. Активность пероксидазы при воздействии МП осталась на уровне контроля во всех вариантах опыта, за исключением воздействия длительностью 90 мин, при котором наблюдалось

снижение активности на величину порядка 20%. Активность пероксидазы при воздействии НИЛИ возрастала при всех вариантах воздействия, кроме 0,3 Вт, 10 мин.

Активность каталазы *P. cyclopium* при воздействии МП возросла при всех вариантах опыта, достигая пика при воздействии в течение 150 мин. Стоит отметить, что активность пероксидазы, напротив, снижалась при всех вариантах воздействия. НИЛИ оказало ингибирующий эффект во всех вариантах воздействия как на активность каталазы *P. cyclopium*, достигая наименьшего значения при 0,3 Вт, 10 мин, так и на активность пероксидазы, достигая наименьшего значения при 0,3 Вт, 5 мин.

Показано, что воздействие МП на *A. alternata* не вызвало значительных изменений в активности обоих ферментов. Незначительное ингибирование активности каталазы вызвало воздействие длительностью 150 мин. Воздействие НИЛИ на объект показало значительный рост активности каталазы при всех вариантах опыта, при этом активность пероксидазы также возросла при всех вариантах воздействия, кроме наиболее сильного, в котором активность осталась на сравнимом с контролем уровне.

Литература

Долгова Д.Р., Абакумова Т.В., Фомина А.В., Воронова О.С. Функциональное состояние *Saccharomyces cerevisiae* после фемтосекундного лазерного излучения // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2014. – № 2. – С. 58–61.

Leja K., Lewandowicz G. Polymer biodegradation and biodegradable polymers – a review // Polish J. of Environ. Stud. – 2010. – V. 19, No. 2. – P. 255–266.

Treu A., Larnøy E. Impact of a low pulsed electric field on the fungal degradation of wood in laboratory trials // Int. Biodet. Biodeg. – 2006. – V. 114. – P. 244–251.

EFFECT OF WEAK MAGNETIC FIELD AND LOW LEVEL LASER RADIATION ON ENDOCELULAR CATALASE AND PEROXIDASE ACTIVITY OF FUNGI – ACTIVE DESTRUCTORS OF POLYMERIC MATERIALS

D.A. Kluev, I.O. Makarov, N.V. Dikareva

National Research University Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhniy Novgorod, Russia, *biodeg@mail.ru*

Abstract. It was reported that weak magnetic field and low level laser radiation causes ambiguous effect that is dose dependent. It was shown that factors intensity and the effect of researched factors do not correlate directly.

Keywords: *fungi; weak low-frequency pulsed magnetic field; low-level laser radiation; catalase; peroxidase*

ДЕЙСТВИЕ СЛАБОГО НИЗКОЧАСТОТНОГО ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РОСТ И АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ МИКРОМИЦЕТОВ – АКТИВНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Д.А. Ключев, И.О. Макаров, В.Ф. Смирнов, О.Н. Смирнова, Н.А. Аникина, Е.А. Захарова, А.А. Яковлева

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им.Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия, biodeg@mail.ru

Аннотация. Показано, что слабое низкочастотное импульсное магнитное поле и низкоинтенсивное лазерное излучение неоднозначно влияют на рост и активность оксидоредуктаз микромицетов - активных биодеградантов полимерных материалов. Отмечен дозозависимый эффект данных факторов на активность каталазы и пероксидазы грибов. Показано, что слабое низкочастотное импульсное магнитное поле и низкоинтенсивное лазерное излучение неоднозначно влияют на рост и активность оксидоредуктаз микромицетов - активных биодеградантов полимерных материалов. Отмечен дозозависимый эффект данных факторов на активность каталазы и пероксидазы грибов.

Ключевые слова: мицелиальные грибы, низкочастотное импульсное магнитное поле, низкоинтенсивное лазерное излучение, каталаза, пероксидаза

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1057-1058

Известно, что микроскопические грибы обладают системами высокоактивных ферментов, осуществляющих разнообразные химические превращения сложных субстратов различного происхождения [Leja, Lewandowicz, 2010; Lugauskas et al., 2003]. Исследования, связанные с повышением деструктивной активности грибов, особенно актуальны при разработке технологий, связанных с утилизацией промышленных отходов и загрязнений. Напротив, подавление деструктивной активности микромицетов очень важно в плане предотвращения процессов биоповреждений промышленных материалов. В связи с этим, важное значение придается воздействию различных факторов (химических, физических), способных регулировать деструктивную активность грибов. В последнее время в качестве таких факторов используются низкоинтенсивное электромагнитное излучение [Треу, Lamøy, 2016; Треу et al., 2014]. В связи с этим нами исследовалось действие электромагнитного излучения в виде слабого импульсного магнитного поля (ИМП) и низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) на рост и активность экзооксидоредуктаз (каталазы, пероксидазы) ряда мицелиальных грибов – деструкторов промышленных материалов. Объектами исследования являлись микроскопические грибы, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов: *Penicillium cyclopium*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*. Для создания слабого низкочастотного ИМП использовали источник VL 2 (пачки по 20 импульсов длительностью 227 мкс с амплитудой магнитной индукции 1.5 мТл, следующие с частотой 15 Гц). Для создания поля применялся генератор фирмы “Electro-Biology Inc”. Время экспозиции – 30, 90, 150 и 210 мин. В качестве источника НИЛИ использовался многомодовый полупроводниковый InGaP/GaAs/InGaAs лазер полоскового типа, изготовленный в НИФТИ ННГУ. Режим работы лазера непрерывный, длина волны генерации 980 нм. Изучалось воздействие лазера на двух показателях мощности – 0.3 Вт и 0.7 Вт. Время экспозиции – 5 и 10 мин. Установлено, что исследованные факторы по-разному действуют на споры и вегетативный мицелий грибов. Так под воздействием НИЛИ в ряде случаев имел место ингибирующий эффект

на линейную скорость роста (воздействие на споры) *A. niger* (0.3 Вт, 5 мин; 0.3 Вт, 10 мин; 0.7 Вт, 5 мин) и *P. cyclopium* (0.3 Вт, 5 мин; 0.7 Вт, 10 мин). При этом накопление биомассы (воздействие на мицелий) *A. niger* снижалось только при воздействии 0.3 Вт, 5 мин и 0.7 Вт, 10 мин; а *P. cyclopium* – при 0.7 Вт, 10 мин. У *Alt. alternata* практически не наблюдалось изменений скорости роста, но имело место снижение накопления биомассы при всех вариантах воздействия. Действие ИМП приводило к незначительному ингибированию линейной скорости роста грибов *A. niger* и *Alt. alternata*, при этом имело неоднозначный эффект на прирост их биомассы. Для гриба *P. cyclopium* наблюдалось увеличение линейной скорости роста при экспозиции 90 и 150 мин, но имело место снижение прироста биомассы относительно контроля во всех вариантах опыта. Неоднозначный эффект данные физические факторы оказывали и на активность экзооксидоредуктаз грибов. Так, ИМП практически не оказывало влияние на активность каталазы и пероксидазы *A. niger*, а под воздействием НИЛИ активность пероксидазы *A. niger* и *Alt. alternata* ингибировалась во всех вариантах опыта. В ряде случаев отмечен дозависимый эффект: с увеличением мощности и времени воздействия НИЛИ активность каталазы *P. cyclopium* снижалась и возрастала у *A. niger*, а с увеличением времени воздействия ИМП активность каталазы увеличивалась у *Alt. alternata* и снижалась у *P. cyclopium*, активность пероксидазы *P. cyclopium* увеличивалась. Неоднозначность результатов может быть связана как с природой и интенсивностью воздействия исследованных физических факторов, так и физиолого-биохимическими особенностями данных микромицет.

Литература

Leja K., Lewandowicz G. Polymer biodegradation and biodegradable polymers – a review // Polish J. of Environ. Stud. – 2010. – V. 19, No. 2. – P. 255–266.

Lugauskas A., Levinskaitė L., Pečiulytė D. Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2003. – V. 52. – P. 233–242.

Treu A., Bardage S., Johansson M., Trey S. Fungal durability of polyaniline modified wood and the impact of a low pulsed electric field // Int. Biodet. Biodeg. – 2014. – V. 87. – P. 26–33.

Treu A., Larnøy E. Impact of a low pulsed electric field on the fungal degradation of wood in laboratory trials // Int. Biodet. Biodeg. – 2016. – V. 114. – P. 244–251.

EFFECT OF WEAK LOW-FREQUENCY PULSED MAGNETIC FIELD AND LOW LEVEL LASER RADIATION ON GROWTH AND OXIDOREDUCTASE ACTIVITY OF FUNGI – ACTIVE DESTRUCTORS OF POLYMERIC MATERIALS

D.A. Kluev, I.O. Makarov, V.F. Smirnov, O.N. Smirnova, N.A. Anikina, E.A. Zakharova, A.A. Iakovleva

National Research University Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhniy Novgorod, Russia, biodeg@mail.ru

Abstract. It was shown that weak low-frequency pulsed magnetic field and low-level laser radiation has ambiguous effect on growth and oxidoreductase activity of fungi – active destructors of polymeric materials. Dose-rate dependence of these factors towards fungal catalase and peroxidase was noticed.

Keywords: *fungi, weak low-frequency pulsed magnetic field, low-level laser radiation, catalase, peroxidase*

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСОВ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА, ОКСИДА КРЕМНИЯ И МОЛИБДЕНА С ГУМИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ В ТЕСТЕ *TRITICUM AESTIVUM* И *HORDÉUM VULGÁRE*

А.М. Короткова, И.А. Гавриш, Л.В. Галактионова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», Оренбург, Россия, anastasiaporv@mail.ru

Аннотация. Хотя некоторые авторы уже оценили влияние ряда нанометаллов в присутствии гуминовых кислот на микроорганизмы, водоросли, рыб, последствия взаимодействия между гуминовыми кислотами и растительными организмами по-прежнему остаются не вполне ясными. В работе мы исследовали морфо-физиологические изменения двух видов *Triticum aestivum* и *Hordéum vulgáre* при воздействии коммерческих гуминовых кислот с нанодисперсными частицами металлов (Fe_3O_4 , Mo, SiO_2). Улучшение прорастания семян обоих видов растений (*Triticum aestivum* и *Hordéum vulgáre*) отмечалось после обработки 10^{-4} мг/л НЧ SiO_2 – на 14% и 20%, соответственно. Напротив, уменьшение прорастания зафиксировано после воздействия 5×10^{-2} мг/л Fe_3O_4 – на 13% в случае с *Triticum aestivum* и на 32% (к контролю) для растений *Hordéum vulgáre*. В целом растения *Hordéum vulgáre* были менее чувствительны к воздействию НЧ Mo и Fe_3O_4 в отличие от *Triticum aestivum*. Наблюдали увеличение массы корней *Triticum aestivum* по сравнению с растениями после обработки гуминовыми кислотами при воздействии 10^{-4} мг/л SiO_2 , 10^{-3} мг/л Mo и 10^{-2} мг/л Fe_3O_4 . Вероятно, стимулирующий эффект нано-кремнезема SiO_2 в разведении 10^{-4} мг/л обусловлен обогащением наночастиц рядом разветвленных функциональных групп гуминовых и фульвовых кислот, содержащихся в препарате биогумуса.

Ключевые слова: наночастицы, магнетит, оксид кремния, молибден, гуминовые кислоты

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1059-1062

Введение. Типичные коллоидные дисперсии наночастиц металлов (НЧМ) могут включать металлические частицы, свободные ионы металлов (включая любые растворимые комплексы) и поверхностно-адсорбированные ионы металлов, оказывающих значительное влияние на биораспределение и количество биодоступного металла [Liu, Hurt, 2010]. Свободные ионы металлов имеют сильную тенденцию связываться с отрицательно заряженными ионами для достижения устойчивого состояния. В природной воде можно найти пять анионных неорганических связующих, а именно F^- , Cl^- , SO_4^{2-} , OH^- и CO_3^{2-} . НЧ металлов и/или высвобожденные ионы металлов также могут сильно связываться с гуминовыми веществами, такими как гуминовые кислоты (ГК), которые считаются доминирующими комплексообразователями в природной воде [Luoma, 2008]. Поэтому ГК играют важную роль в транспорте, стабильности, растворении, биодоступности и осаждении ксенобиотиков в организмах [Gao et al., 2012].

Хотя некоторые авторы уже оценили влияние ряда нанометаллов в присутствии ГК на микроорганизмы [Gunsolus et al., 2015], водоросли [Akhil, Khan, 2017], рыб [Ong et al., 2017], последствия взаимодействия между ГК и растительными организмами по-прежнему остаются не вполне ясными. Встречаются единичные работы по оценке степени снижения фитотоксичности НЧМ в комплексе с ГК на примере Ag [Li et al., 2018], но не было исследований по увеличению в подобных условиях стимулирующих свойств НЧМ. Стоит учесть, что физико-химические характеристики каждого типа этих материалов и условия эксперимента могут вызывать различные биологические реакции у различных видов растений.

В этом контексте целью исследования послужило расширение существующих знаний о механизмах воздействия различных комбинаций коммерческих ГК с нанодисперсными частицами металлов (Fe_3O_4 , Mo, SiO_2) на растительные организмы, используя с позиции морфо-физиологических изменений двух видов *Triticum aestivum* и *Hordéum vulgáre*.

Материалы и методы. В исследованиях использовали НЧ SiO_2 (размером 25-30 нм), Mo (100-120 нм), произведенные в компании «Плазмотерм» (Россия, г. Москва), а также НЧ Fe_3O_4 (80-100 нм) производства «Передовые порошковые технологии» (Россия, г. Томск). Для приготовления растворов НЧМ брали точные навески препаратов, помещали в стеклянные колбы с отстоянной водопроводной водой и интенсивно диспергировали ультразвуком с частотой 35 кГц в течение 30 мин.

Растворы НЧМ заданной концентрации служили растворителем концентрированного препарата биогумус «Биоэра-Пенза» (Россия, г. Пенза). Разведение раствора биогумуса осуществляли согласно инструкции препарата (далее по тексту рабочий раствор БГ). Далее данной смесью (НЧМ+БГ) проводили предпосевную обработку семян пшеницы (*Triticum aestivum*) сорта «Учитель» и ячменя (*Hordéum vulgáre*) сорта «Оренбургский 4» путем предварительного замачивания на 10-15 мин в растворах БГ с разной концентрацией НЧМ. Контролем служили семена без предварительной обработки. Общая схема обработки растений представлена в таблице 1.

Таблица 1.

Схема эксперимента на растениях *Triticum aestivum* и *Hordéum vulgáre*

Вариант обработки растений		
Контроль – дистиллированная вода		
БГ+НЧ SiO_2		
$2 \cdot 10^{-3}$ мг/л	10^{-3} мг/л	10^{-4} мг/л
БГ+НЧ Fe_3O_4		
$2 \cdot 10^{-3}$ мг/л	10^{-3} мг/л	10^{-4} мг/л
БГ+НЧ Mo		
$5 \cdot 10^{-2}$ мг/л	10^{-2} мг/л	10^{-3} мг/л

Проращивание проводили на стерильной чашке Петри с увлажненным стерильным бинтом, куда раскладывали равномерно семена, обрабатывали смесью НЧМ+БГ, чашки прикрывали и помещали в термостат с постоянной температурой (+26 °С). Подсчет нормально проросших семян проводили ежедневно, энергию прорастания семян подсчитывали через 3 суток, а всхожесть и ростовые параметры на 7 сутки. Повторность 3-6 кратная, в каждую чашку Петри помещали по 10 семян культуры.

Результаты и их обсуждение. Результаты подсчета энергии прорастания семян *Triticum aestivum* и *Hordéum vulgáre* показали различную чувствительность как к виду НЧМ, так и их концентрациям. Достоверное (по сравнению с контролем) улучшение прорастания семян обоих видов растений (*Triticum aestivum* и *Hordéum vulgáre*) отмечалось после обработки минимальной концентрацией 10^{-4} мг/л НЧ SiO_2 – на 14% и 20%, соответственно (табл. 2).

Напротив, уменьшение прорастания зафиксировано после воздействия $5 \cdot 10^{-2}$ мг/л Fe_3O_4 – на 13% (по сравнению с контролем) – в случае с *Triticum aestivum* и на 32% (к контролю) и на 50% (относительно растений после обработки БГ) – для растений *Hordéum vulgáre*.

В целом остается отметить, что растения *Hordéum vulgáre* были менее чувствительны к воздействию НЧ Mo и Fe_3O_4 , в отличие от *Triticum aestivum*. Это объясняется различием в пораженности семян по сравнению с растениями,

обработанными БГ. Так, показатель для *Triticum aestivum* доходил до 50%, что на 32% выше значений *Hordéum vulgáre* (до 34% к растениям после обработки БГ).

Что касается биомассы растений, то стоит отметить достоверное увеличение массы корней *Triticum aestivum* по сравнению с растениями после обработки БГ при воздействии 10^{-4} мг/л SiO_2 (%), 10^{-3} мг/л Mo (%) и 10^{-2} мг/л Fe_3O_4 (%). Одновременно с этим для растений *Hordéum vulgáre* зарегистрировано повышение массы корня в случае с 10^{-2} мг/л Fe_3O_4 – до 70% (по сравнению с контрольными растениями и теми, что обработаны БГ).

Вероятно, стимулирующий эффект нано-кремнезема SiO_2 в разведении 10^{-4} мг/л обусловлен обогащением НЧМ рядом разветвленных функциональных групп ГК и ФК, содержащихся в препарате БГ. Эти особенности строения, вероятно, обуславливают высокую протекторную функцию ГК и аддитивный эффект с проявлениями НЧМ [Gunsolus et al., 2015]. Более этого, отдельно НЧ SiO_2 не токсичны для растений [Slomberg and Schoenfisch, 2012]. Не исключена также седиментация золей на поверхности корней растений, имеющих низкую биодоступность [Judy et al., 2012], и соответственно токсичность. В последней работе Asgarí с коллегами [2018] НЧ SiO_2 агрегировали на клеточных стенках корней и листьев растений. Напротив, действие Fe_3O_4 , вероятно, обусловлено эффектами выделяемых из металлов ионов, проникающих в растения с более высокой скоростью и проявление негативных последствий подобного воздействия.

Таблица 2.

Влияние смеси НЧМ и БГ на показатели прорастания семян *Triticum aestivum* и *Hordéum vulgáre*

Концентрации НЧМ, мг/л	<i>Triticum aestivum</i>			<i>Hordéum vulgáre</i>			
	Е	Всх.	Пораж.	Е	Всх.	Пораж.	
H_2O	86,7±3,3	76,7±3,3	15,3±2,89	53,3±16,7	56,7±17,6	55,2±12,1	
БГ	73,3±12,0	76,7±8,8	26,7±8,82	60,3±5,77	63,3±3,33	62,4±2,35	
БГ+ Fe_3O_4	$5 \cdot 10^{-2}$	76,7±3,3 ^a	76,7±3,6	10,0±5,7 ^b	46,7±6,6 ^{a b}	60,5±10	45,3±1,9 ^{a b}
	10^{-2}	80,0±11,5	80,0±11,5	19,0±0,58 ^a	60,3±5,6	66,7±3,3	54,3±4,1
	10^{-3}	80,0±5,7	83,3±3,3	23,3±3,3 ^a	40,3±11,5 ^{a b}	46,7±13,3 ^{a b}	49,6±5,7 ^b
БГ+ SiO_2	$2 \cdot 10^{-3}$	83,3±3,3	78,3±0,8	21,7±9,3 ^a	47,4±2,4	55,3±5,5	56,9±4,6
	10^{-3}	83,3±12,0	80,0±5,7	33,3±17,6 ^a	43,3±3,3 ^{a b}	60,3±10,4	56,7±8,8
	10^{-4}	99,0±0,6 ^b	90,0±8,1 ^{a b}	27,0±1,1 ^a	70,6±1,3	70,4±5,7 ^a	36,7±8,8 ^{a b}
БГ+ Mo	$2 \cdot 10^{-3}$	88,7±0,8	76,7±8,8	13,3±8,8 ^b	60,1±4,7	69,7±6,7	50,2±5,1
	10^{-3}	86,7±3,3	84,7±2,3	28,7±0,8 ^a	60,5±11,5 ^a	73,3±8,8 ^a	46,7±6,6 ^b
	10^{-4}	85,7±3,5	83,3±6,6	16,7±3,3 ^{a b}	46,7±8,8 ^b	63,3±3,3	43,5±7,9 ^b

Примечание: Е – энергия прорастания семян, %; Всх. – всхожесть, %; Пораж. – степень пораженности, %; достоверные значения: а (сравнение с водой) и б (сравнение с БГ).

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что растения *Triticum aestivum* и *Hordéum vulgáre* по-разному реагируют на внесение в среду комплекса нанометаллов с БГ, демонстрируя увеличение чувствительности к наночастицам металлов в ряду: $\text{SiO}_2 \rightarrow \text{Mo} \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4$. Несмотря на неоднозначные результаты взаимного влияния нанодисперсных металлов с компонентами БГ на растения, остается много вопросов, требующих детализации метаболических реакций на молекулярном и клеточном уровнях организации.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность за финансовую поддержку Российскому Фонду Фундаментальных Исследований (Проект РФФИ № 18-316-00116) и за предоставление инструментальной базы Федеральному научному центру биологических систем и агротехнологий РАН (г. Оренбург).

Литература

Akhil K., Khan S.S. Effect of humic acid on the toxicity of bare and capped ZnO nanoparticles on bacteria, algal and crustacean systems // *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*. – 2017. – V. 167. – P. 136–149.

Asgari F., Majd A., Jonoubi P., Najafi F. Effects of silicon nanoparticles on molecular, chemical, structural and ultrastructural characteristics of oat (*Avena sativa* L.) // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2018. – V. 127. – P. 152–160.

Gao J., K. Powers, Y. Wang, H. Zhou, S.M. Roberts, B.M. Moudgil, B. Koopman, D.S. Barber. Influence of Suwannee river humic acid on particle properties and toxicity of silver nanoparticles // *Chemosphere*. – 2012. – V. 89. – P. 96–101.

Gunsolus I.L., Mousavi M.P.S., Hussein K., Bühlmann P., Haynes C.L. Effects of humic and fulvic acids on silver nanoparticle stability, dissolution, and toxicity // *Environmental Science and Technology*. – 2015. – No. 49. – P. 8078–8086.

Judy J.D., Unrine J.M., Rao W., Wirick S., Bertsch P.M. Bioavailability of gold nanomaterials to plants: importance of particle size and surface coating // *Environmental Science and Technology*. – 2012. – V. 46. – P. 8467–8474.

Li M., Dang F., Fu Q.-L., Zhou D.-M., Yin B. Effects of molecular weight-fractionated natural organic matter on the phytoavailability of silver nanoparticles // *Environmental Science: Nano*. – 2018. – No. 5. – P. 969–979.

Liu J., Hurt R. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental Science and Technology*. – 2010. – V. 44. – P. 2169–2175.

Luoma S.N. Silver nanotechnologies and the environment // *The Project on Emerging Nanotechnologies Report*. – 2008. – V. 15.

Ong K.J., Felix L.C., Boyle D., Ede J.D., Ma G., Veinot J.G.C., Goss G.G. Humic acid ameliorates nanoparticle-induced developmental toxicity in zebrafish // *Environmental Science: Nano*. – 2017. – V. 4, No. 1. – P. 127–137.

Slomberg D.L., Schoenfisch M.H. Silica nanoparticle phytotoxicity to *Arabidopsis thaliana* // *Environmental science & technology*. – 2012. – V. 46, No. 18. – P. 10247–10254.

EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF COMPLEXES OF MAGNETITE NANOPARTICLES, SILICON AND MOLYBDENUM OXIDE WITH HUMINIC ACIDS IN THE *TRITICUM AESTIVUM* AND *HORDÉUM VULGÁRE* TEST

A.M. Korotkova, I.A. Gavrish, L.V. Galaktionova

Federal State Budget Scientific Institution All-Russian Research Institute of Beef Cattle, Orenburg, Russia, anastasiaporv@mail.ru

Abstract. Although some authors have already estimated the influence of a number of nanometals in the presence of humic acids on microorganisms, algae, fish, the effects of interaction between humic acids and plant organisms are still not completely clear. In the work we investigated the morpho-physiological changes of the two species *Triticum aestivum* and *Hordéum vulgáre* under the influence of commercial humic acids with nanodispersed metal particles (Fe_3O_4 , Mo, SiO_2). Improvement of germination of seeds of both plant species (*Triticum aestivum* and *Hordéum vulgáre*) was noted after treatment with 10^{-4} mg/l NP SiO_2 – by 14% and 20%, respectively. In contrast, the decrease in germination was recorded after exposure to 5×10^{-2} mg/l of Fe_3O_4 – 13% in the case of *Triticum aestivum* and 32% (to control) for *Hordéum vulgáre* plants. In general, *Hordéum vulgáre* plants were less sensitive to the effects of Mo and Fe_3O_4 , in contrast to *Triticum aestivum*. Increase in the mass of roots of *Triticum aestivum* was observed in comparison with plants after treatment with humic acids when exposed to 10^{-4} mg/l SiO_2 , 10^{-3} mg/l Mo and 10^{-2} mg/l Fe_3O_4 . Probably, stimulating effect of nano-silica SiO_2 in the dilution of 10^{-4} mg/l is due to the enrichment of nanoparticles by a number of branched functional groups of humic and fulvic acids contained in the biohumus preparation.

Keywords: nanoparticles, magnetite, silicon oxide, molybdenum, humic acids

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МЕТАЛЛОВ НА РАСТЕНИЕ *LEMNA MINOR*

А.М. Короткова^{1,2}, Д.Б. Косян²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный университет», Оренбург, Россия, anastasiaporv@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», Оренбург, Россия, kosyan.diana@mail.ru

Аннотация. Все больше исследований исследователи посвящают наночастицам (НЧ) металлов и раскрытию механизмов их воздействия на водные растения, поскольку многие НЧ склонны проявлять большую токсичность в водной фазе. В своем исследовании мы использовали водное растение ряска малая (*Lemna minor* L.). Внесение в водную среду НЧ CeO₂ (1, 10 и 100 мг/л) от 7 до 30 дней способствовало небольшому ингибированию роста Ряски относительно контроля. Анализ активности редуктаз с помощью соли тетразолия продемонстрировал, что наиболее токсичными оказались 10 и 100 мг/л НЧ CeO₂, вызывающие снижение выхода формазана после 14 суток экспозиции на 27% и после 30 дней – на 31% по сравнению с контролем, соответственно. Текущее исследование подтвердило, что нано-CeO₂ не приводит к заметным метаболическим изменениям и токсическим эффектам в водной среде в отношении растений ряска.

Ключевые слова: наночастицы оксида церия, активные формы кислорода, ДНК, жизнеспособность клеток, ряска

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1063-1066

Введение. Все больше исследований в научном мировом сообществе посвящено наночастицам металлов (НЧМ) и раскрытию механизмов их воздействия на водные растения, поскольку многие НЧ склонны проявлять большую токсичность именно в водной фазе [Nowack et al., 2012]. С этой позиции очень мало известно о поведении НЧ диоксида церия CeO₂, широко используемых во многих областях [Giraldo et al., 2014]. Интерес к данному металлу-антиоксиданту вызван его способностью непосредственно вовлекаться в окислительно-восстановительный цикл и быстро изменять свою степень окисления (Ce³⁺ и Ce⁴⁺) [Cassee et al., 2011]. Несмотря на то, что была исследована острая токсичность и в целом подробно описаны биологические свойства НЧ CeO₂ для растений [Du et al., 2015; Zhao et al., 2015], их эффекты в водной среде до сих пор неизвестны и мало обсуждаются [Schwabe et al., 2013; Collin et al., 2014]. Очень мало работ, посвященных проблематике развития биологических эффектов НЧ оксида церия в водных растениях [Blinova et al., 2017]. Все это делает актуальным более детальное исследование механизмов воздействия НЧ CeO₂ на растительные организмы на клеточном и молекулярном уровнях.

Материалы и методы. В исследовании использовалось водное растение ряска малая (*Lemna minor* L.). Преимущества выбора Ряски в качестве тестового водного организма следующие: 1) макрофиты являются одним из основных автотрофов в экосистемах малых озер и рек; 2) высокая репродуктивная скорость, небольшой размер и легкость выращивания; 3) тест ингибирования роста с помощью *Lemna* sp. широко используется в экотоксикологических исследованиях наноматериалов [Li et al., 2013].

В работе были взяты НЧ CeO₂ диаметром 57±8 нм, изготовленные компанией «Advanced powder technologies LLC» (Россия). Для проведения исследования НЧМ диспергировали в течение 30 мин ультразвуком (f-35 кГц, N-300 Вт, A-10 мкА). Размер и зета-потенциал диспергированных в водных суспензиях НЧМ оценивали с помощью

лазерного автокорреляционного анализатора Photocor (Россия). Дзета-потенциал наночастиц в водных суспензиях составлял – $15,98 \pm 0,19$ мВ.

Растения выращивали в течение 3 суток в водной среде без металла, а затем добавляли НЧ CeO_2 в концентрации 1, 10 и 100 мг/л и обрабатывали в течение 7, 14 и 30 суток. Предварительными испытаниями выявлено, что концентрация 10 мг/л является пороговой или субтоксической, что соответствует паспорту безопасности оксида церия (https://www.carlroth.com/downloads/sdb/ru/7/SDB_7042_RU_RU.pdf). Для оценки биологического воздействия нано-церия брали среднюю пробу, которая состояла из листьев 3-х растений в трех биологических повторностях.

В конце эксперимента было подсчитано ингибирование роста по сравнению с контролем для каждой тестируемой концентрации НЧ CeO_2 , выраженное как % ингибирования роста (OECD Guideline fo Testing of Chemicals, №221, 2006) и подсчитана жизнеспособность (ЖС) клеток по изменению ферментативной активности редуктаз согласно протоколу производителя (WST-8 patent №2.251.850, Канада) с помощью высокочувствительного теста «Cell counting kit-8 (СКК-8)» («Sigma-Aldrich», США), основанного на использовании водорастворимой соли тетразолия (WST-8) [Castro-Concha et al., 2006]. Для проведения СКК-8-теста готовили клеточные суспензии – растирали листья 3 растений массой 40 мг в течение 10 мин в 120 мкл ФСБ, центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин. Далее отбирали 100 мкл супернатанта и смешивали с 10 мкл красителя СКК-8 в 96-луночном планшете. Полученные пробы инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. После этого каждые 15 мин проводили измерение ОП при $\lambda=450$ нм (WST-8 patent №2.251.850, Канада) с использованием микропланшетного ридера («Тесан», Австрия) в режиме встряхивания и обогрева до 37 °С. Количество ЖС клеток (в %) рассчитывали по формуле из соотношения ОП опытных проб (ОП_о) к значениям контрольных (ОП_к) за вычетом фонового поглощения реагентов набора (СКК8): $\text{ЖС} = ((\text{ОП}_о - \text{ОП}_к) / (\text{ОП}_к - \text{СКК8})) \cdot 100\%$.

Результаты и их обсуждение. Внесение в водную среду НЧ CeO_2 (1, 10 и 100 мг/л) от 7 до 30 дней способствовало небольшому ингибированию роста ряски относительно соответствующего контроля ($P \leq 0,05$), но значения не превышали 20%, независимо от времени воздействия и от морфологической части растения (рис. 1).

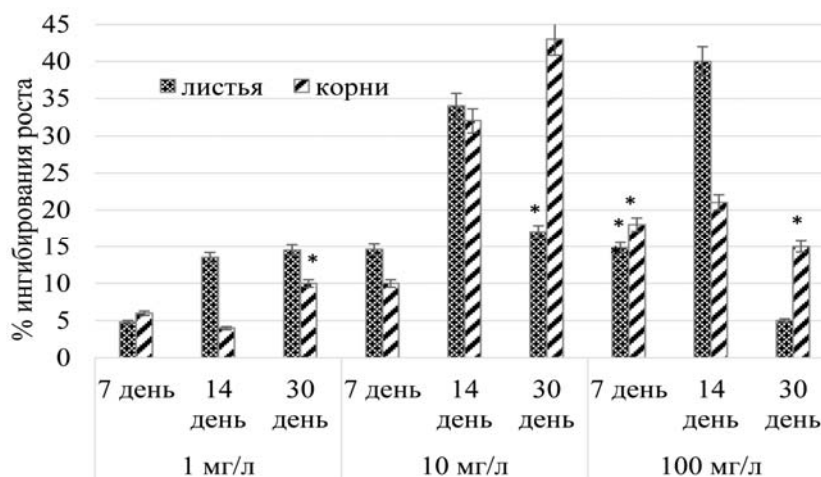


Рис. 1. Значения процента ингибирования роста (% от контроля) *L. minor* после воздействия НЧ CeO_2 (1, 10 и 100 мг/л), * вариант, достоверно отличающийся от контроля (значение $P \leq 0,05$).

Анализ активности редуктаз с помощью водорастворимой соли тетразолия продемонстрировал, что наиболее токсичными оказались 10 и 100 мг/л НЧ CeO_2 ,

вызывающие снижение выхода формазана после 14 суток экспозиции на 27% и после 30 дней – на 31% по сравнению с контролем, соответственно. Напротив, воздействие 1 мг/л НЧ CeO₂ привело к более плавному снижению ЖС (не более чем на 10% к контролю). Другими исследователями показана высокая устойчивость растений к нано-CeO₂ [Giraldo et al., 2014].

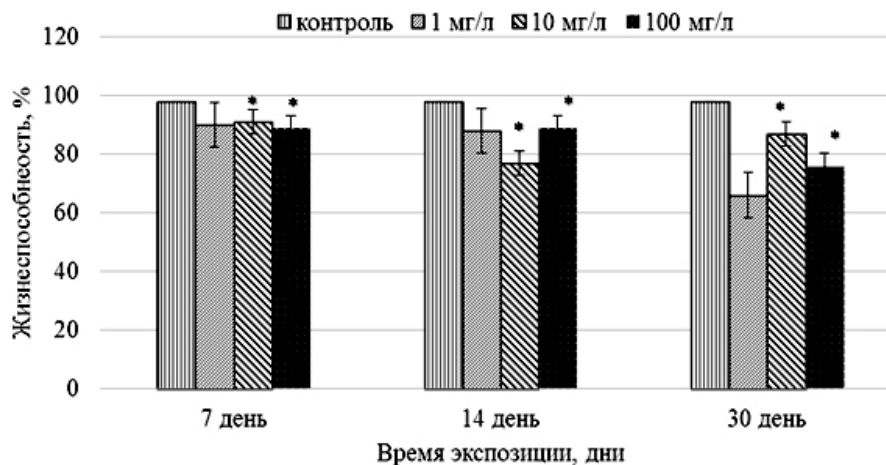


Рис. 2. Процент жизнеспособности *L. minor* после 7, 14 и 30 дней воздействия различных концентраций НЧ CeO₂: контроль=0 мг/л, 1 мг/л, 10 мг/л и 100 мг/л; вертикальный бар означает стандартное отклонение от среднего; *вариант, достоверно отличающийся от контроля (значение $P \leq 0,05$).

Текущее исследование подтвердило, что нано-CeO₂ не приводит к заметным метаболическим изменениям и токсическим эффектам в водной среде в отношении растений ряски.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Гранта РФФИ № 18-316-00116.

Литература

Blinova I., Kanarbik L., Irha N., Kahru A. Ecotoxicity of nanosized magnetite to crustacean *Daphnia magna* and duckweed *Lemna minor* // *Hydrobiologia*. – 2017. – V. 798. – P. 141–149.

Cassee F.R., van Balen E.C., Singh C., Green D., Muijser H., Weinstein J., Dreher K. Exposure, health and ecological effects review of engineered nanoscale cerium and cerium oxide associated with its use as a fuel additive // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2011. – V. 41 (3). – P. 213–229.

Collin B., Auffan M., Johnson A.C., Kaur I., Keller A.A., Lazareva A., Lead J.R., Ma X., Ruth C., Merrifield R.C., Svendsen C., White J.C., Unrine J.M. Environmental release, fate and ecotoxicological effects of manufactured ceria nanomaterials // *Environ. Sci. Nano*. – 2014. – V. 1. – P. 533.

Du W.C., Gardea-Torresdey J.L., Ji R., Yin Y., Zhu J.G., Peralta-Videa J.R., Guo H.Y. Physiological and biochemical changes imposed by CeO₂ nanoparticles on wheat: a life cycle field study // *Environ. Sci. Technol.* – 2015. – V. 49. – P. 11884–11893.

Giraldo J.P., Landry M.P., Faltermeier S.M. et al. Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing // *Nat. Mater.* – 2014. – V. 89. – P. 10–17.

Li L., Sillanpaa M., Tuominen M., Lounatmaa K., Schultz E. Behavior of titanium dioxide nanoparticles in *Lemna minor* growth test conditions // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2013. – V. 88. – P. 89–94.

Nowack B., Ranville J.F., Diamond S., Gallego-Urrea J.A., Metcalfe C., Rose J., Horne N., Koelmans A.A., Klaine S.J. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment // *Env. Toxic. Chem.* – 2012. – V. 31. – P. 50–59.

Schwabe F., Schulin R., Limbach L.K., Stark W., Bürge D., Nowack B. Influence of two types of organic matter on interaction of CeO₂ nanoparticles with plants in hydroponic culture // *Chemosphere.* – 2013. – V. 91. – P. 512–520.

Zhao L.J., Sun Y., Hernandez-Viezcas J.A., Hong J., Majumdar S., Niu G.H., Duarte-Gardea M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. Monitoring the environmental effects of CeO₂ and ZnO nanoparticles through the life cycle of corn (*Zea mays*) plants and in situ μ -XRF mapping of nutrients in kernels // *Environ. Sci. Technol.* – 2015. – V. 49. – P. 2921–2928.

BIOLOGICAL ASPECTS OF NANOSTRUCTURED METAL IMPACT ON THE *LEMNA MINOR* PLANT

A.M. Korotkova^{1,2}, D.B. Kosyan²

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Orenburg State University», Orenburg, Russia *anastasiaporv@mail.ru*

²Federal Scientific Center of Biological Systems and Agrotechnologies RAS, Orenburg, Russia, *kosyan.diana@mail.ru*

Abstract. More and more researches are devoted to nanoparticles (NP) of metals and the discovery of the mechanisms of their influence on aquatic plants, since many NPs tend to show more toxicity in the water phase. In our study, we used an aquatic plant of *Lemna minor* L. The introduction of NP CeO₂ (1, 10 and 100 mg/l) from 7 to 30 days in the aqueous medium promoted a slight inhibition of the growth of the Lemna relative to control. Analysis of reductase activity with the tetrazolium salt showed that 10 and 100 mg/l of NP CeO₂ proved to be the most toxic, causing a decrease in the yield of formazan after 14 days of exposure by 27% and after 30 days by 31% compared to the control, respectively. The current study confirmed that nano-CeO₂ does not lead to significant metabolic changes and toxic effects in the aquatic environment against duckweed plants.

Keywords: cerium oxide nanoparticles, active oxygen species, DNA, cell viability, duckweed

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА НАКОПЛЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ЛИСТВЕННЫМИ И ХВОЙНЫМИ ПОРОДАМИ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

И.С. Коротченко¹, Е.Я. Мучкина²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, Россия, *kisaspi@mail.ru*

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия, *muchkina@yandex.ru*

Аннотация. В настоящей статье приводятся данные о накоплении тяжелых металлов в почве, хвое сосны обыкновенной и листовых пластинках тополя бальзамического, вяза приземистого. Свинец, кадмий, цинк, медь интенсивно поглощаются лиственными и хвойными породами в условиях техногенного загрязнения городских территорий, что показано через коэффициенты биологического поглощения тяжелых металлов и биогеохимическую активность видов.

Ключевые слова: *тяжелые металлы, сосна, тополь, вяз, почвенный покров*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1067-1069

На урбанизированных территориях растительные организмы, в том числе и древесные виды, находятся под постоянным воздействием техногенных факторов: выбросов автотранспорта, теплоэлектростанций, промышленных предприятий. Среди крупных промышленных центров значительным химическим загрязнением атмосферного воздуха отличается город Красноярск, об этом свидетельствуют превышения ПДК по взвешенным веществам, тяжелым металлам, органическим соединениям. Загрязняющие вещества аккумулируются в почвенном покрове, в различных частях, тканях растений.

В древесных насаждениях городской среды наиболее часто встречаются сосна обыкновенная, тополь бальзамический, вяз приземистый, это характерно и для города Красноярска. Изучаемые растения широко распространены в условиях Сибири [Суворова, 2009; Степанов, 2006].

Для оценки степени накопления тяжелых металлов в ассимиляционных тканях растений проведены исследования по определению содержания тяжелых металлов в почвенном покрове, в хвое сосны обыкновенной и листовых пластинках тополя бальзамического, вяза приземистого.

Для исследования выбрана два участка городской территории, отличающиеся степенью антропогенной нагрузки (автотранспортная нагрузка, выбросы ТЭЦ). 1 – Центральная часть города (в районе Центрального парка), 2 – мкр. Академгородок в качестве селитебной зоны.

Определение концентрации элементов-токсикантов (тяжелые металлы): свинца, кадмия, меди, цинка проведено атомно-абсорбционным методом на анализаторе PinAAcle 900T. Вычисляли коэффициенты биологического поглощения (КБП) отдельных тяжелых металлов и биогеохимическую активность вида (БХА).

Исследуемые тяжелые металлы выявлены во всех образцах почв (табл. 1). Содержание валовых форм свинца, кадмия, меди и цинка в почве не превышает, либо находится на уровне ПДК.

Результаты исследования по аккумуляции тяжелых металлов в хвое сосны обыкновенной, листьях тополя и вяза по коэффициенту биологического поглощения и

биогеохимической активности представлены в таблицах 2, 3. Наибольшие из максимальных значений КБП зарегистрированы для свинца и кадмия, данный эффект был отмечен нами и для рекреационных зон г. Красноярска [Коротченко, Мучкина, 2017].

Таблица 1.
Среднее содержание валовых форм тяжелых металлов (мг/кг) в почвенном покрове г. Красноярска

Функциональные зоны города	Металл			
	Свинец	Кадмий	Медь	Цинк
Селитебная	3,9±0,01	0,3±0,02	63,2±1,53	86,2±1,72
Селитебная с высокой транспортной нагрузкой	31,9±0,91	0,7±0,01	33,5±3,61	79,7±4,23

Таблица 2.
Среднее содержание тяжелых металлов (мг/кг) в хвое сосны обыкновенной, листовых пластинок тополя бальзамического, вяза приземистого, произрастающих на территории г. Красноярска

Вид растения	Металл			
	Свинец	Кадмий	Медь	Цинк
Сосна обыкновенная	<u>2,66</u>	<u>0,03</u>	<u>2,72</u>	<u>1,53</u>
	2,01	0,02	4,90	1,29
Тополь бальзамический	<u>0,54</u>	<u>0,01</u>	<u>2,84</u>	<u>1,55</u>
	2,45	0,60	2,88	0,40
Вяз приземистый	<u>0,33</u>	<u>0,06</u>	<u>2,84</u>	<u>8,27</u>
	1,37	0,38	0,16	1,83

Примечание. Над чертой – значения для селитебной зоны, под чертой – селитебной зоны с высокой транспортной нагрузкой.

В наибольшей степени поглощение свинца отмечено в селитебной зоне хвоей сосны обыкновенной. Максимальное накопление кадмия, меди и цинка обнаружено в селитебной зоне с высокой транспортной нагрузкой.

Биогеохимическая активность исследуемых растений колебалась в пределах 0,22 – 1,02, наибольшее значение на участке, находящемся под воздействием автотранспорта.

Таблица 3.
Коэффициент биологического поглощения (КБП), биогеохимическая активность (БХА) сосны обыкновенной, тополя бальзамического, вяза приземистого, произрастающих на территории г. Красноярска

Функциональные зоны города	КБП				БХА
	Свинец	Кадмий	Медь	Цинк	
Сосна обыкновенная					
1	0,685	0,090	0,043	0,018	0,83
2	0,063	0,036	0,148	0,017	0,26
Тополь бальзамический					
1	0,139	0,019	0,045	0,018	0,22
2	0,077	0,856	0,086	0,005	1,02
Вяз приземистый					
1	0,085	0,203	0,045	0,096	0,43
2	0,043	0,547	0,005	0,023	0,61

Примечание. 1 – Селитебная зона; 2 – Селитебная с высокой транспортной нагрузкой зона.

Для тополя бальзамического выявлено более высокое значение БХА – в селитебной зоне с высокой транспортной нагрузкой, и наименьшее – в селитебной зоне.

В почвенном покрове, хвое сосны обыкновенной и в листьях тополя бальзамического, вяза приземистого в селитебных зонах г. Красноярска обнаружены элементы-токсиканты: свинец, кадмий, цинк, медь.

Для каждого из изученных видов растений по интенсивности поглощения тяжелых металлов располагаются в следующий последовательный ряд: Cd>Pb>Cu>Zn.

Литература

Коротченко И.С., Мучкина Е.Я. Тяжелые металлы в почвенном покрове и древесных растениях урбанизированной территории города Красноярска // Экология урбанизированных территорий. – 2017. – № 2. – С. 6–11.

Степанов Н.В. Флора северо-востока Западного Саяна и острова Отдыха на Енисее (г. Красноярск). – Красноярск: КГУ», 2006. – 170 с.

Суворова Г.Г. Фотосинтез хвойных растений в условиях Сибири. – Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2009. – 195 с.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF HEAVY METALS ACCUMULATION DECIDUOUS AND CONIFERS IN THE CONDITIONS OF TECHNOGENIC POLLUTION

I.S. Korotchenko¹, E.Y. Muchkina²

¹Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, Russia, kisaspi@mail.ru

²Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia, emuchkina@yandex.ru

Abstract. This article presents data on the accumulation of heavy metals in soil, pine needles and leaf plates of balsamic poplar, elm squat. Lead, cadmium, zinc, copper are intensively absorbed by deciduous and coniferous species in the conditions of technogenic pollution of urban areas, which is shown through the coefficients of biological absorption of heavy metals and biogeochemical activity of species.

Keywords: heavy metals, pine, poplar, elm, soil cover

АНАЛИЗ ДИНАМИКИ СОДЕРЖАНИЯ ТАНИНОВ И АКТИВНОСТЬ ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ТОПОЛЯ БАЛЬЗАМИЧЕСКОГО В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ СРЕДЫ

А.М. Кузьмина¹, И.Л. Бухарина², П.А. Кузьмин³, А.С. Фахрутдинова³

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ижевская государственная сельскохозяйственная академия», Ижевск, Россия, *AMSharifullina@yandex.ru*

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия, *buharin@udmlink.ru*

³Елабужский институт (филиал) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Елабуга, Россия, *petrkuzmin84@yandex.ru*

Аннотация. У тополя бальзамического в техногенной среде отмечено повышение активности полифенолоксидазы в листьях, особенно в примаргистральных насаждениях, что является следствием интенсивной техногенной нагрузки. В условиях техногенного стресса повышается содержание танинов в листьях, наиболее значимо к концу периода активной вегетации растений (августе).

Ключевые слова: активность полифенолоксидазы, танины, городские насаждения, *Populus balsamifera*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1070-1073

Актуальным является изучение комплексного воздействия антропогенных негативных факторов на растения, т.к. растительные организмы являются важнейшим средообразующим компонентом антропогенной среды, которые испытывают воздействие различных стрессов. Антиоксидантная система защиты растений выступает в роли важнейшего механизма устойчивости в условиях действия различного рода антропогенного стресса. Стрессовые факторы приводят к изменению функциональной активности антиоксидантных систем. В работах ученых из различных стран отмечается важная роль танинов и различных ферментов, в том числе и полифенолоксидазы, в защите растений от различных стрессов антропогенного происхождения [Bukharina et al., 2014; Ahmed, Anis, 2014; Li et al., 2014; Garcia et al., 2016].

Многие исследования указывают на взаимосвязь адаптивных возможностей растительного организма и содержание танинов, а также активность полифенолоксидазы [Гетко, 1989; Запрометов, 1996; Бухарина и др., 2014; Воскресенский, Воскресенская, 2011; Фуксман и др., 2005].

Целью нашей работы являлось изучение активности полифенолоксидазы и содержания конденсированных танинов в листьях тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.), произрастающего в насаждениях различных экологических категорий в крупном промышленном центре Среднего Поволжья – г. Набережные Челны.

Объект исследования тополь бальзамический (*Populus balsamifera* L.). Изучаемый вид произрастал в городе в составе насаждений различных экологических категорий г. Набережные Челны: магистральные посадки и санитарно-защитные зоны (СЗЗ) промышленных предприятий ОАО «КамАЗ». В качестве зон условного контроля (ЗУК) выбраны территории Челнинского участкового лесничества. Пробные площади (ПП) размером не менее 0.25 га закладывали регулярным способом (по 5 ПП в каждом насаждении). Оценка степени загрязнения атмосферного воздуха в местах

произрастания древесных растений проведена нами на основе материалов «Доклада об экологическом состоянии Республики Татарстан» за 2013-2016 гг. Комплексный индекс загрязнения атмосферы (ИЗА=15.3) характеризует состояние загрязнения атмосферного воздуха в городе, как очень высокое [Государственный..., 2016].

В пределах пробных площадей для изучения физиолого-биохимических показателей тополя бальзамического были проведены отбор, нумерация и оценка жизненного состояния не менее 10 особей каждого вида. Учетные особи имели хорошее жизненное состояние и средневозрастное генеративное онтогенетическое состояние (g_2). В период активной вегетации, т.е. в июне, июле и августе у учетных особей проводили отбор проб листьев срединной формации на годичном вегетативном побеге (с нижней трети участка кроны южной экспозиции). Листья срединной формации – типичные для растения листья, развивающиеся в средней зоне побега и выполняющие функцию фотосинтеза [Коровкин, 2007]. В магистральных насаждениях часть кроны южной экспозиции была обращена непосредственно к проезжей части проспекта. Отбор листьев проводили однократно и в один день во всех типах насаждений.

Активность полифенолоксидазы определяли спектрофотометрическим методом, основанном на измерении оптической плотности продуктов реакции, которые образуются при окислении пирокатехина за определенный промежуток времени [Ермаков и др., 1987]. Содержание конденсированных танинов в листьях древесных растений определяли трижды в течение вегетации (июнь, июль, август), используя перманганатометрический метод (метод Левенталья в модификации Курсанова). Определяли активность полифенолоксидазы и содержание конденсированных танинов в листьях растений в течение 2017 г.

Обработку материалов провели с применением статистического пакета «Statistica 5.5». Для интерпретации полученных материалов использовали методы описательной статистики и дисперсионный многофакторный анализ (при последующей оценке различий методом множественного сравнения LSD-test).

Дисперсионный многофакторный анализ результатов исследований в выявил достоверность влияния видовых особенностей (уровень значимости $P < 10^{-5}$), комплекса условий места произрастания ($P < 10^{-5}$), сроков вегетации ($P < 10^{-5}$), а также взаимодействия этих факторов ($P = 5.3 \cdot 10^{-5}$) на активность полифенолоксидазы в листьях тополя бальзамического (таблица).

Таблица.

Активность полифенолоксидазы и содержание конденсированных танинов в листьях тополя бальзамического (г. Набережные Челны)

Функциональная зона	Активность полифенолоксидазы, ед. акт.			Конденсированные танины, мг/г сух. вещества		
	июнь	июль	август	июнь	июль	август
контроль	1.97	4.09	4.88	3.55	4.80	6.58
Санитарно-защитная зона	2.08	4.82	5.93	3.50	5.38	6.86
Магистральные посадки	2.82	5.80	7.29	3.63	5.66	7.06
НСР ₀₅	0.08			0.04		

У исследуемого вида как в ЗУК, так и в городских посадках наблюдалась следующая динамика активности фермента: возрастание активности от июня к августу.

Тополь бальзамический, произрастающий на территории с техногенной нагрузкой, проявлял общую тенденцию в увеличении активности полифенолоксидазы

за весь период активной вегетации, с июня по август. У него было зафиксировано возрастание активности фермента в санитарно-защитной зоне и примагистральных насаждениях в июне 0.11 – 0.85; в июле 0.73 – 1.71; в августе 1.05 – 2.41 ед. акт., по сравнению с активностью полифенолоксидазы в зоне условного контроля.

У тополя бальзамического в магистральных посадках и насаждениях санитарно-защитных зон показатель активности полифенолоксидазы превышал ЗУК: в июне 0.11-0.85 ед. акт.; в июле –0.73-1.71; в августе – 1.05-2.41 ед. акт.

Динамика активности фермента в течение исследуемого вегетационного сезона показала, что у тополя бальзамического она достоверно увеличивалась: в июне меньше, чем в июле, в июле меньше, чем в августе.

В насаждениях СЗЗ промышленных предприятий и магистральных посадках динамика активности фермента не меняется, по сравнению с контрольными посадками.

Следует отметить, что у тополя бальзамического наиболее высокие показатели активности фермента в июле и августе в посадках с интенсивной техногенной нагрузкой.

На наш взгляд повышение активности полифенолоксидазы, по-видимому, является своеобразной реакцией клеток на возрастание потребности в дыхании, вызванной высоким содержанием пылевых частиц и других поллютантов, препятствующих нормальному газообмену листьев растений.

Дисперсионный многофакторный анализ результатов исследований выявил достоверность влияния видовых особенностей (уровень значимости $P < 10^{-5}$), комплекса условий места произрастания ($P = 8.37 \cdot 10^{-5}$), сроков вегетации ($P = 1.16 \cdot 10^{-3}$), а также взаимодействия этих факторов ($P < 10^{-5}$) на содержание танинов в листьях тополя бальзамического (таблица).

Результаты исследований показали, что у тополя бальзамического и во всех типах насаждений содержание танинов в листьях возрастает в ходе вегетации, достигая наибольших значений в августе. Наибольшими значениями показателя танинов характеризовались особи, произрастающие в магистральных посадках (7,06 мг/г сух. вещества).

Видоспецифичность реакции растения на условия произрастания наблюдалась в насаждениях промзон в июне: содержание танинов в листьях растений было ниже показателя ЗУК, а затем в августе, наоборот, было выше по сравнению с ЗУК. В магистральных посадках динамика показателя была иной за весь период исследования содержание танинов выше, чем в ЗУК.

Таким образом, можно заключить, что реакции тополя бальзамического на условия произрастания зависят от степени техногенной нагрузки и от складывающихся метеорологических условий в период вегетации растений.

Исследования проводятся при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых кандидатов наук № 1955.2017.11.

Литература

Бухарина И.Л., Кузьмин П.А., Шарифуллина А.М. Содержание низкомолекулярных органических соединений в листьях деревьев при техногенных нагрузках // Лесоведение. – 2014. – № 2. – С. 20–26.

Воскресенский В.С., Воскресенская О.Л. Изменение активности окислительно-восстановительных ферментов у древесных растений в условиях городской среды // Вестник МарГТУ. – 2011. – № 1. – С. 75 – 82.

Гетко Н.В. Растения в техногенной среде: Структура и функции ассимиляционного аппарата. – Минск: Наука и техника, 1989. – 208 с.

Государственный доклад «О состоянии природных ресурсов и об охране окружающей среды Республики Татарстан в 2015 году». – Казань, 2016. – 467 с.

Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – С. 43–45.

Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения // XVI Тимирязевское чтение. – М.: Наука, 1996. – 45 с.

Коровкин О.А. Анатомия и морфология высших растений. Словарь терминов. – М.: Дрофа, 2007. – 272 с.

Фуксман И.Л., Новицкая Л.Л., Исидоров В.А. и др. Фенольные соединения хвойных деревьев в условиях стресса // Лесоведение. – 2005. – № 3. – С. 4–10.

Ahmed M.R., Anis M. Changes in activity of antioxidant enzymes and photosynthetic machinery during acclimatization of micropropagated *Cassia alata* L. plantlets // In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. – 2014. – V. 50. – P. 601–609.

Bukharina I.L., Zhuravleva A.N., Dvoeglazova A.A., Kamasheva A.A., Sharifullina A.M. and Kuzmin P.A. Physiological and biochemical characteristic features of small-leaved lime (*Tilia Cordata* Mill.) in urban environment // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2014. – V. 5, No. 5. – P. 1544–1548.

Garcia D.E., Glasser W.G., Pizzi A., Paczkowski S.P., Laborie M.P. Modification of condensed tannins: from polyphenol chemistry to materials engineering // New Journal of Chemistry. – 2016. – V.1. – P. 234–242.

Li X., Yang Y.Q., Sun X.D., Lin H.M., Chen J.H., Ren J., Hu X.Y., Yang Y.P. Comparative physiological and proteomic analyses of poplar (*Populus yunnanensis*) plantlets exposed to high temperature and drought // Plos one. – 2014. – V. 9. – P. 100–108.

ANALYSIS OF DYNAMICS OF TANIN CONTENT AND ACTIVITY OF POLYPHENOLOXIDASE IN LEAVES OF BALSAMIC TOPOL IN THE CONDITIONS OF ANTHROPOGENIC ENVIRONMENT

A.M. Kuzmina¹, I.L. Bukharina², P.A. Kuzmin³, A.S. Fakhrutdinova³

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education Izhevsk State Agricultural Academy, Izhevsk, Russia, AMSharifullina@yandex.ru

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Udmurt State University», Izhevsk, Russia, buharin@udmlink.ru

³Elabuga Institute (branch) of Kazan (Volga Region) Federal University, Elabuga, Russia, petrkuzmin84@yandex.ru

Abstract. In the poplar balsamic in the man-made environment, an increase in the activity of polyphenol oxidase in leaves, especially in the primary plantations, is noted, which is a consequence of intensive technogenic load. Under conditions of technogenic stress, the content of tannins in leaves is increased, most significantly by the end of the active plant vegetation period (August).

Keywords: polyphenol oxidase activity, tannins, urban plantations, *Populus balsamifera*

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОЛИНА В РАСТЕНИЯХ *TRITICUM AESTIVUM* L., ИНОКУЛИРОВАННЫХ ЭНДОФИТНЫМИ ШТАММАМИ *BACILLUS SUBTILIS*

З.М. Курамшина¹, А.А. Арефьева¹, Ю.В. Смирнова¹, Р.М. Хайруллин²

¹Стерлитамакский филиала Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Башкирский государственный университет, Стерлитамак, Россия, kuramshina_zilya@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия, krm62@mail.ru

Аннотация. Изучено влияния кадмия на уровень пролина в растениях пшеницы, инокулированных эндофитными штаммами *Bacillus subtilis*. При наличии кадмия в почве обнаружено увеличение содержания уровня пролина в побегах растений как обработанных, так и необработанных бактериями. Максимальное повышение уровня пролина (в среднем на 60%) наблюдали при концентрации кадмия 10 мг/кг почвы. У обработанных бактериями растений уровень пролина был выше, чем у необработанных.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, пролин, кадмий, пшеница

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1074-1076

Тяжелые металлы (ТМ) могут активно поглощаться растениями, накапливаться в них, далее по пищевым цепям могут поступать в организм человека и животных и оказывать цитотоксическое, генотоксическое и мутагенное действие на живые организмы. Опасность усугубляется ещё и тем, что металлы обладают кумулятивным действием и сохраняют токсические свойства в течение длительного времени [Emamverdian et al., 2015].

В ответ на действие ТМ в клетках растений происходит накопление активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса [Cargnelutti et al., 2006]. АФК повреждают важнейшие биополимеры (нуклеиновые кислоты, белки, липиды и углеводы) и клеточные мембраны [Немерешина и др., 2012; Morsy et al., 2012]. Антиоксидантная система защиты растений в растениях представлена высокомолекулярными (ферменты) и низкомолекулярными веществами. При истощении пула ферментов свободными радикалами антиоксидантную защиту выполняют низкомолекулярные соединения, одним из которых является пролин, участвующий в формировании устойчивости растений при стрессе [Титов и др., 2014].

Собственные механизмы защиты растений от окислительного стресса не всегда эффективны, особенно при воздействии высоких доз ТМ. Необходима дополнительная защита, в качестве которой в последнее время широко применяют биопрепараты на основе эндофитных бактерий. Эндофиты стимулируют рост растений, защищают их от воздействия стрессовых факторов, позволяют получить экологически чистую продукцию, вносят существенный вклад в плодородие почвы и при этом, в отличие от химических препаратов, не наносят вред окружающей среде [Мубинов, Хайруллин, 2006].

Целью работы явилось изучение влияния кадмия на уровень пролина в растениях пшеницы, инокулированных эндофитными штаммами *Bacillus subtilis*.

Объект исследования – сельскохозяйственная культура, пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L.), сорт Омская 35. Семена перед посадкой в почву стерилизовали 70%-ным этанолом (3–5 мин.), после чего отмывали от 3 до 5 раз проточной и дистиллированной водой. Часть семян в ламинар-боксе обрабатывали бактериями *Bacillus subtilis* Cohn шт. 26Д (коллекция ВНИИСХМ, № 128) или 11ВМ (ВНИИСХМ, № 519) в концентрации

10⁶ кл/мл, остальная часть семян обрабатывалась дистиллированной водой и служила контролем. Семена инокулировали бактериями из расчёта на 1 г семян 20 мкл клеток бактерий, выдерживали в течение часа, затем высаживали в почву [Мубинов, Хайруллин, 2006]. Контрольные и инокулированные семена выращивали в вегетационных сосудах (15×15×15 см) с чернозёмной выщелоченной почвой при температуре 18–20 °С и равномерном освещении. Металл в почву вносили однократно после посева семян в виде раствора соли Cd(NO₃)₂×4H₂O с концентрацией металла 10 и 200 мг/кг почвы. Контрольные растения поливали дистиллированной водой. Отбор проб проводили одновременно со всех сосудов на 30-е сутки от начала эксперимента.

Содержание пролина определяли по модифицированной методике Г.Н. Шихалеевой и др. (2014) с помощью кислого нингидринового реактива, приготовленного без нагревания (1,25 г нингидрата + 30 мл ледяной уксусной кислоты + 20 мл 6 М Н₃РO₄) [Шихалеева и др., 2014]. Оптическую плотность продуктов реакции измеряли при длине волны 520 нм на спектрофотометре UNICO 2800 (США).

Эксперименты проводили в трёх биологических повторностях. Статистическую обработку результатов осуществляли при использовании стандартного пакета Microsoft Office Excel 2007. В таблицах представлены средние значения повторностей и стандартные ошибки. Достоверность различий между контрольными и испытуемыми вариантами оценивали по t-критерию Стьюдента при уровне значимости $P \leq 0,05$.

В результате проведенных исследований было установлено, что при выращивании растений *Triticum aestivum* L в чистой почве, без металла, показатели содержания пролина в надземной части растений, семена которых были инокулированы эндофитными бактериями шт. 26Д, были на 8,3% выше, чем у необработанных и на 10,7% выше при инокуляции шт. 11ВМ (таблица).

Таблица.

Содержание пролина в надземной части растений *Triticum aestivum* L., выращенных в почве, загрязнённой кадмием, мкмоль/г массы сырого веса

Вариант	Концентрация Cd ²⁺ в почве		
	0 мг/кг	10 мг/кг	200 мг/кг
Не обр.	152,56±2,2	250,30±2,4	224,06±2,7
Обр. <i>B. sub.</i> 26Д	165,23±1,5*	264,78±4,1*	231,29±4,6*
Обр. <i>B. sub.</i> 11ВМ	168,85±1,3*	257,54±1,6*	234,01±3,4*

***Примечание.** Различия между показателями инокулированных и неинокулированных бактериями растений достоверны при $P \leq 0,05$

При наличии кадмия в почве обнаружено увеличение содержания уровня пролина в побегах растений как обработанных, так и необработанных бактериями (табл.). Максимальное повышение уровня пролина (в среднем на 60%) наблюдали при концентрации кадмия 10 мг/кг почвы. При высоких токсических концентрациях металла (200 мг/кг) уровень пролина снижался, однако оставался в среднем выше на 40%, чем в контроле.

Пролин – гетероциклическая аминокислота, занимающая особое положение среди низкомолекулярных антиоксидантов, т.к. её концентрация у многих растений возрастает в условиях биотического и абиотического стрессового воздействия, в т.ч. и при действии ТМ. Накопление пролина, вызванное стрессом, оказывает влияние на весь метаболизм растительной клетки, что проявляется в инактивации АФК, оказании стабилизирующего действия на мембраны, уменьшении осмотического стресса, защите клеточных компонентов, ДНК, ферментов и белков от денатурации [Абрамова, 2015].

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что под

влиянием эндофитных бактерий *B. subtilis* 26Д и 11ВМ в растениях происходит активация различных защитных механизмов для снижения интенсивности окислительного стресса, вызванного действием тяжелых металлов, в том числе и повышение уровня пролина.

Литература

Абрамова Э.А. Влияние различных концентраций ионов никеля на прорастание семян и формирование проростков вики: диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук. – Тула, 2015. – 134 с.

Мубинов И.Г., Хайруллин Р.М. Роль оксидаз в регуляции уровня активных форм кислорода и реакциях пшеницы на инокуляцию эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* // Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете: сборник тезисов второго международного симпозиума. – Казань, 2006. – С. 93–94.

Немерешина О.Н., Гусев Н.Ф., Петрова Г.В., Шайхутдинова А.А. Некоторые аспекты адаптации *Polygonum aviculare* L. к загрязнению почвы тяжёлыми металлами // Известия ОГУ. – 2012. – № 1–1. – С. 230–234.

Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжёлые металлы и растения. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. – 194 с.

Шихалеева Г.Н., Будняк А.К., Шихалеев И.И., Иващенко О.Л. Модифицированная методика определения пролина в растительных объектах // Вестник Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина. Серия: биология. – 2014. – № 1112. – С. 168–172.

Cargnelutti D., Tabaldi L.A., Spanevelloetal R.M. Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings // Chemosphere. – 2006. – V. 65, No. 6. – P. 999–1006.

Emamverdian A., Ding Y., Mokhberdorran F., Xie Y. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response // The Scientific World Journal. – 2015. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/756120> (дата обращения: 16.05.2017).

Kloke A., Sauerbeck D.C., Vetter H. The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains // Changing Metal Cycles and Human Health. – 1984. – No. 28. – P. 113–141.

Morsy A.A., Salama K.H.A., Kamel H.A., Mansour M.M.F. Effect of heavy metals on plasma membrane lipids and antioxidant enzymes of *Zygophyllum* species // Eurasian Journal of Biosciences. – 2012. – No. 6. – P. 1–10.

Ruscitti M., Arango M., Ronco M., Beltrano J. Inoculation with mycorrhizal fungi modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) // Brazilian Journal of Plant Physiology. – 2011. – V. 23, No. 1. – P. 15–25.

INFLUENCE OF CADMIUM IN THE PROLINE CONTENT IN PLANTS OF *TRITICUM AESTIVUM* L., INOCULATED BY ENDOPHYTIC STRAINS OF *BACILLUS SUBTILIS*

Z.M. Kuramshina¹, A.A. Arefeva¹, Yu.V. Smirnova¹, R.M. Khayrullin²

¹The Sterlitamak Branch of the Bashkir State University, Sterlitamak, Russia, kuramshina_zilya@mail.ru

²Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia, krm62@mail.ru

Abstract. The effect of cadmium on the level of proline in wheat plants inoculated with endophytic *Bacillus subtilis* strains was studied. In the presence of cadmium in the soil, an increase in the level of proline in the shoots of plants, both processed and untreated by bacteria, was found. The maximum increase in proline level (on average by 60%) was observed at a cadmium concentration of 10 mg/kg soil. In plants treated with bacteria, the level of proline was higher than in untreated ones.

Keywords: *Bacillus subtilis*, proline, cadmium, wheat

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ Cd И ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ КАТИОНОВ ВНУТРИ ХЛОРОПЛАСТОВ. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПОИСКУ МИШЕНЕЙ Cd

Е.А. Лысенко, А.А. Клаус, А.В. Карташов, В.В. Кузнецов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, genlysenko@mail.ru

Аннотация: Изучено поступление Cd в хлоропласты и его распределение между стромой и тилакоидами. *In vivo*, Cd в основном поступает в тилакоиды, а *in vitro* распределяется между стромой и тилакоидами примерно поровну. Одновременный анализ распределения эссенциальных катионов показал, что в тилакоидах количество Cd достаточно для конкуренции с Cu, Zn, Mn и слишком мало по сравнению с Mg, Ca, Fe, K. Сравнительный анализ влияния Cd, Cu и Fe, выявил специфичность воздействия Cd на состав катионов в хлоропластах.

Ключевые слова: кадмий, хлоропласты, тилакоиды, строма, распределение катионов

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1077-1078

Кадмий является одним из наиболее токсичных тяжелых металлов. В процессе эволюции растения сформировали механизмы защиты наиболее важных процессов от воздействия Cd. Один из наиболее важных – это ограничение его поступления из корня в побег, в частности в хлоропласты. В результате функционирования этих механизмов в хлоропласты попадает очень малые количества Cd [Lysenko et al., 2015]. Однако хорошо известно, что у растений, подвергающихся действию Cd, эффективность фотосинтеза снижается. До сих пор остаётся не известным, вызвано ли это прямым воздействием Cd или же это опосредованный результат токсического действия этого тяжелого металла на другие процессы у растений. В экспериментах *in vitro* показано, что Cd способен повреждать молекулярные комплексы фотосинтетического аппарата, однако это продемонстрировано с использованием за пределами высоких концентраций Cd, который не возможен *in vivo* (растение погибает при меньшем накоплении Cd). Остается не ясным, какие именно процессы в фотосинтезе могут быть ингибированы прямым действием Cd *in vivo*: свето-индуцируемые процессы в электрон-транспортной цепи, находящейся в тилакоидной мембране, или свето-независимые («темновые») процессы фиксации CO₂ в строме.

Поскольку известно, что в хлоропластах растений накапливается малое количество Cd, то для достижения токсического эффекта буквально каждый катион должен участвовать в ингибировании. Поэтому мы подошли к решению этого вопроса с позиции количественного анализа. До сих пор оставалось неизвестным, каким образом Cd распределяется внутри хлоропластов. Мы использовали 9-дневные растения ячменя, которые подвергали воздействию Cd в течение 6 дней. Из листьев были выделены интактные хлоропласты высокой степени очистки, лизированы осмотическим шоком и разделены центрифугированием. Осадок содержал тилакоиды, а супернатант – строму с обрывками хлоропластного энвелопа. Анализ показал, что 4/5 кадмия приходится на тилакоиды, и лишь 1/5 его часть накапливается в строме. Это указывает на то, что в хлоропластах мишенью Cd является световая фаза фотосинтеза. Стромальные процессы (темновая фаза фотосинтеза, экспрессия генов, прочие ассимиляционные процессы) вряд ли могут быть заметно ингибированы столь малым количеством Cd.

Для сравнения были изучены процесса аккумуляции хлоропластами Cd *in vitro*. В этой модели хлоропласты накапливали гораздо больше Cd, и он распределялся между тилакоидами и стромой примерно в равных долях.

Cd не является металлом с переменной валентностью, и не может сам индуцировать окислительно-восстановительные процессы. Основным механизмом его токсического действия – это замещение других двухвалентных катионов, в основном в белках. Параллельно с кадмием мы изучили распределение в хлоропластах основных двухвалентных катионов – Mg, Ca, Fe, Mn, Zn, Cu – и одного одновалентного катиона – K. Сравнительный анализ показал, что количество Cd в тилакоидах достаточно для конкуренции с белковыми комплексами, содержащими Cu (пластоцианин), Zn (карбоангидраза и/или протеазы FtsH) или Mn (водоокисляющий комплекс фотосистемы 2). Описана общая картина распределения этих катионов: из листа в хлоропласт и внутри хлоропласта между стромой и тилакоидами.

Для определения специфичности воздействия Cd, его влияние было сопоставлено с действием других тяжёлых металлов. Растения выращивали 6 дней в присутствии в минеральной среде Cd (80 мкМ), Cu (80 мкМ) или Fe (1.5 мМ). Кадмий изменял содержание всех изученных эссенциальных катионов. Содержание в хлоропластах K и Mn изменялось сходным образом при воздействии любого из тяжёлых металлов (Cd, Cu или Fe), изменения содержания остальных катионов было специфично для воздействия Cd. Из наиболее интересных эффектов следует отметить, что при воздействии Cd *in vivo* в хлоропластах уменьшалось накопление Zn. По-видимому, это результат конкурентного ингибирования транспорта Zn в хлоропласты. Кроме того, при воздействии Cd *in vivo* в хлоропластах происходит массовое перемещение Ca из стромы в тилакоиды. Скорее всего, это защитный механизм, позволяющий растениям защитить процессы в тилакоидах от конкурентного ингибирования со стороны катионов Cd.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-04-00584.

Литература

Lysenko E.A., Klaus A.A., Pshybytko N.L., Kusnetsov V.V. Cadmium accumulation in chloroplasts and its impact on chloroplastic processes in barley and maize // Photosynthesis Research. – 2015. – V. 125, № 1-2. – P. 291–303.

THE DISTRIBUTION OF Cd AND ESSENTIAL CATIONS INSIDE CHLOROPLASTS. A QUANTITATIVE APPROACH TO SEARCHING FOR Cd TARGETS

E.A. Lysenko, A.A. Klaus, A.V. Kartashov, V.V. Kusnetsov

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia, genlysenko@mail.ru

Abstract. We studied Cd accumulation in chloroplasts and its distribution between stroma and thylakoids. *In vivo*, Cd was primarily accumulated in thylakoids; *in vitro* it was distributed between stroma and thylakoids near equally. Simultaneous analysis of essential cations revealed that in the thylakoids the quantity of Cd is sufficient to compete with Cu, Zn, Mn, and too low as compared to the levels of Mg, Ca, Fe, K. Comparison of Cd, Cu, and Fe treatments revealed specific effects of Cd on cation contents in chloroplasts.

Keywords: cadmium, chloroplasts, thylakoids, stroma, cation distribution

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ В ЛИСТЬЯХ БЕЛОКРЫЛЬНИКА БОЛОТНОГО В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

М.Г. Малева, Г.Г. Борисова, Г.И. Ширяев, П.Ю. Лукина

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия, maria.maleva@mail.ru

Аннотация. Представлены данные об аккумуляции металлов и содержании низкомолекулярных антиоксидантов в листьях *Calla palustris* L. в зоне деятельности Карабашского медеплавильного комбината (г. Карабаш, Челябинская область). Показано, что длительное техногенное воздействие приводит к развитию хронического окислительного стресса и увеличению содержания фенольных и тиолсодержащих соединений в листьях *C. palustris*, в то время как достоверного изменения уровня каротиноидов и пролина не выявлено.

Ключевые слова: гелофит, тяжелые металлы, аккумуляция, окислительный стресс, антиоксидантная система

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1079-1083

В последние десятилетия все большее внимание исследователей привлекает проблема окислительного стресса, возникающего при нарушении баланса между антиоксидантами и прооксидантами. Универсальная классификация компонентов антиоксидантной системы отсутствует, однако широкое распространение получило деление антиоксидантов на две группы на основании их молекулярных масс: высокомолекулярные и низкомолекулярные соединения [Прадедова и др., 2011].

Цель исследования – оценка аккумулятивного потенциала, интенсивности пероксидации липидов и содержания некоторых низкомолекулярных антиоксидантов в листьях белокрыльника болотного из природных местообитаний с разной степенью техногенной нагрузки.

Белокрыльник болотный (*Calla palustris* L.), семейство Araceae (ароидные) – широко распространенный голарктический бореальный вид, относится к гелофитам.

Исследования проводили в пойме реки Сак-Элга, протекающей через город Карабаш, Челябинская область. На протяжении многих десятков лет территория этого города испытывает мощное техногенное воздействие от деятельности Карабашского медеплавильного комбината ЗАО «Карабашмедь» (КМК). Территория, примыкающая к КМК, объявлена зоной экологического бедствия. Река Сак-Элга в нижнем течении сильно загрязнена из-за поступления шахтных вод с низким значением pH, ливневых стоков с производственных площадок КМК и шламонакопителей, а также хозяйственно-бытовых сточных вод города [Yurkevich et al., 2015].

Пробы воды, седиментов и растительный материал собирали в июле 2016 и 2017 гг. (в фазе цветения растений) на двух участках, различающихся степенью техногенной нагрузки: фоновом (верховье р. Сак-Элга, 3 км выше КМК; 55.4466°N, 60.1685°E) и импактном (р. Сак-Элга, 2,6 км ниже КМК; 55.4456°N, 60.2256°E).

Величину pH и электропроводности воды измеряли с помощью портативного pH-метра/кондуктометра (“Hanna Instruments”, Германия). Определение содержания тяжелых металлов (ТМ) в воде, седиментах, корнях и листьях *C. palustris* проводили с помощью атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивной связанной плазмой iCAP 6500 Duo (“Thermo Scientific”, США) после мокрого озонирования 70% HNO₃ (осч.). В качестве интегрального показателя загрязнения использовали суммарный индекс токсической нагрузки, который рассчитывали, как: $S_i = (1/n) \sum (S_{\text{имп.}}/S_{\text{фон}})_i$, где $S_{\text{имп.}}$ –

концентрация i -ого металла в воде или седиментах импактного участка, $S_{\text{фон}}$ – концентрация i -ого металла в фоновом участке, n – число металлов [Безель и др., 1998]. Коэффициент транслокации ТМ из корней в листья определяли как отношение содержания исследуемого металла в листьях к его содержанию в корнях.

Измерение количества продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в листьях *S. palustris* проводили спектрофотометрически (“APEL” PD-303UV) по изменению содержания малонового диальдегида (МДА) [Методы оценки ..., 2012].

Содержание каротиноидов определяли спектрофотометрически в 80 % ацетоновом экстракте [Lichtenthaler, 1987]. Определение содержания пролина проводили по модифицированной методике Бэйтса [Методы оценки ..., 2012]. Общее содержание фенольных соединений в листьях белокрыльника определяли спектрофотометрически при длине волны 725 нм с реактивом Фолина–Чокальтеу, используя в качестве стандарта галловую кислоту [Singleton et al., 1999]. Определение содержания флавоноидов проводили спектрофотометрически при длине волны 420 нм с использованием лимоннокислого борного реактива [Методы оценки ..., 2012]. Содержание растворимых небелковых тиолов определяли спектрофотометрически при длине волны 412 нм после реакции с реактивом Элмана, согласно [Методы оценки ..., 2012], используя в качестве стандарта восстановленный глутатион.

Физиолого-биохимические характеристики определяли в трех биологических повторностях. Для оценки достоверности различий использовали непараметрический критерий Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$.

Длительное техногенное воздействие привело к значительному снижению рН воды в реке Сак-Элга ниже по течению от медеплавильного комбината – с 6,8 до 5,4 и возрастанию электропроводности в 5 раз.

Содержание ТМ в воде импактного участка в десятки раз превышало фоновые значения. Например, концентрация Hg в воде р. Сак-Элга ниже по течению от КМК была в 137, Zn – в 111, Mn – в 75, а Cd – в 65 раз больше по сравнению с фоновым участком. В седиментах импактного участка содержание ТМ было также значительно выше, чем в фоновом: Zn – в 77 раз, Cu – в 17, Cd – в 11, а Ni, Pb, Fe, Hg – в среднем в 6 раз. Величина S_i , рассчитанная по 10 проанализированным ТМ, составила в импактном участке 41 для воды и 16 для седиментов. Соответственно, содержание ТМ в листьях и корнях белокрыльника из импактного участка существенно превышало их количество в растениях из фонового. Например, содержание Sr в листьях было больше в 5,4 раза, Cu – в 2,0 раза, Pb – в 1,8 раза, Zn, Mg и Mn – в 1,6 раз, Cd и Hg – в 1,4 раза. В корнях *S. palustris* из импактного участка количество цинка было в 37, кадмия – в 34, меди – в 18 раз, свинца и никеля – в 2 раза выше по сравнению с фоновым.

Содержание всех изученных ТМ, за исключением Hg, в корнях растений импактного участка было существенно выше, чем в листьях: Cd – в 42 раза; Fe – в 35 раз, Cu – в 30, Zn – в 24 раза. По другим металлам кратность превышения варьировала от 2 до 7. Соответственно коэффициенты транслокации из корней в листья по всем изученным металлам, кроме Hg, были менее 1 и составляли следующий ряд: Sr>Pb>Ni>Mg>Mn>Zn>Cu>Fe>Cd.

Несмотря то, что корневая система белокрыльника демонстрировала достаточно высокую депонирующую емкость в отношении металлов, их повышенное содержание в листьях приводило к развитию окислительного стресса. Содержание МДА в листьях белокрыльника из импактного участка было достоверно (в 1,6 раза) выше по сравнению с фоновым (рисунок). Известно, что ПОЛ является индикаторной реакцией повреждения клеточных мембран. В неблагоприятных условиях происходит накопление активных форм кислорода (АФК), что приводит к увеличению

интенсивности процессов окисления липидов и других жизненно важных соединений [Прадедова и др., 2011].

Основной неспецифической реакцией на окислительный стресс при действии различных поллютантов является активация компонентов антиоксидантной системы, включая низкомолекулярные антиокислители [Michalak, 2006]. Как известно, низкомолекулярные вещества с антиоксидантными свойствами выполняют ряд других функций, поэтому изменение их содержания не всегда связано с окислительным стрессом. Тем не менее, представляется целесообразным оценить активность низкомолекулярных антиоксидантов белокрыльника в условиях длительного техногенного воздействия (на примере таких компонентов как каротиноиды, пролин, фенольные соединения и небелковые тиолы).

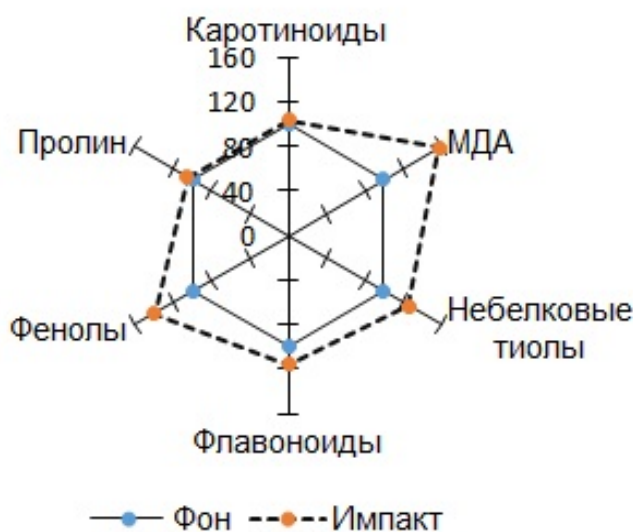


Рисунок. Содержание МДА и некоторых низкомолекулярных антиоксидантов в листьях белокрыльника болотного из р. Сак-Элга (фоновый и импактный участки). Данные представлены в процентах от фоновых значений (фон – 100%).

Каротиноиды не только принимают участие в поглощении квантов света, но и обладают антиоксидантной способностью. Молекулы каротиноидов, имеющие двойные связи, легко окисляются, конкурируя за АФК с другими биомолекулами, тем самым защищая последние от окисления [Прадедова и др., 2011]. В связи с этим проявление антиоксидантных свойств каротиноидов нередко сопровождается их окислительной деструкцией. Однако достоверного изменения количества каротиноидов у *C. palustris* в условиях длительного техногенного загрязнения не было выявлено (рисунок), что свидетельствует о сбалансированности процессов их синтеза и окисления.

Особую роль в защитно-приспособительных реакциях растений играет гетероциклическая аминокислота пролин. Известно, что свободный пролин при стрессе обладает полифункциональным биологическим эффектом, который проявляется не только в осморегуляторной и протекторной функциях, но также и в антиоксидантной [Кузнецов и Шевякова, 1999]. Имеются данные о повышенной аккумуляции пролина в клетках растений в условиях стресса вследствие активизации процессов его синтеза и уменьшения окисления [Hare and Cress, 1997]. Однако содержание свободного пролина в листьях белокрыльника в фоновом и импактном участках было примерно одинаковым: достоверных различий не выявлено.

Важнейшими водорастворимыми антиоксидантами являются природные фенольные соединения: полифенолы, фенилпропаноиды, а также флавоноиды, которые

составляют наиболее многочисленную группу эндогенных фенолов [Michalak, 2006]. Многие фенольные соединения хорошо связывают ионы ТМ и образуют с ними комплексы, предупреждая образование АФК. Они также способны отдавать атом водорода из ОН-группы ароматического кольца для тушения и ликвидации свободных радикалов, окисляющих липиды и другие биомолекулы [Прадедова и др., 2011].

Общее количество фенольных соединений в листьях белокрыльника в импактном участке возросло в 1,4 раза. Содержание флавоноидов у растений, произрастающих ниже по течению от комбината, также увеличивалось, но в меньшей степени (на 15%), рисунок. При этом доля флавоноидов от общего количества эндогенных фенолов уменьшалась с 48% до 40%. Как правило, в растениях, способных адаптироваться к действию стрессоров, наблюдается более значительное накопление флавоноидов по сравнению с растениями со слабой адаптивной реакцией [Michalak, 2006].

К настоящему времени доказана способность растений синтезировать металлсвязывающие тиолсодержащие соединения в ответ на действие ТМ [Borisova et al., 2016]. Исследования показали, что содержание небелковых растворимых тиолов в листьях *S. palustris* в импактном участке возросло на 26% по сравнению с фоновым (рисунок). Соединения, обогащенные –SH-группами, способны хелатировать ионы металлов и, следовательно, предотвращать образование АФК. Кроме того, они могут непосредственно обезвреживать свободные радикалы [Прадедова и др., 2011].

Таким образом, длительное техногенное воздействие приводило к развитию хронического окислительного стресса в листьях белокрыльника болотного. Несмотря на это, благодаря активизации таких компонентов системы антиоксидантной защиты как фенольные и тиолсодержащие соединения, растения данного вида продемонстрировали достаточно высокую жизнеспособность и адаптацию к экстремальным условиям техногенно нарушенного местообитания.

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации, соглашение № 02.А03.21.0006.

Литература

Безель В.С., Жуйкова Т.В., Позолотина В.Н. Структура ценопопуляций одуванчика и специфика накопления тяжелых металлов // Экология. – 1998. – № 5. – С. 376–382.

Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Проллин при стрессе: биологическая роль, метаболизм и регуляция // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 2. – С. 305–320.

Методы оценки антиоксидантного статуса растений: учеб.-метод. пособие / Г.Г. Борисова и др.; отв. ред. Н.В. Чукина. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2012. – 72 с.

Прадедова Е.В., Ищеева О.Д., Саляев Р.К. Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, № 2. – С. 177–185.

Borisova G.G., Chukina N.V., Maleva M.G., Kumar A., Prasad M.N.V. Thiols as biomarkers of heavy metal tolerance in the aquatic macrophytes of Middle Urals, Russia // International Journal of Phytoremediation. – 2016. – V. 18, No. 10. – P. 1037–1045.

Hare P. D., Cress W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulations in plants // Plant Growth Regulation. – 1997. – No. 21. – P. 79–102.

Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes // Methods in Enzymology. – 1987. – V. 148. – P. 350–382.

Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress // Polish Journal of Environmental Studies. – 2006. – V. 15. – P. 523–530.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent // *Methods in Enzymology*. – 1999. – V. 299. – P. 152–178.

Yurkevich N.V., Saeva O.P., Karin Y.G. Geochemical anomalies in two sulfide-bearing waste disposal areas: Fe, Cu, Zn, Cd, Pb, and As in contaminated waters and snow, Kemerovo and Chelyabinsk regions, Russia // *Toxicological and Environmental Chemistry*. – 2015. – V. 97, No. 1. – P. 76–89.

CHANGES OF LOW-MOLECULAR WEIGHT ANTIOXIDANT CONTENT IN *CALLA PALUSTRIS* LEAVES UNDER TECHNOGENIC POLLUTION

M.G. Maleva, G.G. Borisova, G.I. Shiryaev, P.Yu. Lukina

Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia, *maria.maleva@mail.ru*

Abstract. The data on the metal accumulation and the low-molecular weight antioxidant content in the leaves of *Calla palustris* L. growing on copper smelter influenced territory (Karabash city, Chelyabinsk region) are statistically presented. It was found that prolonged technogenic impact caused the development of chronic oxidative stress and an increase in the content of phenolic and thiol-containing compounds, while no significant changes were observed in the level of carotenoids and proline.

Keywords: *helophyte, heavy metals, accumulation, oxidative stress, antioxidant system*

ГЕЛИОРАДИАЦИОННЫЙ ФАКТОР УСЫХАНИЯ СОСНЫ В БЕЛОРУССКОМ ПОЛЕСЬЕ

Е.В. Матюшевская¹, В.Н. Киселев², С.В. Девгуть¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, *katerina.vn@icloud.com*

²Учреждение образования «Белорусский государственный педагогический университет имени Максима Танка», Минск, Беларусь, *kiselev-vn@yandex.ru*

Аннотация. Крупномасштабная осушительная мелиорация, в результате которой произошло повсеместное снижение уровня приповерхностных грунтовых вод, обострила лимитирующее значение естественных экологических факторов: прямой солнечной радиации, температуры и осадков в их влиянии на состояние и продуктивность сосны, вызвав массовое отмирание ее древостоя.

Ключевые слова: *Белорусское Полесье, мелиорация, климат, солнечная радиация, усыхание сосны*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1084-1088

Водноземельная мелиорация Белорусского Полесья одновременно с крупномасштабной вырубкой лесов в течение более чем двухвекового периода породила ряд проблем ресурсного и экологического порядка. Среди них – восстановление и сохранения в целях использования в народном хозяйстве лесных ресурсов. Ключевое значение в ресурсном и природоохранном отношениях принадлежит сосне (*Pinus sylvestris* L.), на долю которой приходится более половины лесной площади.

Уникальность насаждений сосны в Белорусском Полесье заключается в том, что их литологической основой служат покровные кварцевые пески, которые значительно осложняют ведение лесного хозяйства на них. Малое содержание или полное отсутствие глинистых минералов не способствовало образованию почвенного поглощающего комплекса. К тому же, кроме исключительной бедности слабо развитые почвы на кварцевых песках обладают особыми водно-физическими свойствами: малой влагоудерживающей способностью. Ситуация усугубляется на территориях, на которых выполнялась осушительная мелиорация. Основной объем научно-исследовательских работ по оценке влияния мелиорации на продуктивность сосновых ценозов выполнен в 1971–1975 гг. – в период наибольшего развития природоохранных исследований в регионе. Были получены неоднозначные результаты, показавшие снижение радиального прироста, как в зоне снижения грунтовых вод, так и вне этой зоны. Понижение грунтовых вод выступило как один из вероятных факторов, способных воздействовать на продуктивность лесных экосистем [Киселев, 1987].

В 1960–1970-е годы широко практиковалось облесение бросовых песчаных земель (бывших «сырых песков») вблизи мелиоративных систем. В результате этих лесокультурных работ формировались одновозрастных насаждения, которые с первых лет существования развивались в условиях искусственного понижения грунтовых вод, вызывающее длительное иссушение почв на кварцевых песках.

Понижение грунтовых вод при неустойчивом увлажнении атмосферными осадками создало неблагоприятные условия для роста культуры сосны и молодняков. В этом была заключена основная причина наблюдавшегося массового поражения их энтомофитными вредителями на междуречьях Ипы, Виши, Неначи, Нератовки, Желони и многих других канализированных малых рек – Калинковичский, Светлогорский, Октябрьский, Петриковский, Житковичский, Наровлянский и другие лесхозы [Киселев, 1987].

Облесение вырубок и бывших сельскохозяйственных угодий потребовало вполне конкретного ответа на вопрос, как почувствуют себя сосновые леса, после завершения мелиоративного освоения Белорусского Полесья [Киселев, Чубанов, 1979]. Проблема восстановления лесов, особенно сосновых, на его территории не утратила своей актуальности. Наиболее масштабное, по сравнению с другими регионами, отмирание древостоя сосны в возрасте 30 лет и старше в 2015–2016 гг. при нарастающем угнетении за последние два десятилетия обострило задачу сохранения ее насаждений при сложившихся после осушительной мелиорации почвенно–гидрогеологических условиях и при изменяющихся климатических условиях [Сазонов и др., 2017]. Ситуация с сосной на юге Беларуси есть концентрированное отражении ее состояния в полосе полесий Украины, России и Польше, а также в других государствах.

Для выяснения причин угнетения и отмирания сосны был исследован многолетний ход изменчивости максимального индивидуального (каждого дерева) радиального прироста в каждой возрастной серии, опустив предыдущие и последующие меньшие значения. Предельные его показатели определяют продукционный потенциал сосны в нарастании стволовой массы – больше их радиальный прирост быть не может по ее биологической природе, внутренним и внешним факторам. Всего для дендроклиматического анализа были привлечены образцы древесины (керны) 43 деревьев сосняка мшистого на осушенной территории (мелиоративные объекты «Ипа–Виша» и «Нератовка»), объединенные в одновозрастные серии 105, 120 и 155 лет. Максимальный индивидуальный радиальный

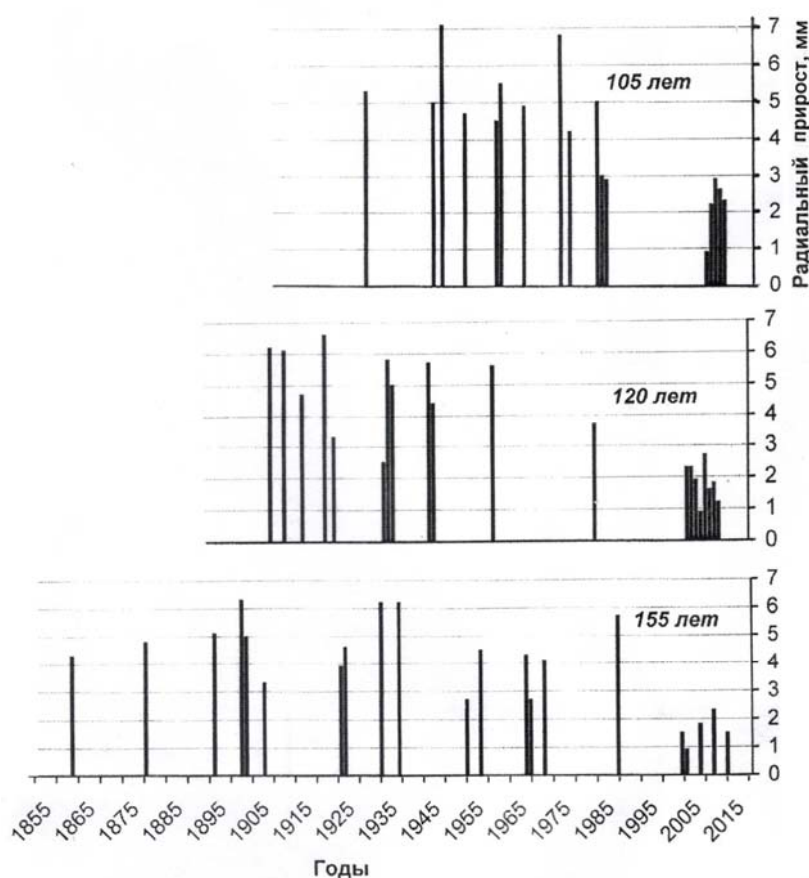


Рис. 1. Многолетний ход изменчивости внутрисериального максимального индивидуального радиального прироста сосны на автоморфных кварцевопесчаных почвах.

прирост у деревьев календарно не совпадал за редким исключением, не только в одновозрастной серии, но и между сериями (рис. 1).

Нет внешнего погодно-климатического «допинга» (температуры и осадков), который позволил бы деревьям одновременно среагировать на него. Максимальный прирост возникал при широком диапазоне метеорологических величин как до, так и при потепления климата после 1998 г. (таблица).

Таблица.

Метеорологические условия лет с максимальным индивидуальным радиальным приростом сосны на кварцевопесчаных почвах в Белорусском Полесье

Значения	Температура, t °С			Осадки, мм		
	X– IV	V – IX	Год	X – IV	V – IX	Год
До 1998 г.						
Средние	-0,2	15,9	6,6	297	343	629
диапазон	-2,9–1,6	14,8–17,3	5,1–8,0	176–452	189–468	362–826
После 1998 г.						
Средние	1,4	16,6	7,7	345	332	677
диапазон	-1,1–2,8	15,3–18,7	6,3–8,9	262–489	271–457	533–790

Сосна реализовывала свой биопродукционный потенциал в радиальном приросте до потепления климата при различных метеорологических величинах в их значительной погодичной изменчивости. Численное значение максимального индивидуального радиального прироста оказалось более значимым в климатических условиях до 1998 г., чем при потеплении после этого года. После него при более высоких значениях температурного диапазона, но при большем выпадении осадков он у всех возрастных групп сократился более чем в два раза. Ни у одного из 43 апробированных деревьев он не достигал значений до 1998 г. Этот показатель стволовой продуктивности стал календарно совпадать в отличие до этого года, когда такое совпадение было в единичных случаях. Только изменение метеорологических величин не могло привести к масштабному поражению ксерофита сосны даже при измененном водном режиме почвы – подобное раньше не наблюдалось. В качестве возникшего дополнительного лимитирующего фактора могла быть солнечная радиация, поступление которой в фитоценозы Белорусского Полесья изменялось в значительных пределах (рис. 2).

До 1976 г. приток прямой солнечной радиации и содержание рассеянной в атмосфере были равнозначны (1352 и 1351 МДж/м²). После этого года, с началом быстрого роста суммарной продолжительности меридиональной южной циркуляции воздушных масс и меньшей выраженности западной, до 1998 г. [Кононова, 2012 г.] рассеянная радиация преобладала над прямой на (в среднем за год на 114 МДж/м²). После 1998 г. с сокращением продолжительности южной циркуляции и господством западной приток прямой солнечной радиации в экосистемы лесов Полесья за месяцы вегетационного периода увеличился на 319 МДж/м² (или 26,0%) по сравнению с предыдущими 1977–1998 гг., но рассеянной, зависящей от содержания водяного пара и других аэрозолей в атмосфере, сократилось на 126 МДж / м² (или 9,6 %). Если соотношение прямой радиации к рассеянной до 1998 г. было 1:0,91, то после этого года стало 1:1,27. В 2014 и 2015 гг. она достигла рекордных значений (1840 и 1776 МДж/м²).

При этом количество осадков за месяцы вегетационного периода уменьшилось. Это указывает на то, что продолжительность и интенсивность солнечного сияния после 1998 г. увеличились в течение суточного фотопериода. Температура воздушной среды, влияя на эвапотраспирацию, не приводит к чрезмерному нагреву хвои, который может быть только при непосредственном солнечном воздействии на нее [Цельникер, 1978].

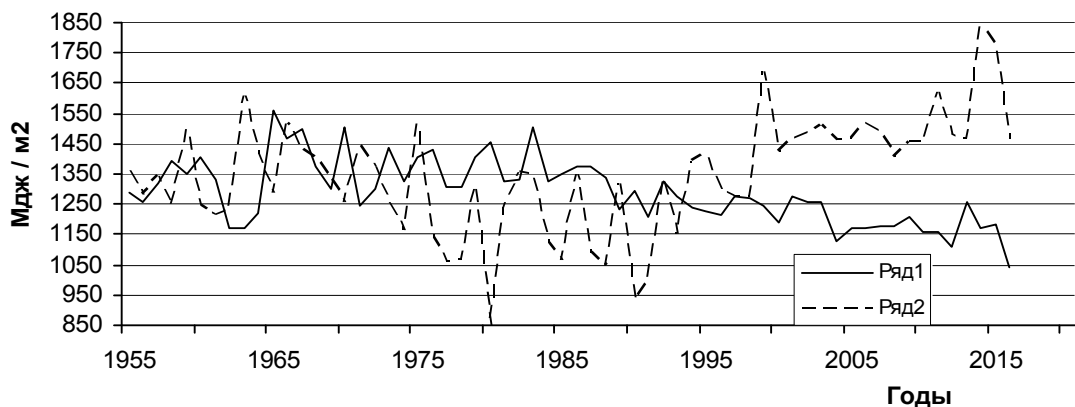


Рис. 2. Динамика рассеянной (ряд 1) и прямой (ряд 2) солнечной радиации (по наблюдениям на метеостанции Василевичи).

После аномально теплой, малоувлажненной весны (март–апрель 8,9 °С при норме 6,4 °С, 107 мм осадков при норме 133 мм) наступило жаркое, засушливое лето 2015 г. (июнь–август 19,9 °С при норме 17,4 °С, 134 мм осадков при норме 239 мм). Погодные условия 2016 г. были похожи на предыдущий год, также с малым количеством осадков в летние месяцы (162 мм при 19,8 °С). Один недобор осадков не мог привести к массовому усыханию сосны. Более значимые засухи случались на Полесье и раньше: в 1959 г. за лето выпало 108 мм, в 1963 г. – 94 мм, в 1976 г. – 121 мм и в 1992 г. – 112 мм осадков, но массового отмирания деревьев не отмечалось [Матюшевская, 2017].

Понизившиеся после осушительной мелиорации грунтовые воды (глубже 2,0 м) не оказывают влияния на содержание влагозапасов в корнеобитаемом слое [Киселев, Чубанов, 1979]. В условиях водного голода хвоя сосны не может противостоять яркому солнечному сиянию и приобретает к августу рыжую и бурую окраску как индикатор солнечного ожога (по аналогии с весенним ожогом у хвойных). Ослабленный древостой стал легкой добычей для верхушечного короеда. Как результат – массовое отмирание древостоя.

Литература

Киселев В.Н. Белорусское Полесье: экологические проблемы мелиоративного освоения. – Минск: Наука и техника, 1987. – 151 с.

Киселев В.Н., Чубанов К.Д. Ландшафтно-экологические исследования Белорусского Полесья. – Минск: Наука и техника, 1979. – 104 с.

Кононова Н.К. Сезонные особенности колебаний циркуляции атмосферы и температуры воздуха на Европейской территории России в XXI веке // Матер. Междунар. научн. конф. «Региональные эффекты глобальных изменений климата (причины, следствия, прогнозы)», 26–27 июня 2012 г. Воронеж: Народная книга. – С. 58–62.

Матюшевская Е.В. Факторы изменчивости радиального прироста деревьев. – Минск: БГУ, 2017. – 231 с.

Сазонов А.А., Звягинцев В.Б., Кухта В.Н., Тупик П.В. Ведение лесного хозяйства в условиях короедного усыхания сосны. Практическое руководство № 1. – Минск: БГТУ, 2017. – 11 с.

Цельникер Ю.Л. Физиологические основы теневыносливости древесных растений. – М.: Наука, 1978. – 212 с.

SOLAR RADIATION FACTOR OF PINE DRYING IN THE BELARUSIAN POLESIE

E.V. Matyushevskaya¹, V.N. Kiseliiov², S.V. Devgut¹

¹Belarusian State University, Minsk, Belarus, *katerina.vm@icloud.com*

²Belstatepeduniversity, Minsk, Belarus, *kiselev-vn@yandex.ru*

Abstract. Large-scale land drainage, because of which the widespread decrease in near-surface groundwater level has exacerbated the limiting importance of natural environmental factors: direct solar radiation, temperature and precipitation in their effect on the condition and productivity of pine, causing a massive drying of its stand.

Keywords: *Belorussian Polesie, land drainage, climate, solar radiation, pine drying*

ЕЛЬНИКИ БЕЛОРУССКОГО ПОЛЕСЬЯ В СОВРЕМЕННЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ ПОСЛЕ ОСУШИТЕЛЬНОЙ МЕЛИОРАЦИИ

Е.В. Матюшевская¹, В.Н. Киселев², А.Е. Яротов¹, П.А. Митрахович¹,
С.В. Девгуть¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
katerina.vn@icloud.com

²Учреждение образования «Белорусский государственный педагогический
университет имени Максима Танка», Минск, Беларусь, *kiselev-vn@yandex.ru*

Аннотация. Ельники Белорусского Полесья являются индикатором возникшей деградации лесов в этом регионе при современных климатических условиях после осушительной мелиорации. Дополнительным лимитирующим фактором послужило увеличение прямой солнечной радиации при летних засухах 2015–2016 гг.

Ключевые слова: *Белорусское Полесье, ель, радиальный прирост, климат, мелиорация*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1089-1093

К настоящему времени на Белорусском Полесье сложилась достаточно напряженная экологическая ситуация, выразившаяся в массовом усыхании не только «островных» ельников, но и сосновых насаждений. Этот регион более двухсот лет представлял собой арену крупномасштабной осушительной мелиорации, на которой вырубка лесов приняла опустошительные масштабы. Локальные популяции ели (*Picea abies* (L.) Karst.) («островные» ельники) внутри трансзональной формации сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) выступают в качестве индикатора возникшей ситуации с лесами. Исследованные «островные» ельники естественного происхождения расположены в Светлогорском и Октябрьском лесхозах. Все они принадлежат к черничному типу, доминирующему над другими типами, занимая приболотный экотоп с иллювиально-гумусово-железистым подзолом на кварцевых мелкозернистых песках непосредственно у пойм малых рек Ипы и Нератовки, канализированных еще Западной экспедицией И.И. Жилинского в 1873–1898 гг. В 1960–1970-е годы была проведена коренная реконструкция осушительной сети [Киселев, 1987].

Изменчивость радиального прироста изучалась по 61 образцу древесины (керну), отобранным возрастным буровом на высоте 1,3 м в мае 2000 г. и в октябре 2017 г. Среди них 16 деревьев в осредненном (до 5 лет) возрасте 110 лет, 13 – 95 лет, 18 – 85 лет и 14 – 75 лет.

Продукционный потенциал ели для нарастания стволовой массы в изменяющихся экологических условиях исчисляется наиболее высокими значениями индивидуального (отдельного дерева) радиального прироста в конкретный год по сравнению с другими в одновозрастной группе (серии) за все время ее роста и развития. В остальные годы его значения не должны быть превышены по данной возрастной серии. Этот максимальный индивидуальный (одного дерева за все время его роста) радиальный прирост и максимальный сериальный (одновозрастной группы деревьев в течение года) на фоне осредненной погодичной изменчивости ширины годичных колец всей серии, определялся по методическому приему [Матюшевская, 2017].

В настоящее время «островные» ельники Белорусского Полесья находятся в условиях уже стабилизировавшегося после завершения осушительной мелиорации сопредельных болот и заболоченных земель уровня грунтовых вод, но в продолжающихся изменениях климата. Майский уровень грунтовых вод понизился до глубины 1,5–1,6 м, сняв переувлажненность эдафотопы – на территории без

осушительной сети он не глубже 0,5 м [Киселев и др., 2013]. Климатическая обстановка на Белорусском Полесье не отличалась постоянством (таблица). Особо выделяется влажная череда лет 1906–1940 гг. с наибольшим количеством осадков. Двадцатилетнее (1977–1998 гг.) потепление сопровождалось увеличением осадков. После 1998 г. температурные параметры месяцев безлиственного и вегетационного периодов и гидрологического года (октябрь–сентябрь) возросли, указав на значительное потепление климата. Выпадение осадков за месяцы вегетационного периода существенно (на 51 мм) сократилось, но увеличилось в безлиственный (на 75 мм).

Таблица.

Среднестатистические показатели изменчивости климата (по наблюдениям на метеостанции Василевичи)

Годы	t, °C			Осадки, мм			Солнечная радиация, МДж/м ²	
	X-IV	V-IX	Год	X-IV	V-IX	Год	прямая	рассеянная
							V-IX	V-IX
1879–1905	-0,6	15,7	6,2	-	-	600	-	-
1906–1940	-0,4	15,6	6,4	328	394	722	-	-
1941–1976	-0,5	15,6	6,3	285	318	603	1352	1351
1977–1998	0,3	15,7	6,7	265	374	639	1202	1316
1879–1998	-0,3	15,6	6,4	293	362	641	1277	1334
1999–2016	1,5	16,7	7,9	368	311	679	1526	1190
За период наблюдений								
1892–2016	-0,2	15,8	6,5	304	354	658	1335	1300

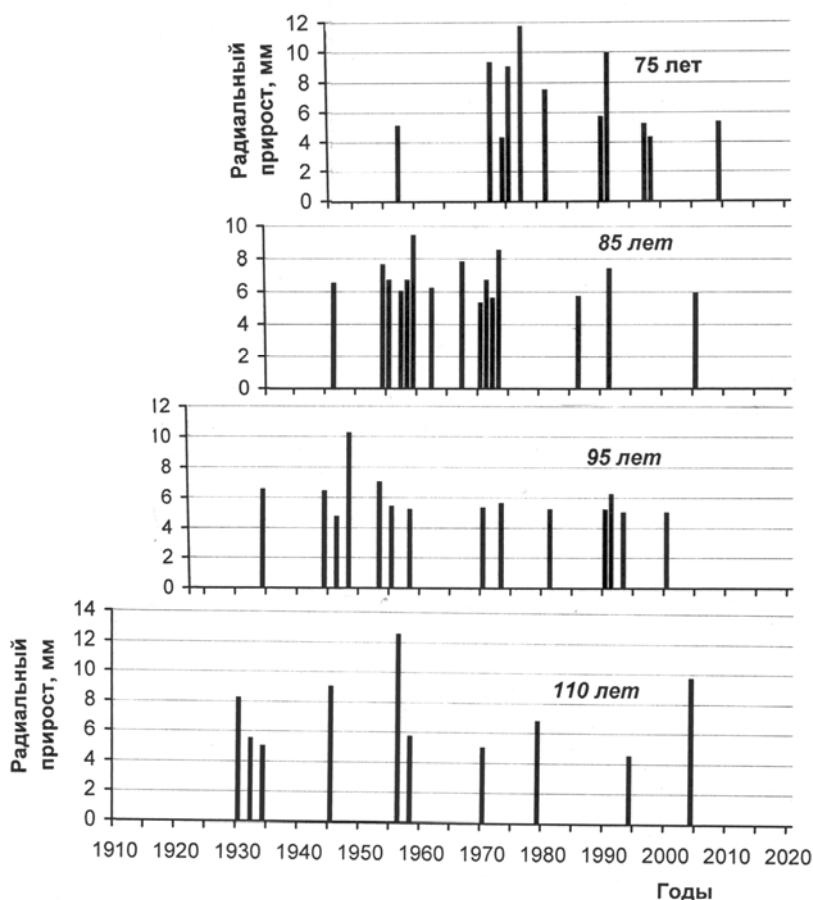


Рис. 1. Многолетний ход изменчивости внутрисериального максимального индивидуального радиального прироста ели на территории с осушительной сетью.

Ель в «островных» локалитетах на территории с осушительной сетью реализовывала свой продукционный потенциал в максимальном радиальном приросте, независимо от изменчивости климатических условий: температуры воздуха и осадков (рис. 1).

До 1998 г. диапазон максимального индивидуального радиального прироста изменялся в значительных пределах: 4,7–12,5 (110 лет), 5,0–10,2 (95 лет), 5,3–11,2 (85 лет) и 5,1–11,7 мм (75 лет). При этом значение среднего по серии радиального прироста отличались незначительно: 2,0–3,5, 1,9–3,9, 2,2–4,7 и 3,2–4,6 мм. Как и в зональных природных условиях плакора в центральной части Беларуси [Киселев и др., 2013], максимальный индивидуальный радиальный прирост деревьев в одной возрастной серии на мелиорированной территории Полесья, за редким исключением, не имел одного года привязки, а «кочевал» во времени, будучи строго индивидуальным.

Средние метеорологические показатели лет, в которые формировался индивидуальный максимальный прирост до потепления климата после 1998 г., мало отличались от средних многолетних, но диапазон изменчивости их годовых значений был значительным: по температуре за месяцы вегетационного периода от 14,5 до 17,4 и безлиственного от -2,9 до 3,4 °С, по осадкам соответственно от 146 до 452 и от 186 до 527 мм. Следовательно, максимально возможная реализация биопродукционного потенциала ели после осушительной мелиорации осуществлялась при любых метеорологических условиях, не имея при этом одновременной годичной привязки.

Увеличение притока прямой солнечной радиации при потеплении климата после 1998 г. (см. таблицу) не привело к массовому поражению ели до летних засух 1915–1916 гг. Ситуация мало изменилась: у каждой возрастной группы были свои годы, у которых максимальный индивидуальный радиальный прирост, хотя и меньшего значения, по-прежнему «кочевал» во времени по годам, различающимся по своим метеорологическим характеристикам.

Погодичный ход изменчивости сериального максимального прироста (рис. 2) синхронен с динамикой среднего по каждой серии: для 110-летней коэффициент корреляции $r=0,83$, 95-летней $r=0,5$, 85-летней $r=0,61$ и для 75-летней $r=0,55$.

Череда лет наибольшего радиального прироста и его угнетения оказалась различной для возрастных групп ели. Только в холодное трехлетие 1985–1987 гг. с морозным безлиственным периодом прослеживается его депрессия у всех поколений этой древесной породы. Выполненное ранее исследование [Киселев, Матюшевская, 2004] показало, что существует статистическая зависимость модульных коэффициентов радиального прироста ели в подсушенных мелиорацией «островных» локалитетах от температурных условий безлиственного периода. Изменчивость метеорологических величин, кроме температуры безлиственного периода, не являлась при этом определяющей для погодичной динамики стволовой продуктивности ели.

Увеличение притока прямой солнечной радиации могло активизировать продукционный процесс в нарастании стволовой массы, ярко проявившемся только у 110-летнего поколения ели в результате возможного обеспечения транспирационного тока для эвапотранспирации влагой трихогоризонта, который смогла достичь его мощная корневая система по мере понижения грунтовых вод в результате осушительной мелиорации. Это выразилось в наибольшем значении радиального прироста за все время роста и развития насаждения.

Состояние ели ухудшилось после 2014 г., приняв характер экологического бедствия для «островных» ельников в любом возрасте, включая 110-летний. Ее ослабление началось в этом самом теплом году (9,0 °С), но с морозным январем (-6,7 °С, в отдельные дни которого температура понижалась до -26 °С). Ситуация обострилась в 2015 г. Хотя зима (декабрь–февраль) этого года была теплой (-1,6 °С при

норме $-5,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 111 мм осадков), в бесснежном феврале (малоснежный покров образовался только к концу месяца) морозы достигали $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Летние засухи 1915 г. (134 мм осадков) и 1916 г. (162 мм) усугубили возникшую ситуацию. Один недобор осадков не мог привести к массовому усыханию ели. Аномальные более значимые засухи случались на Полесье раньше, но не приводили к массовому отпаду древостоя [Киселев, Матюшевская, 2004]. В качестве дополнительного лимитирующего фактора явилась прямая солнечная радиация (см. таблицу), обострившая потребность ели во влаге, которая не могла быть удовлетворена при летних засухах в измененных осушительной мелиорацией водных условиях эдафотоп.

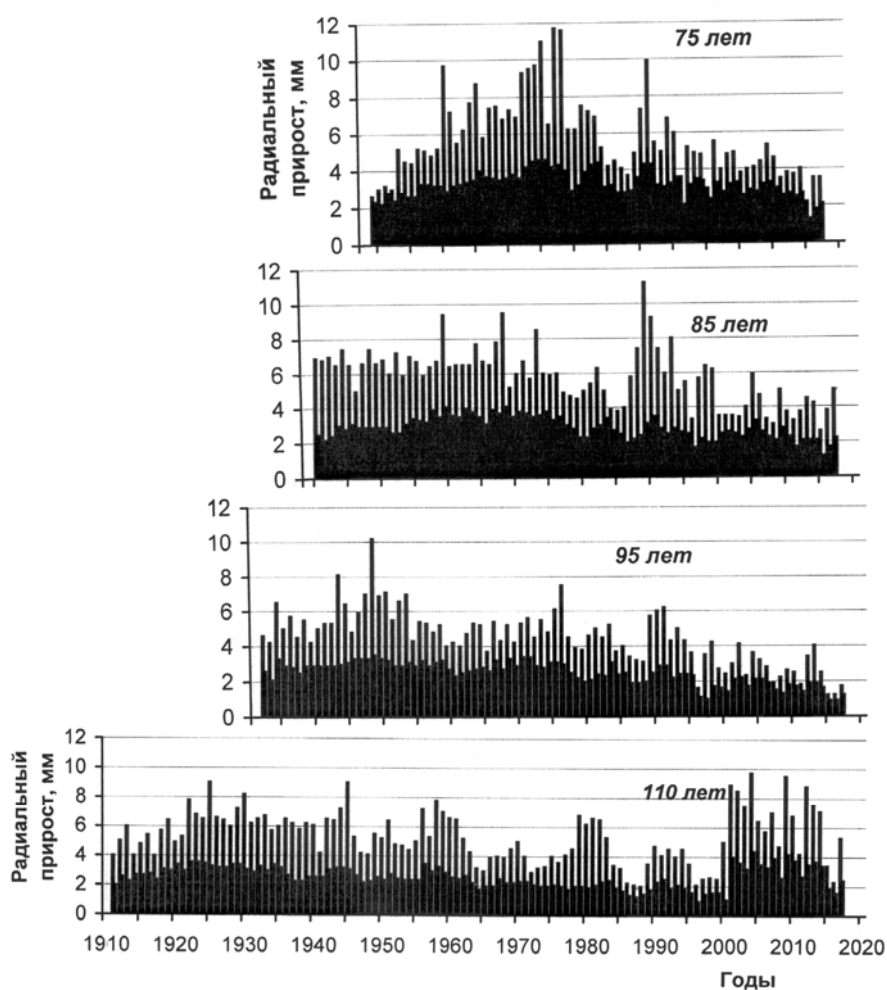


Рис. 2. Погодичный ход изменчивости максимального сериального (светлый) и среднего (полужирный) радиального прироста возрастных серий ели в «островном» локалитете на территории с осушительной сетью.

Литература

- Киселев В.Н., Матюшевская Е.В. Экология ели. – Минск: БГУ, 2004. – 217 с.
Киселев В.Н., Матюшевская Е.В., Яротов А.Е., Митрахович П.А., Ельники Белорусского Полесья в современных климатических условиях // Мелиорация. – № 1 (69). – 2013. – С. 66–79.
Киселев В.Н. Белорусское Полесье: экологические проблемы мелиоративного освоения. – Минск: Наука и техника, 1987. – 151 с.

Матюшевская Е.В. Продукционный потенциал ели для нарастания стволовой массы в природно-зональных условиях на территории Беларуси при изменяющемся климате // Проблемы изучения и сохранения растительного мира Евразии: сборник материалов II Всеросс. конф. с участием иностранных ученых. Иркутск–Кырен, 11–15 сентября 2017 г. – Иркутск: Изд. Ин-та географии им. В.Б. Сочавы, 2017. – С. 195–198.

THE SPRUCE FORESTS OF BELARUSIAN POLESIE IN THE MODERN CLIMATIC CONDITIONS AFTER LAND DRAINAGE

E.V. Matyushevskaya¹, V.N. Kiseliov², A.E. Jarotov¹, P.A. Mitrakhovich¹, S.V. Devgut¹

¹Belarusian State University, Minsk, Belarus, *katerina.vm@icloud.com*

²Belstatepeduniversity, Minsk, Belarus, *kiselev-vn@yandex.ru*

Abstract. Spruce forests of the Belarusian Polesie are an indicator of forest degradation in this region under current climatic conditions after drainage. An additional limiting factor was the increase in direct solar radiation during the summer droughts of 2015-2016.

Keywords: *Belarusian Polesie, spruce, radial growth, climate, land drainage*

ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ФОТОСИНТЕЗА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

Т.А. Михайлова¹, О.В. Калугина¹, О.В. Шергина¹, Л.В. Афанасьева²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, mikh@sifibr.irk.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Улан-Удэ, Россия, afanl@mail.ru

Аннотация. Исследовали фотосинтез хвои сосны на территории Южного Предбайкалья в условиях воздействия антропогенных факторов. Показано, что аэротехногенное загрязнение оказывает значительный негативный эффект на первичные процессы фотосинтеза, то есть на осуществление фотохимических реакций. Воздействие почвенной рекреационной нагрузки на фотосинтез косвенное – через создание неблагоприятных эдафических условий произрастания деревьев.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, фотосинтез, аэротехногенное загрязнение, рекреационная нагрузка

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1094-1098

Проведены исследования структурных и функциональных показателей фотосинтеза хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на территории Южного Предбайкалья в условиях воздействия антропогенных факторов – техногенного загрязнения и рекреационной нагрузки. Полевые исследования проводили в сосняках разнотравных путем закладки пробных площадей (ПП) с использованием отечественных и зарубежных методик [Методы ..., 2002; Manual ..., 2010]. Обследовались древостои сосны, подвергающиеся воздействию техногенных эмиссий промышленных центров Иркутской области (ПП 1-5), а также древостои, испытывающие рекреационную нагрузку на почвенный покров в пределах Прибайкальского национального парка (ПП 6-9). Фоновыми служили ПП 10 и 11, не подпадающие под основной перенос аэровыбросов и характеризующиеся минимальной рекреационной нагрузкой. Уровень загрязнения древостоев на ПП 1-5 оценивался по содержанию в хвое элементов-поллютантов (табл. 1). На ПП 1, расположенной в окрестностях крупного транспортного узла, в хвое сосны высоко содержание практически всех поллютантов, за исключением цинка; на ПП 2, находящейся вблизи алюминиевого завода, особенно значимо загрязнение фторидами, аэрозолями

Таблица 1.

Концентрации химических элементов (мг/кг от сухой массы) в хвое сосны на техногенно загрязняемых ПП

Элемент	Пробные площади (ПП)					
	Фоновые ПП	ПП 1	ПП 2	ПП 3	ПП 4	ПП 5
F	10,2±1,6	37,5±2,7	85,1±10,4	28,1±0,8	26,2±1,8	20,8±1,3
S	252±18	612±33	572±62	693±42	511±52	581±23
Al	125±10	454±62	695±115	238±46	182±34	439±41
Fe	86±12	588±111	188±22	353±70	323±45	441±21
Zn	40,5±2,3	41,3±1,1	48,3±2,9	47,4±0,9	59,3±4,9	39,9±0,9
Pb	0,15±0,02	0,85±0,05	0,22±0,01	0,76±0,01	0,66±0,02	0,72±0,01
Cd, ×10 ⁻²	1,60±0,11	4,54±0,43	4,91±0,94	1,65±0,33	1,14±0,16	2,44±0,10
Hg, ×10 ⁻²	0,52±0,10	1,13±0,12	0,73±0,14	0,91±0,13	9,11±0,40	0,50±0,17

алюминия; вблизи ТЭЦ (ПП 3) в хвое выявляется высокий уровень серы; в окрестностях крупного химического предприятия (ПП 4) в хвое резко возрастает накопление ртути; вблизи угледобывающего центра (ПП 5) в хвое также повышено содержание многих элементов-поллютантов. Основным негативным фактором, влияющим на состояние древостоев сосны, произрастающих в рекреационных зонах (ПП 6-9), является значительная нарушенность почвенного покрова, особенно верхних горизонтов Ad и A (табл. 2). Их плотность увеличивается в среднем на 60-80%, в то же время снижаются другие физические параметры – влажность, пористость и аэрация, соответственно, на 45, 35 и 70%. Наибольшие нарушения почвы выявляются на ПП 6, расположенной на о. Ольхон вблизи пос. Хужир. Кроме того, на этих ПП регистрируются изменения в составе ППК, в частности, уменьшение обменных форм калия и магния, а также снижение буферности на 40-50% в сравнении с фоновой почвой.

Таблица 2.

Физические параметры верхних горизонтов серых лесных почв при высокой рекреационной нагрузке

Параметры	Пробные площади				
	Фоновые ПП	ПП 6	ПП 7	ПП 8	ПП 9
Плотность сложения горизонта Ad, г/см ³	0,71	1,15	1,20	1,28	0,96
Плотность твердой фазы горизонта Ad, г/см ³	1,91	2,73	1,96	2,71	2,36
Естественная влажность горизонта Ad, %	48,90	28,70	41,20	25,40	28,30
Нарушение органической толщи горизонтов Ad и A, %	5,00	60,00	15,00	55,00	40,00
Пористость горизонта Ad, %	70,30	44,50	68,60	48,20	53,60
Аэрация горизонта Ad, %	48,30	12,50	41,50	15,80	44,60

Негативное влияние обоих факторов на фотосинтез сосны оценивалось по изменению комплекса репрезентативных параметров: содержания хлорофиллов и каротиноидов в хвое, соотношения пигментов, процентного содержания хлорофиллов в светособирающем комплексе (ССК), флуоресценции хлорофилла.

Обнаружено, что в хвое деревьев сосны при воздействии рассматриваемых негативных факторов происходит уменьшение общего фонда пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) в сравнении с хвоей деревьев на фоновых ПП. При расчете количества пигментов на массу одной хвоинки в условиях техногенного загрязнения выявлена тенденция к снижению уровня хлорофилла *a* максимально на 18%, хлорофилла *b* – на 38%, каротиноидов – на 40% от фонового, в условиях рекреационной нагрузки максимальное снижение составляло, соответственно, 16, 32 и 36%. При расчете содержания пигментов на массу хвои побега 2-го года жизни отмечается более резкое уменьшение концентрации как хлорофиллов, так и каротиноидов (рисунок). Наибольшее падение уровня пигментов зарегистрировано на техногенно загрязняемых территориях (ПП 1-5), а также на ПП 6, характеризующейся очень высокой рекреационной нагрузкой. Такое уменьшение количества пигментов в расчете на массу хвои побега коррелирует с ухудшением их морфоструктурных параметров, то есть сокращением фотосинтезирующей поверхности за счет снижения длины побегов и числа хвоинок на них, уменьшения массы и длины самих хвоинок. На биохимическом уровне эти изменения в значительной мере обусловлены снижением содержания органического вещества в хвое, о чем можно судить по недостаточному количеству в ней углерода, его уровень в 1,5–2,5 раза ниже фонового. На нарушение стабильной

работы фотосинтетического аппарата указывает также изменение соотношения хлорофиллов и каротиноидов в хвое (табл. 3). По своим функциональным свойствам молекулы пигментов различаются, поэтому для поддержания нормального уровня фотосинтеза и сопряженных энергетических процессов соотношение фотосинтетических пигментов должно быть стабильным. При расчете этого соотношения на массу одной хвоинки показано, что в фоновых условиях оно равно 4,1, в то время как при высокой рекреационной нагрузке увеличивается до 5,6, при техногенном загрязнении – до 5,8. Происходит это преимущественно за счет снижения количества каротиноидов. Кроме того, на всех ПП, подвергающихся антропогенному воздействию, отмечается увеличение соотношения хлорофиллов, что в основном обусловлено падением уровня хлорофилла *b*.

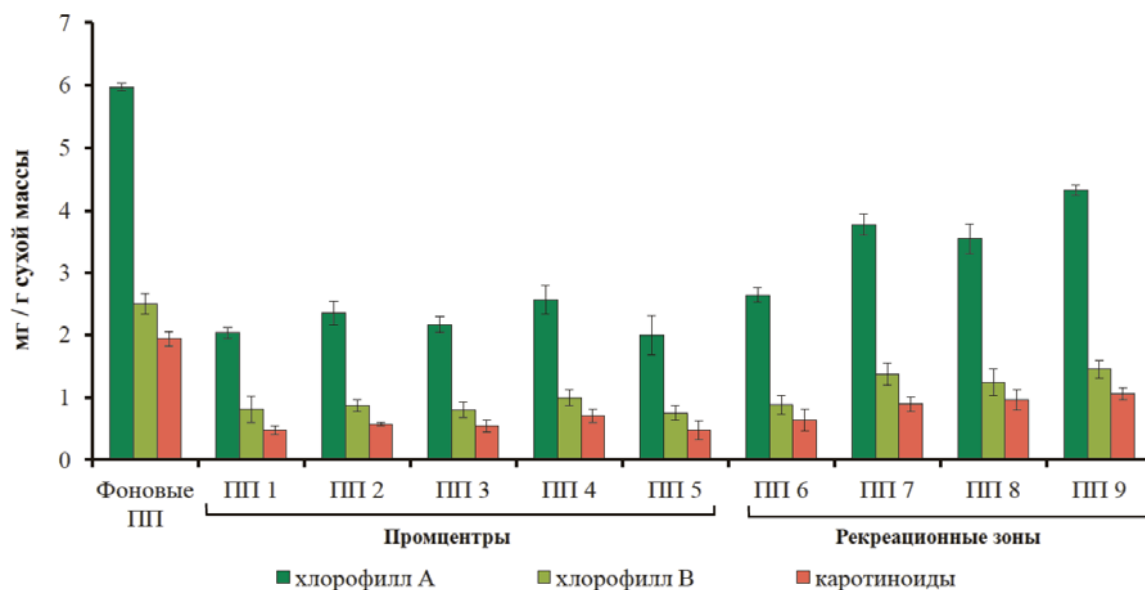


Рис. 1. Содержание пигментов в хвое сосны вблизи промцентров и в рекреационных зонах в расчете на массу хвои одного побега второго года жизни.

Таблица 3.

Соотношение пигментов в хвое сосны в условиях техногенного загрязнения и рекреационной нагрузки

Пробные площади	Соотношение пигментов		Содержание хлорофиллов в ССК, %
	$\frac{\Sigma(\text{хл. } a + \text{хл. } b)}{\text{каротиноиды}}$	$\frac{\text{хл. } a}{\text{хл. } b}$	
Фоновые ПП	4,1	2,3	66,1
Промышленные центры			
ПП 1	5,8	3,1	53,5
ПП 2	5,1	3,1	55,1
ПП 3	5,2	2,8	57,6
ПП 4	5,0	3,0	55,1
ПП 5	5,5	2,7	59,8
Рекреационные зоны			
ПП 6	5,6	3,0	55,00
ПП 7	5,3	2,8	58,26
ПП 8	4,8	2,8	57,89
ПП 9	5,3	3,0	55,00

Расчет процентного содержания хлорофиллов в ССК от общего фонда зеленых пигментов хвои выявил снижение этого показателя, максимально на 20% (см. табл. 3). Эти результаты свидетельствуют о снижении светопоглощающих свойств фотосинтетического аппарата, поскольку основная функция пигментов ССК состоит в поглощении и передаче энергии квантов света в реакционные центры. Снижение пула пигментов в ССК косвенным образом указывает на меньшее расходование поглощаемой энергии на фотохимические процессы, при этом должен снижаться квантовый выход фотосистемы II и увеличиваться интенсивность флуоресценции, что и было обнаружено. В частности, показатель $Y(II)$ в условиях техногенного загрязнения снижался на 19-20%, а эффективность нефотохимического тушения $Y(NPQ)$, то есть квантового выхода энергии, рассеиваемой в виде флуоресценции, возрастала с 0.581 до 0.630 усл. ед. При определении показателя Fv/Fm , характеризующего максимальную эффективность использования энергии света реакционными центрами фотосистемы II, выявлено статистически значимое его изменение – снижение в хвое деревьев в условиях техногенного загрязнения (0.802 усл. ед.) в сравнении с фоновым значением (0.810 усл. ед.). Считается, что сниженные значения Fv/Fm наблюдаются в условиях стресса и указывают на уменьшение активности реакционных центров фотосистемы II и угнетение процесса фотосинтеза [Maxwell, Johnson, 2000]. В условиях рекреационной нагрузки квантовый выход фотосистемы II снижался на 12-15%, а величина нефотохимического тушения возрастала на 10-11%. Отсюда следует, что больший негативный эффект на первичные процессы фотосинтеза, то есть на осуществление фотохимических реакций, оказывает техногенное загрязнение.

В целом полученные данные свидетельствуют, что оба фактора значимо нарушают фотосинтез сосны, что приводит к подавлению ростовых процессов деревьев и в конечном итоге к снижению их продуктивности [Михайлова и др., 2017]. При аэротехногенном загрязнении поллютанты действуют на фотосинтетический аппарат напрямую, то есть нарушение начинается с первичных процессов фотосинтеза (световой фазы). Поскольку многие токсиканты обладают свойствами сильных окислителей – свободных радикалов, они могут вызвать появление автокаталитических цепных реакций свободнорадикального и фотодинамического окисления, что в свою очередь, может привести к окислительному повреждению мембраны [Николаевский, 2002; Рубин, Кренделева, 2003]. Снижение уровня пигментов и изменение их соотношений может происходить из-за их разрушения и/или подавления синтеза. Воздействие почвенной рекреационной нагрузки на фотосинтез косвенное – через создание неблагоприятных эдафических условий произрастания деревьев, что вызывает нарушение режима их питания и водообмена, вследствие разбалансировки метаболизма происходит подавление синтеза многих органических веществ, в том числе пигментов.

Литература

Методы изучения лесных сообществ. Санкт-Петербург: Научно-исследовательский институт химии Санкт-Петербургского ун-та, 2002. – 240 с.

Михайлова Т. А., Калугина О. В., Шергина О. В. Динамика состояния сосновых лесов Предбайкалья в условиях воздействия антропогенных факторов // Сибирский лесной журнал. – 2017. – № 1. – С. 44–55.

Николаевский В.С. Экологическая оценка загрязнения среды и состояния наземных экосистем методами фитоиндикации. Пушкино: ВНИИЛМ, 2002. – 220 с.

Рубин А.Б., Кренделева Т.Е. Регуляция первичных процессов фотосинтеза // Успехи биологической химии. – 2003. – Т. 43. – С. 225–266.

Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests // UNECE, ICP Forests Programme Coordinating Centre. – Hamburg, 2010. – 477 p.

Maxwell K., Johnson G.N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide // Journal Experim. Bot. – 2000. – 51. – P. 659–668.

ALTERATION OF PHOTOSYNTHESIS PARAMETERS IN SCOTS PINE UNDER ANTHROPOGENIC INFLUENCE

T.A. Mikhailova¹, O.V. Kalugina¹, O.V. Shergina¹, L.V. Afanasieva²

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *mikh@sifibr.irk.ru*

²Institute of General and Experimental Biology of the Siberian Branch of the RAS, Ulan-Ude, Russia, *afanl@mail.ru*

Abstract. The study was carried out in the Southern Prebaikalia region (Russia) in the territories effected by anthropogenic factors – aerotechnogenic pollution and recreational load on the soil cover. It was shown that both factors significantly impair the pine needle photosynthesis. Pronounced negative effect on the primary photosynthesis processes, that is on the proceeding photochemical reactions, was found under aerotechnogenic pollution. The effect of soil recreational load on photosynthesis was indirect – through the creation of unfavorable edaphic conditions for the trees growth.

Keywords: *scots pine, photosynthesis, aerotechnogenic pollution, soil recreational load*

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ОТКЛИК В ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ АМАРАНТА НА ДЕЙСТВИЕ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ КАДМИЯ И ЦИНКА В СРЕДЕ

Н.Г. Осмоловская, В.З. Ву, Т.Е. Билова, Л.Н. Кучаева, Н.Ф. Попова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия, natalia_osm@mail.ru

Аннотация. С использованием метода ГХ-МС исследован метаболический отклик в органах 42-дневных растений амаранта хвостатого *Amaranthus caudatus* L. на воздействие 90 мкМ Cd и 300 мкМ Zn в условиях водной культуры. Показана зависимость метаболического отклика в листьях амаранта от возраста листа. Ключевыми метаболитами в отклике на Cd и Zn в корнях и молодых листьях явились сахара, а в зрелых листьях органические кислоты - оксалат и малат, что свидетельствует об их функциональной роли в механизмах устойчивости амаранта к стрессовому действию Cd и Zn.

Ключевые слова: амарант, кадмий, цинк, органические кислоты, метаболический отклик, металлоустойчивость

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1099-1102

Кадмий и цинк входят в число широко распространенных загрязнителей среды и в высоких концентрациях могут оказать множественное повреждающее действие на растительный организм. Однако растения способны в определенной степени противостоять ему с помощью разнообразных адаптационных механизмов [Титов и др., 2014], что определяет важность изучения ответных реакций растений, вовлекаемых в формирование их устойчивости стрессовому действию тяжелых металлов. В последние годы одним из актуальных подходов к изучению стрессоустойчивости растений становится исследование ответных реакций растений на уровне метаболома. Наиболее широко для целей анализа растительных метаболитов используется метод газовой хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (ГХ-МС) [Kim et al., 2011].

В нашей работе объектом для исследования метаболического отклика растений на действие Cd и Zn были выбраны растения амаранта, проявляющего, согласно [Fan et al., 2009], устойчивость к действию этих металлов. Важным свойством амаранта является аккумуляция в надземных органах значительных количеств оксалата, играющего принципиальную роль в формировании ионного гомеостаза в листьях этого растения [Осмоловская и др., 2007]. Однако возможность участия оксалата и других органических кислот в механизмах устойчивости амаранта к действию тяжелых металлов остается мало изученной. В этой связи нами был проведен анализ метаболитных профилей в экстрактах из зрелых и молодых листьев и из корней 42-дневных растений амаранта хвостатого *Amaranthus caudatus* L., сорт Kawa dauta, выращенных в водной культуре и подвергнутых 7-суточному воздействию высоких концентраций Cd (90 мкМ) и Zn (300 мкМ) в среде. Отмечено, что внесение металлов затормозило прирост сырой биомассы растений, однако значительного ингибирования прироста сухой биомассы не наблюдалось.

Подготовка проб для анализа состава и определения концентраций метаболитов включала получение метанольных экстрактов, их высушивание, растворение в пиридине, силилирование и анализ триметилсилильных производных с помощью газового хроматографа Agilent 6850GC с масс-селективным детектором 5975C (США) и на газовом хромато масс-спектрометре GCMS-QP2010 Plus фирмы SHIMADZU. В исследуемых пробах растений было аннотировано от 64 до 76 метаболитов, среди которых углеводы, органические и аминокислоты, жирные кислоты и ряд других

низкомолекулярных метаболитов. Статистическая обработка массива полученных данных, выполненная с использованием метода главных компонент, показала достоверность распределения точек, отвечающих вариантам контроля, 90 мкМ Cd и 300 мкМ Zn, по 3-м классам для каждого органа, что свидетельствовало о значимости происходящих в них биохимических перестроек. Для всех построенных моделей отмечен высокий процент объясненной дисперсии, составивший в разных органах от 38% до 65% для компоненты PC1 и от 24% до 39% для компоненты PC2. Визуализация концентраций низкомолекулярных метаболитов, выделенных из листьев и корней *A. caudatus*, выполненная с использованием методов мультивариационной статистики и с помощью построения теплокарт, позволила выявить увеличение уровней одних и снижение уровней других метаболитов в органах амаранта относительно контроля под влиянием 7 сут экспонирования растений в присутствии Zn и Cd. Анализ метаболитных профилей позволил выявить различия в характере биохимических перестроек, происходящих в корнях и надземных органах растений амаранта в ответ на действие ТМ стресса, и показать их сопряженность с природой механизмов, функционирующих на уровне корней и листьев для обеспечения металлоустойчивости растений. Количественная оценка содержания 14 принципиально значимых метаболитов в экстрактах из органов *A. caudatus* позволила выявить ключевые соединения, внесшие максимальный вклад в метаболический отклик этого растения на стрессовое действие Cd и Zn (рисунок). Согласно результатам исследования, основная роль в метаболическом отклике корней *A. caudatus* принадлежит сахарам, тогда как в листьях приоритет принадлежит органическим кислотам.

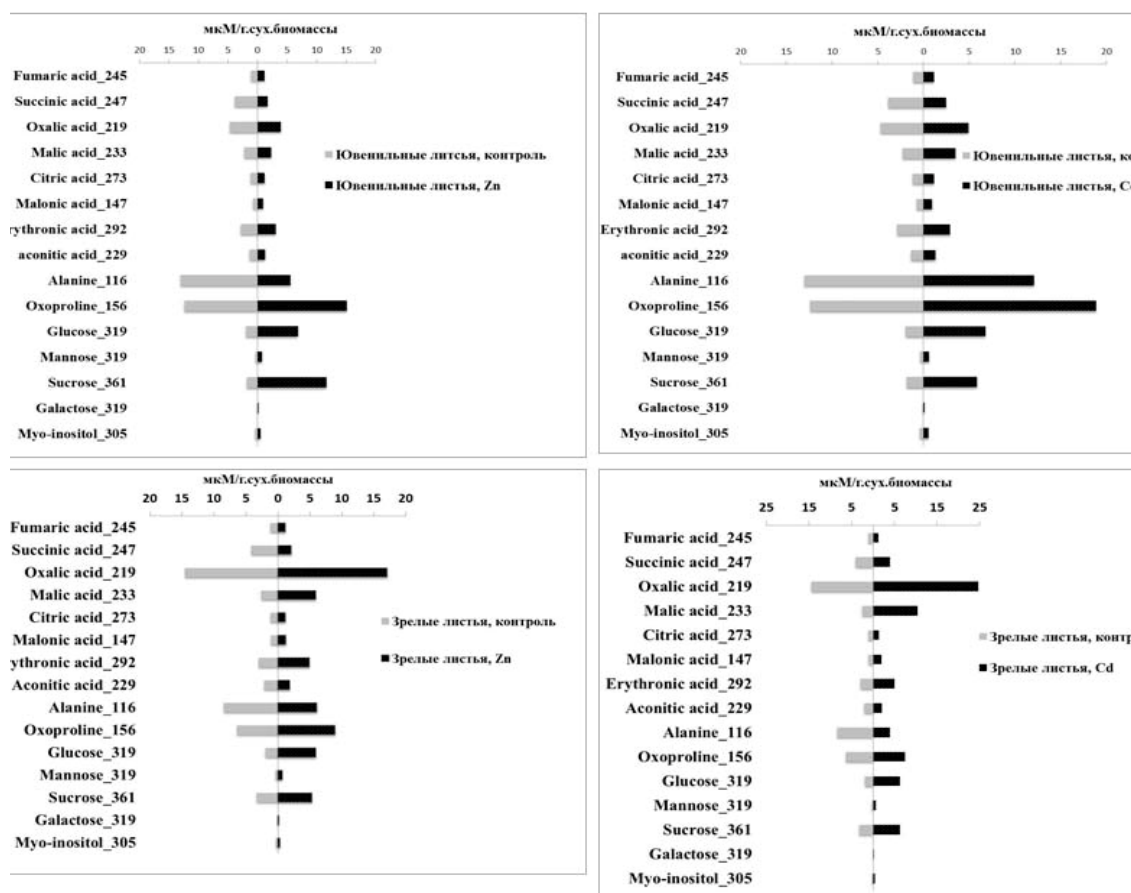


Рисунок. Содержание ключевых метаболитов в молодых и зрелых листьях

Реакция на воздействие металлов со стороны углеводов в целом оказалась универсальной в листьях обоих возрастов и проявилась в виде возрастания уровней глюкозы, фруктозы, сахарозы, а также маннозы и галактозы, причем содержание сахарозы и галактозы в молодых листьях амаранта возрастало сильнее на фоне Zn, чем Cd. Вместе с тем было установлено, что относительный прирост пулов глюкозы и сахарозы в ювенильных листьях амаранта оказался выше, чем в зрелых листьях, и достигал 4-6 раз к контролю. Повышение уровней осмотически активных сахаров в ответ на стрессовое действие абиотических факторов связывают с усилением глюконеогенеза и рассматривают как результат активной метаболической регуляции [Rodziewicz et al., 2014]. Выявленное существенное увеличение пулов сахаров в метаболоме ювенильного листа амаранта, скорее всего, обусловлено усилением их переноса из зрелых донорных в акцепторные ювенильные листья для обеспечения их развития и функционирования в условиях стресса. Повышение уровня сахаров при воздействии цинка и кадмия было установлено также в корнях *A. caudatus*, что, скорее всего, явилось следствием усиления их оттока из листьев как важного энергетического и строительного ресурса для вовлечения в механизмы адаптации к стрессу. Наряду с сахарами в корнях *A. caudatus* в ответ на внесение Cd и Zn в среду отмечалось увеличение содержания фосфорной и эритроновой кислот, аланина и мио-инозитола.

Данные метаболомного анализа показали, что среди изученных метаболитов в ювенильных листьях *A. caudatus* в количественном отношении преобладают аминокислоты аланин и оксопролин, при этом уровень последней в условиях действия Cd и Zn возрастал в 1,5 и в 1,2 раза. Учитывая осмопротекторную роль пролина в механизмах стрессовой устойчивости растений [Титов и др., 2014], увеличение концентрации оксопролина в ювенильном листе можно рассматривать как важный адаптационный признак.

Было установлено, что концентрации отдельных метаболитов в листьях амаранта сильно изменяются с возрастом и в зрелом листе приоритет переходит от аминокислот к органическим кислотам. Показано, что при воздействии Cd и Zn содержание органических кислот, в первую очередь, оксалата и малата, существенно повышалось в листьях амаранта, при этом стимулирующий эффект металлов в зрелых листьях был намного выше, чем в ювенильных (рисунок). Наибольший по величине пул оксалата в зрелом листе возрос в присутствии Cd в 1,7 раза, а Zn - в 1, 2 раза, тогда как пулы малата возросли в 4 и в 2 раза соответственно. Данный факт можно трактовать как показатель интенсификации цикла Кребса в зрелых листьях, способствующей генерированию восстановительных агентов и АТФ, а также углеродных скелетов для синтеза аминокислот и белка, на что указывали авторы некоторых работ [Keunen et al., 2010; Xie et al., 2014]. Выявленное количественное доминирование оксалата среди всех аннотированных метаболитов в зрелых листьях амаранта свидетельствует в пользу ранее установленной нами принципиальной роли этой кислоты в поддержании ионного баланса в листьях амаранта [Осмоловская и др., 2007] и позволяет говорить о важности оксалата как детоксикатора, прежде всего, кадмия, в листьях *A. caudatus*.

Среди метаболитов, содержание которых, согласно данным метаболомного анализа, заметно возрастало под воздействием Cd и Zn, следует отметить также повышение концентраций ряда жирных и ароматических кислот в листьях *A. caudatus*, в частности, феруловой, азеалиновой и адипиновой кислот, которые, по некоторым данным, могут выполнять антиоксидантную или сигнальную функцию в растениях [Boz, 2015].

Обобщая результаты проведенного исследования, можно заключить, что различия в направленности биохимических перестроек в корнях и листьях растений амаранта, выявленные в ответ на стрессовое действие высоких концентраций Cd и Zn, очевидно,

во многом обусловлены спецификой процессов, участвующих в детоксикации этих металлов, и вовлечением исследуемых метаболитов в различные пути адаптации растений к Cd и Zn стрессу. Усиление притока сахаров в корни может способствовать поддержанию структуры и катионообменных свойств апопласта, что является принципиально важным для обеспечения эффективного связывания и детоксикации ионов ТМ на уровне клеток корней и реализации ими стратегии эксклюдера. Установленная ориентированность биохимических перестроек, происходящих в зрелых листьях, на интенсификацию обмена органических кислот и преимущественную аккумуляцию в них малата и оксалата, сопряжена с их очевидным участием в хелатировании и детоксикации ионов Cd²⁺ и Zn²⁺ на уровне листа и подтверждает принципиальную роль органических кислот в механизмах устойчивости растений амаранта к стрессовому воздействию кадмия и цинка.

Литература

Осмоловская Н.Г., Кучаева Л.Н., Новак В.А. Роль органических кислот при формировании ионного состава листьев гликофитов в онтогенезе // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 3. – С. 381–388.

Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. – 194 с.

Boz H. Ferulic acid in cereals (Review// Czech J. Food Sci. – 2015. –V. 33, No.1. – P. 1–7.

Fan H., Zhou W. Screening of Amaranth cultivars (*Amaranthus mangostanus* L.) for cadmium hyperaccumulation // Agricultural Sciences in China. – 2009. – V. 8. – P. 342–351.

Keunen E. et al. Metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* roots and leaves to sublethal cadmium exposure are differentially influenced by alternative oxidase1a // Environ. Exp. Bot. – 2016. – V. 124. – P.64–78.

Kim S., Fang A., Wang B., Jeong J., Zhang X. An optimal peak alignment for comprehensive two-dimensional gas chromatography mass spectrometry using mixture similarity measure // Bioinformatics. – 2011. – V. 27. – P. 1660–1666.

Rodziewicz P., Swarczewicz B. et al. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes //Acta Physiol. Plant. – 2014. – V. 36. – P. 1–19

Xie Y. et al. Effects of cadmium exposure on growth and metabolite profile of Bermudagrass // PLoS ONE. – 2014. – V. 9, No. 12. – P. 1–20.

METABOLIC RESPONSE IN PLANT ORGANS OF AMARANTH TO THE EFFECT OF HIGH CONCENTRATIONS OF CADMIUM AND ZINC IN THE ENVIRONMENT

N.G. Osmolovskaya, V.D. Vu, T.E. Bilova, L.N. Kuchaeva, N.F. Popova

Saint-Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia, natalia_osm@mail.ru

Abstract. The metabolic responses in the organs of 42-day-old *Amaranthus caudatus* L. plants to the effect of 90 µM Cd and 300 µM Zn in water culture were studied using GC-MS method. It was shown that metabolic response in amaranth leaves depends on the leaf age. The key metabolites in the response to Cd and Zn in the roots and young leaves were sugars, and in the mature leaves organic acids - oxalate and malate, which indicates their functional role in the mechanisms of amaranth tolerance to the stress effect of Cd and Zn.

Keywords: *amaranth, cadmium, zinc, organic acids, metabolic response, metal tolerance*

ФИТОРЕМЕДИАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕКОТОРЫХ ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ГОРОДСКИХ ПОЧВ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Н.Г. Осмоловская, В.Ю. Самута, М.В. Богомазова, О.Н. Кузина, В.В. Куриленко

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия, natalia_osm@mail.ru

Аннотация. Исследованы особенности аккумуляции Zn, Cu, Pb, Fe в корнях и надземных органах однолетних декоративных растений – бархатцев *Tagetes patula*, цинерарии *Cineraria maritime* и календулы *Calendula officinales* с целью оценки перспективности их использования для технологий фиторемедиации. На основании модельных экспериментов и натуральных исследований заключается, что эти растения могут рассматриваться в качестве кандидатов для целей фиторемедиации городских почв, загрязненных тяжелыми металлами. Показана предпочтительность использования растений, находящихся в фазе активной вегетации.

Ключевые слова: фиторемедиация, цинк, свинец, медь, железо, *Tagetes patula*, *Cineraria maritime*, *Calendula officinales*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1103-1105

Проблема загрязнения почв, в том числе, городских, тяжелыми металлами (ТМ) остается актуальной, несмотря на разработки различных путей ее решения. Одним из перспективных подходов является технология фиторемедиации, основанная на очистке почв от поллютантов с использованием растений [Salt et al., 1998; Галиулин, Галиулина, 2003; Прасад и др., 2009]. Много внимания при этом уделяется исследованию металл-аккумулирующей способности разных видов растений и оценке их фиторемедиационного потенциала. Среди кандидатов на роль фиторемедиаторов преобладают как узкоспециализированные, но имеющие малую биомассу гипераккумуляторы отдельных ТМ (*Brassica juncea*, *Thlaspi caerulescens*, *Thlaspi rotundifolium*, *Alyssum sp.* и др.) [Salt et al., 1998; Baker et al., 2000; Sarma, 2011], так и быстрорастущие сельскохозяйственные культуры [Rossi et al., 2002]. Однако, использование последних вряд ли приемлемо для фиторемедиации загрязненных почв на территории мегаполиса. В данном случае более целесообразным представляется акцентировать внимание на оценке металл-аккумулирующего потенциала растений, традиционно используемых для озеленения городских территорий и проявляющих устойчивость к техногенному загрязнению, в частности, декоративно-цветочных растений.

Нами были исследованы особенности аккумуляции ряда тяжелых металлов (Zn, Cu, Pb, Fe) в корнях и надземных органах однолетних цветочных растений – бархатцев *Tagetes patula*, цинерарии *Cineraria maritime* и календулы *Calendula officinales* с целью оценки перспектив их использования для технологий фиторемедиации. Эксперименты по воздействию ТМ и их аккумуляции в органах *Tagetes patula* проводили на растениях, выращиваемых условиях водной культуры на питательном растворе. Для исследования использовали 9- недельные и 14- недельные растения *Tagetes patula*, находящиеся в фазе соответственно вегетативного роста или цветения. ТМ – Zn и Pb вносили в питательные растворы в одинаковой концентрации 200 мкмоль/л в форме $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ и $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$. Время воздействия ТМ на растения составило 7 суток.

Показано, что корневая система декоративных растений характеризуется большей способностью к аккумуляции ТМ, чем их надземные органы. Вегетирующие растения

Tagetes patula аккумулировали Zn и Pb интенсивнее, чем растения в фазу цветения, при этом уровни Pb в корнях вегетирующих и цветущих растений были выше, чем Zn и достигали 15800 мкг/г и 9764 мкг/г сухой биомассы соответственно, а уровни Zn – 4950 мкг/г и 1359 мкг/г. Одновременно показана высокая эффективность перераспределения цинка в надземную часть растений *Tagetes patula*, в результате чего концентрация Zn в листьях вегетирующих растений достигала 920 мкг/г, а в листьях цветущих – 640 мкг/г. Значимый перенос Pb в побег был отмечен только у растений, находящихся в фазе цветения, где он составил 128 мкг/г против 20 мкг/г у вегетирующих растений, что говорит о высокой способности последних ограничивать перенос Pb в побег. Изучение динамики накопления Cu, Zn, Pb органами *Tagetes patula* показало, что интенсивное заполнение сайтов связывания в корнях ионами тяжелых металлов происходит в течение 1-х суток воздействия, при продолжении воздействия ТМ до 7 суток наблюдается их перераспределение в надземную часть растений.

Установлено, что внесение Zn и Pb повлияло на поглощение и аккумуляцию Fe корнями *Tagetes patula*. Цинк до 2 раз стимулировал поступление железа в корни и его перенос в побег, тогда как свинец, напротив, снижал поступление и транспорт железа по растению, что подтверждает представления об антагонизме таких металлов, как Pb и Fe, и синергизме Zn и Fe [Кабата-Пендиас, Пендиас, 1989]. Увеличение дозы фосфорного удобрения в форме фосфата калия снижало вдвое поглощение как Pb, так и Zn корнями *Tagetes patula*, что очевидно, связано с образованием биологически менее доступных форм этих металлов. Однако, еще более сильное ингибирование поглощения Pb наблюдалось в ответ на повышение дозы KNO₃ в среде, в то время как поступление Zn в растения не зависело от увеличения концентрации в ней KNO₃.

В литературе много внимания уделяется исследованию роли хелатирующих агентов в повышении способности растений поглощать и транспортировать тяжелые металлы в надземные органы [Evangelou et al., 2007]. В отличие от сообщений ряда авторов, наши эксперименты показали, что использование в фазу вегетации в качестве хелаторов малата и цитрата в концентрации 2 ммоль/л в форме калиевых солей привело к снижению содержания цинка в корнях *Tagetes patula* в 1,7 и в 1,4 раза по сравнению с контролем, а также существенно (до 4 и 5,2 раз) затормозило перенос Zn в листья. Отмеченный эффект хелаторов был выражен еще сильнее в отношении аккумуляции свинца корнями, которая снизилась в 2,6 и в 3,3 раза под влиянием внесения малата и цитрата соответственно. В то же время перенос Pb в надземные органы *Tagetes patula* увеличился в присутствии малата (но не цитрата) в 2,5 раза. Полученные данные позволяют говорить о снижении связывания Zn и Pb корнями растений ввиду очевидно меньшей афинности хелатированных форм этих металлов к отрицательно заряженным сайтам клеточных стенок. С другой стороны, выявлен положительный эффект использования малата для перемещения поглощенного свинца в листья *Tagetes patula*, свидетельствующий в пользу возможного участия малата в дальнем транспорте Pb по ксилеме.

Исследования, выполненные на *Calendula officinales* и *Cineraria maritime*, показали что календула, как и бархатцы, достаточно эффективно переносит Zn в надземные органы, тогда как цинерарию отличает более интенсивный в сравнении с другими растениями перенос меди в побег, что нашло подтверждение и при анализе декоративных растений, произрастающих на загрязненных ТМ почвах в разных районах города. При этом были также выявлены некоторые закономерности сезонного распределения и перераспределения тяжелых металлов в органах декоративных растений. Так, установлено резкое, до 10-20 раз снижение содержания Cu в корнях растений *Tagetes patula* и *Cineraria maritime* в период с июня до начала сентября при одновременном возрастании содержания в них Fe (в 2-4 раза), возможно,

обусловленном его оттоком из листьев в корни в конце вегетационного периода. Иная закономерность наблюдалась в распределении Zn, уровни концентрации которого сезонно возрастали как в корнях *T. patula* и *C. maritime*, в среднем, в 2 раза, так и в листьях этих растений.

Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что декоративные растения можно рассматривать в качестве кандидатов для целей фиторемедиации в условиях загрязнения городской среды тяжелыми металлами. В то же время полученные данные свидетельствуют, что для фиторемедиационной очистки почв целесообразнее использовать декоративные растения, находящиеся в фазе активного вегетативного роста.

Литература

Галиулин Р.В., Галиулина Р.А. Очистка почв от тяжелых металлов с помощью растений // Вестник Российской Академии Наук. – 2008. – Т. 78, № 3. – С. 247–249.

Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. – М.: Мир, 1989. – 440 с.

Прасад М.Н.В., Саджвана К.С., Найдю Р. (ред.). Микроэлементы в окружающей среде: биогеохимия, биотехнология и биоремедиация. – М.: Физматлит, 2009. – 816 с.

Baker A. J. M., McGrath S. P., Reeves R. D., Smith J. A. C. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils // In Phytoremediation of contaminated soil and water (Eds. Terry N., Banuelos G.) – London: Lewis Publishers, 2000. – P. 85–107.

Evangelou M.W.H. Ebel M., Schaeffer A. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents // Chemosphere. – 2007. – V. 68. – P. 989–1003.

Rossi G., Figliolia A., Socciarelli S., Pennelli B. Capability of *Brassica napus* to accumulate cadmium, zinc and copper from soil // Acta Biotechnologica. – 2002. – V. 22, No. 1-2. – P. 133–140.

Salt D. E., Smith R. D., Raskin I. Phytoremediation // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1998. – P. 643–668.

Sarma H. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology // J. of Environmental Science and Technology. – 2011. – V. 4, No. 2. – P. 118–138.

PHYTOREMEDIATION POTENTIAL OF SOME ORNAMENTAL PLANTS IN RELATION TO URBAN SOILS POLLUTION WITH HEAVY METALS

N.G. Osmolovskaya, V.Yu. Samuta, M.V. Bogomazova, O.N. Kuzina, V.V. Kurilenko

Saint-Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia, natalia_osm@mail.ru

Abstract. Features of accumulation of Zn, Cu, Pb, Fe in roots and aboveground organs of annual ornamental plants - *Tagetes patula*, *Cineraria maritime* and *Calendula officinales* were studied to assess the prospects of their use for phytoremediation technologies. Based on model experiments and field studies, these plants can be considered as candidates for the phytoremediation of urban soils contaminated with heavy metals. The preference is shown for the use of plants in the phase of active vegetation.

Keywords: *phytoremediation, zinc, lead, copper, iron, Tagetes patula, Cineraria maritime, Calendula officinales*

БИОТЕСТИРОВАНИЕ ПЕСТИЦИДОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАСТЕНИЙ И ГРИБОВ

Р.М. Островская

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия, ostrov.ram@yandex.ru

Аннотация. В работе проведено биотестирование шести пестицидов на пшенице и дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Фитотоксичность пестицидов оценивалась по влиянию на ростовые показатели пшеницы и активность каталазы, токсичность для дрожжей – по влиянию на активность каталазы и интенсивность спиртового брожения. Исследована также фитотоксичность водных вытяжек из почвы, в которую были введены гербициды. Обсуждаются полученные результаты.

Ключевые слова: пестициды, биотестирование, фитотоксичность, каталаза, интенсивность спиртового брожения

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1106-1110

По данным Chemical Abstracts Service от 03.08.2015 г. официально зарегистрировано более 101 миллиона органических и неорганических соединений [<https://www.cas.org>]. Более трети из этих веществ находится в хозяйственном обороте с разными целями, их применение регламентируется соответствующими документами. Помимо использования в различных отраслях промышленности как технологических продуктов, в сельском хозяйстве, фармакологии, косметологии, быту и т.д., они также выбрасываются в окружающую среду как промышленные отходы и составные части выхлопных газов автомобилей.

Многие из используемых веществ являются ксенобиотиками, и это, прежде всего, касается пестицидов – веществ, в основном, синтетического происхождения, имеющих разную химическую природу и предназначенных для защиты от организмов, которые наносят ущерб растениеводству и животноводству, вызывают ухудшение качества сельскохозяйственной продукции, материалов и изделий, а также являются паразитами и переносчиками опасных заболеваний человека. На конференции ООН по окружающей среде и развитию в 1992 г. пестициды, наряду с тяжелыми металлами, были отнесены к преобладающим в природе загрязняющим веществам [Данилов-Данильян, Лосев, 2000; Коптюг, 1992]. Высокая экологическая опасность пестицидов связана с их устойчивостью к разложению и способностью аккумулироваться в организмах, связанных трофическими отношениями [Geiger et al., 2010]. Для подавляющего большинства пестицидов характерна мутагенная и канцерогенная активность [Абилев, Глазер, 2013]. Несмотря на экологическую и генетическую опасность пестицидов и существование альтернативных методов, химический метод защиты растений на протяжении многих лет продолжает оставаться основным и наиболее эффективным.

Важнейшими классами пестицидов, обеспечивающих жизнеспособность культурных растений, а также позволяющих сохранять урожай как «на корню», так и при его хранении после уборки, являются инсектициды, гербициды и фунгициды. В настоящее время существует широкий ассортимент веществ, применяемых для защиты растений от насекомых, сорняков и грибов в условиях сельскохозяйственного производства или садово-огороднических хозяйств [Список пестицидов..., 2000]. Исследования токсичности пестицидов и отдаленных последствий их действия как для целевых организмов, являющихся мишенями действия препаратов, так и для

нецелевых видов и, в первую очередь, для защищаемых ими сельскохозяйственных растений крайне важны.

В аннотациях к коммерческим препаратам пестицидов разной направленности наряду с рекомендуемыми способами применения и концентрациями декларируется также эффективность пестицидов по отношению к целевым объектам, класс токсичности, степень безопасности для нецелевых объектов, показатели устойчивости к разрушению в природных условиях и, в частности, скорость их деструкции в почве. Всегда ли эти декларации соответствуют действительности?

В настоящей работе проведено биотестирование шести коммерческих препаратов пестицидов, три из которых представляют собой инсектициды, два – гербициды и один – фунгицид. При их выборе учитывались такие характеристики как умеренная степень токсичности, быстрое разложение в почве и, вследствие этого, безопасность для семян культурных растений, которые можно высевать уже спустя неделю после применения препаратов. В таблице приведены исследованные пестициды и диапазон использованных концентраций, в который входили рекомендованные (одна или более) для использования, а также кратно отличающиеся от рекомендованных в (+) и (–) сторону.

Исследование пестицидов проводилось на растениях (мягкая пшеница, озимая, сорт «Иркутская») и грибах (дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*). Фитотоксичность оценивали по влиянию веществ на прорастание семян и рост проростков пшеницы, а также на активность каталазы, фунгицидность – по влиянию на интенсивность спиртового брожения и активность каталазы. Критерием активности каталазы, катализирующей разложение пероксида водорода ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2 \uparrow$), служил объем пены, образующейся в результате выделения молекулярного кислорода над поверхностью реакционной смеси [Островская, 2014]. Об уровне спиртового брожения у дрожжей судили также по интенсивности пенообразования, но в этом случае, связанном с выделением CO_2 [Вятчина и др., 2015].

Для оценки влияния пестицидов на ростовые показатели растений семена пшеницы проращивали на растворах пестицидов в течение трех суток, после чего определяли долю проросших семян, а у проростков подсчитывали число корешков и измеряли их длину, также как длину coleoptilya. В качестве контроля была использована отстоянная водопроводная вода.

Все исследованные инсектициды и гербициды подавляли активность каталазы пшеницы в трехсуточных проростках пшеницы, причем раундап, цифокс и фипронил – во всем диапазоне исследованных концентраций, а децис и торнадо – при двух концентрациях: одной из рекомендованных и при максимальной.

Оба исследованных гербицида сильно ингибировали прорастание семян при всех использованных концентрациях, причем прорастание на 100% «замирало» на этапе проклевывания семян и дальнейшего роста проростков не происходило. Инсектициды также ингибировали ростовые характеристики пшеницы, но в меньшей степени, чем гербициды: эффект подавления прорастания семян и роста проростков проявлялся в прямой зависимости от концентрации препарата.

Фунгицид «Тиовит Джет» не оказал никакого влияния на прорастание семян пшеницы, его ингибирующий эффект на рост проростков оказался очень слабым, причем только при максимальной концентрации он был статистически достоверным, а в отношении активности каталазы в проростках пшеницы в результате его воздействия наблюдался даже эффект стимуляции. Таким образом, данный фунгицид практически не является фитотоксичным. В то же время фунгицид показал токсичность для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как по активности каталазы, так и по интенсивности процесса брожения, хотя эффект ингибирования был относительно небольшим. На

слабую фунгицидную активность препарата «Тиовит Джет» указывает также обнаруженный нами факт развития плесневых грибов (к настоящему времени не определены), спорами которых были заражены семена пшеницы, в ходе их проращивания, как в контроле, так и в присутствии фунгицида.

Таблица.

Характеристика использованных в работе пестицидов

Тип	Коммерческое название	Действующее вещество	Использованные концентрации
Инсектициды	Адонис	Фипронил класс фенилпиразолов	4% 0,4%* 0,08%* 0,01%* 0,04%* 0,005%* 0,004%* 0,001%* 0,0002%
	Цифокс	Циперметрин (пиретроид второго поколения)	2% 0,5% 0,1%* 0,02%* 0,004%
	Децис**	Дельтаметрин (пиретроид второго поколения)	0,005 0,0005* 0,0001 0,00005
Гербициды	Раундап**	Глифосат N-(фосфонометил)-глицин	0,006 0,0012* 0,0006 0,0001
	Торнадо**	На основе глифосата	0,125 0,025* 0,008 0,002
Фунгицид	Тиовит (Тиовит Джет)	Вододиспергируемые гранулы серы 800 г/кг	4% 0,8%* 0,3%* 0,06%

*Концентрации пестицидов, отмеченные одной звездочкой, входят в диапазон концентраций, рекомендованных к использованию.

**Для пестицидов, отмеченных двумя звездочками, концентрации выражены объемом исходного раствора вещества в мл на 1 мл воды.

Так, в одной из двух повторностей опыта, в которой семена пшеницы (в силу обстоятельств) не были подвергнуты протравливанию раствором перманганата калия перед закладкой в опыт, наблюдали 100%-ное развитие плесневых грибов во всех чашках Петри. Достаточно жесткое протравливание семян во второй повторности, хотя и уменьшило степень зараженности семян грибами, однако развитие грибов не происходило вообще только при максимальной концентрации фунгицида, тогда как при остальных трех концентрациях оно происходило в 25-50% чашек при 75% в контроле. Таким образом, данный фунгицид «не справился со своей фунгицидной задачей», и, следовательно, его описание как эффективного препарата не подтверждается в наших экспериментах.

Привлекательной характеристикой раундапа является то, что данный препарат, в соответствии с его описанием, не воздействуют на растения через почву и не препятствуют прорастанию семян, т.к. он может проникать только через листья или молодые побеги. Оказавшись в почве, раундап быстро теряет активность и разлагается на естественные природные вещества. Представляло интерес проверить истинность данного утверждения. С этой целью был поставлен опыт по исследованию фитотоксичности водных вытяжек из почвы [Антипова-Каратаева, 1966], в которую был внесен гербицид раундап в разных концентрациях. Установлено сильное ингибирующее влияние водных вытяжек из почвы на ростовые показатели пшеницы в течение всего периода исследования – от 2 до 18 дней после внесения препарата в почву. Это указывает на отсутствие декларированного быстрого разложения раундапа в почве и возможность его отрицательного влияния на культурные растения через почву в полевых условиях. Аналогичные результаты были получены и на другом гербициде – торнадо. Водные вытяжки из почвы проявляли фитотоксичность и спустя 30 суток после внесения данного гербицида при определенных концентрациях. По-видимому, для полной деструкции данного гербицида с полным исчезновением остаточных проявлений токсичности требуется, как минимум, больший срок, чем 1 месяц, который указывается в аннотации к препарату.

Полученные данные вновь указывают на риски, связанные с использованием пестицидов, подтверждают предположение о недостаточной изученности токсичности пестицидов для хозяйственно ценных растений, и указывают на целесообразность использования уже разработанных альтернативных методов защиты растений и разработки новых, включая получение устойчивых к пестицидам сортов растений методами геной инженерии. Результаты настоящего исследования свидетельствуют также о том, что реальные характеристики пестицидов далеко не всегда соответствуют тем, которые задекларированы в аннотациях к препаратам.

Литература

Абилев С.К., Глазер В.М. Генетическая токсикология: итоги и проблемы // Генетика. – 2013. – Т. 49, № 1. – С. 81–93.

Антипова-Каратаева И.Н. (ред.) Физико-химические методы исследования почв. – М.: Наука, 1966. – 200 с.

Вятчина О.Ф., Жданова Г.О., Стом Д.И., Хамаганова Е.Р. Оценка токсичности пестицидов с использованием *Saccharomyces cerevisiae* // В мире научных открытий. – 2015. – № 12.2. – С. 397–410.

Данилов-Данильян В.И., Лосев К.С. Экологический вызов и устойчивое развитие. – М.: Прогресс-Традиция, 2000. – 416 с.

Коптюг В.А. Конференция ООН по окружающей среде и развитию (Информ. обзор Рио-де-Жанейро, июнь 1992 г.). – Новосибирск: СО РАН, 1992. – 62 с.

Островская Р.М. Фитотоксичность пестицидов, применяемых для химической защиты хозяйственно ценных растений // Экосистемы озера Байкал и Восточной Азии : мат-лы Всерос. науч. конф. с междунар. участ. ФГБОУ ВПО «ИГУ»; [редкол.: А.Н. Матвеев, А.А. Приставка]. – Иркутск: изд-во ИГУ, 2014. – С. 85–87.

Список пестицидов и агрохимикатов разрешенных к применению на территории Российской Федерации, 2000 год. (Приложение к журналу "Защита и карантин растений". – 2000. – № 3. – С. 350). – М.: Колос, 2000. – 304 с.

Geiger F. et al. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland // Basic and Applied Ecology. – 2010. – V. 11, I. 2. – P. 97–105.

THE BIOTESTING OF THE PESTICIDES BY THE USING OF PLANTS AND FUNGI

R.M. Ostrovskaya

Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, *ostrov.ram@yandex.ru*

Abstract. In the study it was conducted the biotesting of six pesticides on the wheat and yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The pesticide was evaluated by the effect on the wheat growing features and the catalase activity, the toxicity for yeast – by the catalase activity and the intensity of ethyl-alcohol fermentation. The phytotoxicity of the aqueous extracts from the soil with introduced herbicides was also investigated. The results obtained are discussed.

Keywords: *pesticide, biotesting, phytotoxicity, catalase activity, intensity of ethil-alcohol fermentation*

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПОЧВЕННОГО МИКРОБНОГО КОМПЛЕКСА И СОСТОЯНИЯ АГРОЭКОСИСТЕМ В УСЛОВИЯХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ И ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Л.В. Помазкина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, lvp@sifibr.irk.ru

Аннотация. В агроэкосистемах Байкальского региона на загрязненных тяжелыми металлами аллювиальных почвах ежегодно (1992-2005 гг.) изучали влияние климатических факторов на содержание С мик и эмиссию CO₂ из почв. Выявлена зависимость эмиссии CO₂ от температуры воздуха, особенно в аномальные годы. Изменения экофизиологических показателей (С мик/С орг, % и С-CO₂/С мик, мг/г ч) и трансформации углерода в разных по содержанию гумуса почвах показали неодинаковую устойчивость их микробного комплекса. Анализ результатов на основе методологии сравнительного и системного анализа выявил зависящие от изменения факторов среды режимы функционирования агроэкосистем.

Ключевые слова: *загрязнение почв, микробная трансформация углерода, функционирование агроэкосистем*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1111-1115

Решение экологических проблем требует новых парадигм, особенно в развитии агроэкологии, заслуживающей внимания в условиях современных изменений окружающей среды. Однако, фундаментальные концепции в изучении агроэкосистем, функционирование которых зависит от природных и антропогенных факторов, используются недостаточно. Экспериментально мало изучено, способна ли агроэкосистема поддерживать свойственные ей структуру, функции, сохранение вещества, энергии и информации, а также какова их роль в формировании устойчивости, позволяющей снижать экологическую нагрузку благодаря природным механизмам саморегуляции. Интерес представляют связанные с гомеостатическим механизмом регуляции параметры, обеспечивающие формирование замкнутости биогеохимического цикла углерода и характеризующие неспецифический отклик на изменение факторов среды. Подходы, позволяющие оценивать режим функционирования и экологическую нагрузку на агроэкосистему с учетом свойств почв и природно-климатических условий, практически не разработаны.

В СИФИБР СО РАН в длительных (1992-2018 гг.) агроэкологических мониторингах, единственных в условиях Сибири, изучается воздействие современных климатических изменений на состояние и функционирование агроэкосистем на разных почвах лесостепи Байкальского региона, включая техногенно загрязненные тяжелыми металлами и фторидами алюминиевого производства. Агроэкосистема исследуется как объект взаимодействующих компонентов (почва-микроорганизмы-растения-атмосфера), образующих целостную открытую систему, функционирование которой зависит от природных и антропогенных воздействий. Ежегодные за вегетацию изменения климата рассматриваются относительно «климатической нормы» [WMO, 2008]. Особое внимание уделяется формированию цикла углерода и оценке функционирования агроэкосистем в изменяющихся условиях среды, что возможно только в длительном мониторинге [Pomazkina, 2011; Помазкина, 2015].

Методы исследования. В полевых опытах на разных типах почв, включая техногенно загрязненные, еженедельно в течение вегетации определяется среднесуточная скорость эмиссии CO₂ из почв [Шарков, 1987]. Одновременно методом

регидратации [Благодатский и др., 1987] анализируется содержание углерода микробной биомассы (С мик) в почве. Повторность измерений 4-х кратная. Показатели используются для расчета средних за месяц и вегетацию данных. Динамические изменения показателя $C-CO_2 / C \text{ мик}$ (мг С /г в час) характеризуют затраты углерода на дыхание единицы микробной биомассы, или удельную дыхательную активность (УДА) почвенного микробного комплекса [Помазкина, 2015]. Величина микробной биомассы, относительно содержания общего углерода в пахотном слое почвы (С мик/С орг, %), рассматривается как формирование в почве активного пула новообразованных углеродсодержащих веществ, или показатель доступного субстрата.

На экосистемном уровне реакция микробного комплекса на изменение факторов среды оценивается по трансформации углерода в почве, которая связана с активностью процессов минерализации и микробного синтеза углеродсодержащих веществ. Анализ и обобщение ежегодных данных трансформации углерода в агроэкосистемах проводили, используя методологию сравнительного и системного анализа [Pomazkina, 2011; Помазкина, 2015]. Агроэкосистему исследовали как открытую систему компонентов (почва-микроорганизмы-растения-атмосфера), интегрированных потоками углерода. Минерализовавшийся (М) за вегетацию углерод рассматривали как «вход» в систему, формирующий поток нетто-минерализованного (Н-М) углерода – «выход» и поток (ре)иммобилизованного (РИ) углерода – «возврат на выходе», или обратная связь, обеспечивающая формирование новообразованных веществ, как субстрата для микробного комплекса. Подход, основанный на количественной оценке потоков внутрипочвенного цикла углерода и соотношения их (Н-М:РИ), позволяет интегрально оценить режим функционирования агроэкосистемы и нагрузку, зависящую от воздействия климатических и антропогенных факторов, включая техногенное загрязнение почв. Средние за вегетацию потоки Н-М и РИ углерода рассчитывали с учетом плотности сложения пахотного слоя почв (г С /м²). Режим функционирования и экологическую нагрузку на агроэкосистему оценивали по разработанной шкале критериев, согласно которой показатель Н-М:РИ близкий к единице характеризует динамически-равновесное состояние агроэкосистемы (режим гомеостаза). Повышение экологической нагрузки меняет режим функционирования: стресс, резистентность, адаптационное истощение, репрессия. Их изменение показывает и уровень воздействия на агроэкосистему. Обобщение данных на основе методологии системного анализа, включая оценку обратной связи, позволяет развитие агроэкосистем рассматривать в аспекте самоорганизации.

Таблица.

Критерии режима функционирования и нагрузки на агроэкосистему

Режим функционирования	Уровень воздействия (нагрузка)	РИ:М, %	Н-М:РИ
Гомеостаз	Норма	50-45	0.8-1.2
Стресс	Допустимый	45-35	1.2-2.0
Резистентность	Предельно допустимый	35-25	2.0-3.0
Адаптационное истощение	Критический	25-15	3.0-5.0
Репрессия	Недопустимый	<10-15	>5.0

Как пример, в мониторинге (1992–2005 гг.) рассмотрим результаты полевых опытов (пар и посев яровой пшеницы) на разных по свойствам аллювиальных почвах, одинаково загрязненных тяжелыми металлами (ТМ). На фоне климатических изменений в разные годы, связанных в основном с повышением температуры воздуха, выявлены особенности трансформации углерода в агроэкосистемах. Статистическая оценка воздействия факторов среды на отдельные компоненты агроэкосистем

свидетельствует о нелинейных, многофакторных взаимосвязях. Функционирование агроэкосистем зависело как от содержания ТМ в почве, так и от влияния на другие компоненты. Полученные экспериментальные доказательства служат основанием для оценки воздействий факторов среды на внутрисистемные взаимодействия компонентов, от которых зависят режимы функционирования агроэкосистем. Ежегодные изменения трансформации углерода показали, что среднее за мониторинг содержание С мик на почве G ниже, особенно в аномальные годы, а скорость эмиссии CO₂ выше. Выявлено, что на обеих почвах содержание С мик больше зависело от влажности почвы, а эмиссия CO₂ от температуры воздуха. Как известно, прямая зависимость между повышением температуры и эмиссией CO₂ из почв представляет интерес для современных изменений климата и оценки биосферной роли агроэкосистем. Впервые для региона рассчитаны средние за мониторинг показатели эмиссии C-CO₂ за вегетацию. На отличавшейся высоким содержанием гумуса аллювиальной почве R эмиссия больше (141 г C/м²), чем на почве G (101 г C/м²). Статистически достоверная связь повышения температуры воздуха и эмиссии CO₂ в атмосферу позволяет техногенное загрязнение почв ТМ рассматривать как негативный фактор [Помазкина, Семенова, 2018].

Особенности функционирования почвенного микробного комплекса в разные годы демонстрируют и экофизиологические показатели. Отклик микробной биомассы на факторы среды проявлялся в изменении показателя С мик/С орг, %, как индикатора доступности субстрата, и показателя УДА (C-CO₂/С мик, мг/г ч), характеризующего затраты углерода на дыхание микробной биомассы. Усиление дыхания при снижении содержания С мик на слабогумифицированной почве G характеризует низкую активность микробного сообщества, особенно в аномальные годы. Вероятно, повышение затрат углерода на дыхание микроорганизмов, обусловленное необходимостью адаптации в экстремальных условиях, направлено на выживание, а не на рост С мик, который был лимитирован доступностью субстрата в отличие от сильногумифицированной почвы R. Различия в соотношении затрат углерода на дыхание и рост характеризуют устойчивость почвенного микробного сообщества (чем меньше показатель, тем выше устойчивость). Зависящие от неблагоприятных факторов среды структурные и функциональные перестройки микробного сообщества в разных почвах связаны с формированием метаболизма, обеспечивающего выживание в конкретных почвенно-климатических условиях [Помазкина, Семенова, 2018].

На экосистемном уровне ответ микробного комплекса на изменение факторов среды проявлялся в трансформации углерода, связанной с процессами его минерализации и синтеза в почве и агроэкосистеме. Количественные (г C/м²) показатели минерализовавшегося (М) за вегетацию углерода, а также потоков нетто-минерализованного и (ре)иммобилизованного углерода, как и их соотношение (Н-М:РИ), были использованы для интегральной оценки режимов функционирования агроэкосистем. На загрязненных ТМ аллювиальных почвах большая часть М углерода (C-CO₂, % от М) подвергалась Н-М. Повышение среднего за годы мониторинга показателя сопровождалось снижением РИ углерода, зависящей как от содержания С мик, так и от ее рециркуляции (ресинтез, или «возврат на выходе») неодинаковой на разных почвах, особенно в неблагоприятные годы. Активность (ре)иммобилизации повышала формирование активного пула углерода в почве, который обеспечивает субстрат для микробного комплекса и соответствующую интенсивность трансформации углерода в агроэкосистеме. Результаты демонстрируют роль почвенного микробного сообщества в функционировании агроэкосистем.

Согласно шкале критериев (таблица и рисунок), в близком к норме 1997 г. на слабогумифицированной почве G, например, в пару агроэкосистема функционировала

в режиме стресса (допустимая нагрузка), тогда как на сильногумифицированной почве R – гомеостаза. В аномальные 2002 и 2004 гг. режим резко менялся, особенно на почве G (репрессия; недопустимая нагрузка). Несмотря на отличия показателей в пару и в посеве, большая часть минерализовавшегося углерода подвергалась Н-М. Повышение эмиссии С-СО₂ при снижении РИ обусловлены недостатком доступного субстрата. Отсюда следует, на экосистемном уровне негативное воздействие среды влияет на формирование режима функционирования агроэкосистем, что указывает на низкую устойчивость на почве G. В аномальные 2002 и 2004 гг. негативное воздействие на агроэкосистемы существенно усиливалось, однако на почве R меньше.

Следовательно, устойчивость почвенного микробного сообщества и влияние его на функционирование и развитие агроэкосистем существенно зависят от (ре)иммобилизации углерода, сглаживающей негативные воздействия среды и деградацию органического вещества почв. Разработанный не имеющий аналога подход, интегрально оценивающий режим функционирования и нагрузку факторов среды на агроэкосистемы, может быть использован в экологических исследованиях.

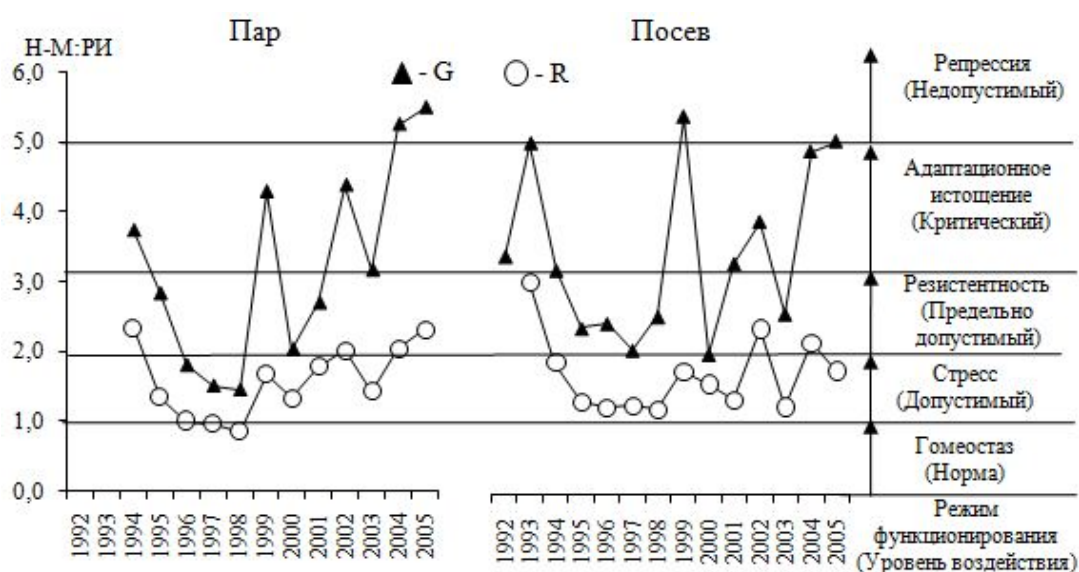


Рисунок. Режимы функционирования агроэкосистем.

Литература

Благодатский С.А., Благодатская Е.В., Горбенко А.Ю., Паников Н.С. Регидратационный метод определения микробной биомассы в почве // Почвоведение. – 1987. – № 4. – С. 64–71.

Помазкина Л.В. Мониторинг эмиссии СО₂ и содержание микробной биомассы в агроэкосистемах на серой лесной почве Прибайкалья в условиях загрязнения фторидами // Почвоведение. – 2015. – № 8. – С. 1–15.

Помазкина Л.В., Семенова Ю.В. Воздействие климатических изменений и загрязнения тяжелыми металлами разных типов почв на трансформацию соединений углерода в агроэкосистемах лесостепи Прибайкалья // Почвоведение. – 2018. – № 5. – С. 618–629.

Шарков И.Н. Совершенствование абсорбционного метода определения выделения СО₂ из почвы в полевых условиях // Почвоведение. – 1987. – № 1. – С. 127–133.

Pomazkina L.V. Integrated assessment of the effect of technogenic pollution and climatic factors on agroecosystems of baikal natural territory // Biology Bulletin Reviews. – 2011. – V.1, No. 4. – P. 358–365.

WMO. Greenhouse Gas Bulletin. – 2008. – No. 4. – 4 p.

EVALUATION OF THE FUNCTIONING OF THE SOIL MICROBIAL COMPLEX AND STATE OF AGROECOSYSTEMS UNDER CONDITIONS OF CLIMATE CHANGES AND TECHNOGENIC POLLUTION

L.V. Pomazkina

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia,
lvp@sifibr.irk.ru

Abstract. The influence of climatic factors on the content of C_{mic} and CO₂ emission from soils was studied annually on heavy metals contaminated soils (1992-2005) in the agroecosystems. The dependence of CO₂ emission on air temperature, the closest in anomalous years, has been proved. Conjugated changes in the indices C_{mic}/C_{org}, % and C-CO₂/C_{mic}, mg / g h revealed the differences in the stability of the microbial community in soils with different content and composition of humus. The generalization of carbon transformation data on the basis of the system analysis methodology determined the formation of regimes of functioning and the state of agroecosystems, which depends on environmental factors.

Keywords: *soil pollution, microbial transformation of carbon, functioning of agroecosystems*

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЛИЯНИЯ ПЕРЕМЕННЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА БИОСИСТЕМУ «БАКТЕРИИ *SPHINGOMONAS SP. K1B* – РАСТЕНИЯ ГОРОХА» В УСЛОВИЯХ ГИДРОПОННОЙ КУЛЬТУРЫ

Я.В. Пухальский¹, Н.И. Воробьев¹, А.И. Шапошников¹, В.Н. Пищик², О.В. Свиридова¹, С.Ю. Толмачев³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия, puhalskyuan@gmail.com

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Агрофизический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург, Россия, veronica-bio@rambler.ru

³Автономная некоммерческая организация Международный институт ноосферных технологий, Москва, Россия

Аннотация. В условиях стерильной гидропонной культуре изучалось воздействие магнитных полей на механизмы молекулярной сигнализации в биосистеме состоящей из растения гороха посевного сорта Софья и бактерий *Sphingomonas sp. K1B*, активных продуцентов фитогормона ауксина, ингибирующих рост корневой системы. Показано, что на коммуникативные сигналы бактерий и рецепцию их в растениях оказывает влияние внешнее переменное поле. В результате наблюдалась блокировка ингибирующего действия бактерий на растения.

Ключевые слова: магнитные поля, растительно-микробные взаимодействия, ауксины, гидропоника

В настоящее время многие аспекты влияния магнитных полей на жизнедеятельность растительных и микробиологических объектов активно изучаются на молекулярном, клеточном и физиологическом уровнях [Бинги, Савин, 2003; Новицкий, Новицкая; 2016; Хомутов, 2004]. Микробиологические исследования направлены на поиск бактерий с внутренним источником магнетизма и проявляющие чувствительность к вектору внешнего магнитного поля [Blakemore, 1975; Evans, 2003; Lang, Schüler, 2006], а также изучается изменение активности ферментов, синтезируемых микроорганизмами, при воздействии магнитных полей [Sahebjaei et al., 2007]. Исследуется воздействие электромагнитных полей на транспортные свойства клеточных мембран биологических объектов и на поступление питательных веществ в клетки микробов [Hirano et al., 1998; Potenza et al., 2004]. Изучается также опосредованное влияние магнитных полей на растения через воду [Йулчиев, 2011; Коржаков и др., 2015; Сакмак et al., 2010]. Ряд работ посвящено изучению влияния магнитных полей на сигнальные взаимодействия между микроорганизмами и растением [Galland, Pazur, 2005; Perez et al., 2002]. При этом рассматривается комплементарность пространственных конфигураций (конформаций) сигнальных молекул и рецепторов, необходимых для защищенности микробно-растительных взаимодействий.

Целью работы является экспериментальное исследование влияния магнитных полей на микробно-растительные взаимодействия в биосистемах.

Объекты исследований. В качестве растительного объекта нами были выбраны растения гороха посевного (*Pisum sativum L.*), сорта Софья (ФГБНУ ВНИИЗБК, г. Орёл). Опыты проводили в условиях стерильной гидропонной культуры, при температуре 22°C, влажности воздуха 80% и освещенности 10000 Лк (16 ч день/8 ч ночь). Протяженность эксперимента составила 12 дней. Семена перед посадкой

скарифицировали и стерилизовали концентрированной H₂SO₄ в течение 20 мин, затем проращивали в темноте при комнатной температуре в течение 3 суток на стерильных чашках Петри до длины корней 5-10 мм. Проросшие семена высаживали в отверстия платформ, установленных в пластиковые сосуды содержащих стерильный питательный раствор (рН=5,28, ppm_{0,5}=158; Eh=+231).

В качестве микробов были взяты бактерии *Sphingomonas* sp. K1B, синтезирующие повышенные концентрации сигнальных молекул (ауксинов). Бактерии интродуцировали в питательный раствор в вариантах № 2, № 4 и № 5. Плотность бактериальных клеток в питательном растворе на начало эксперимента была не более 100 тыс.кл/мл ($1,7 \cdot 10^7$ КОЕ/мл).

Физический фактор. В вариантах №3 и №4 сосуды с растениями помещались (на 15 минут в сутки) в зону воздействия специального (вращающегося) магнитного поля, генерируемое специальным устройством (40...100 мТл). [Тарасенко, Толмачев, 2004]. Также для сравнения был поставлен вариант № 5, где сосуды помещались в поле действие постоянного магнита.

Схеме опыта. В каждом из 5-х вариантов опыта выращивалось по 40 растений (4 повторности на вариант – по 8 растений в каждом сосуде). Растения в контрольном варианте №1 не подвергались воздействию бактериального и физического факторов.

Статистический анализ экспериментальных данных. Результаты опыта были подвергнуты дисперсионному анализу с помощью программы Excel 2007 (Microsoft Corp., США) и Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты эксперимента. Полученные средние значения биомассы соломы и сухих корней, а также доверительных интервалов к средним значениям, представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Средние значения массы корней растений гороха в конце опыта

Вариант	Вес сухих побегов, мг		Вес сухих корней, мг	
	Среднее	±SE	Среднее	±SE
№ 1	40,40	1,60	35,10	2,36
№ 2	28,79	1,88	20,04	3,65
№ 3	46,14	2,17	37,00	3,18
№ 4	40,00	2,28	28,69	2,64
№ 5	35,90	1,67	24,03	1,37

Значения по кислотности (рН), конечного титра бактерий (КОЕ), минерализации питательного раствора (ppm) и редокс-потенциала (Eh) приведены в табл. 2.

Таблица 2.

Микробиологические и биохимические характеристики питательных растворов по истечении двух недель выращивания растений гороха на гидропонике

Вариант	рН	ppm (0,5)	Eh	Численность бактерий (титр) <i>Sp. K1B</i> на конец опыта	
				x 10 ⁶ КОЕ/мл	x 10 ⁷ КОЕ/г корней
№ 1	5,74±0,02	63,5±0,1	209,0±0,1	—	—
№ 2	5,02±0,09	115,1±0,1	248,0±0,1	6,4±0,1	11,5±0,1
№ 3	5,90±0,01	33,5±0,1	178,0±0,1	—	—
№ 4	5,55±0,07	32,5±0,1	189,0±0,1	10,0±0,1	5,2±0,1
№ 5	5,30±0,16	104,3±0,1	211,0±0,1	10,8±0,1	7,6±0,1

Возможно, за счет снижения редокс-потенциала в варианте № 3 за счет омагничивания воды растения быстрее и больше потребляют питательные вещества из раствора и тем самым увеличивают свой рост и биомассу при вегетации.

Подкисление питательного раствора в варианте № 2, вероятно связано с повышением корневой экссудации органических кислот и потреблением их бактериями [Lu et al., 1999].

С помощью жидкостной хроматографии UPLC ACQUITY H-класса (Waters, США) была измерена концентрация органических кислот в растворе под конец опыта (рисунок).

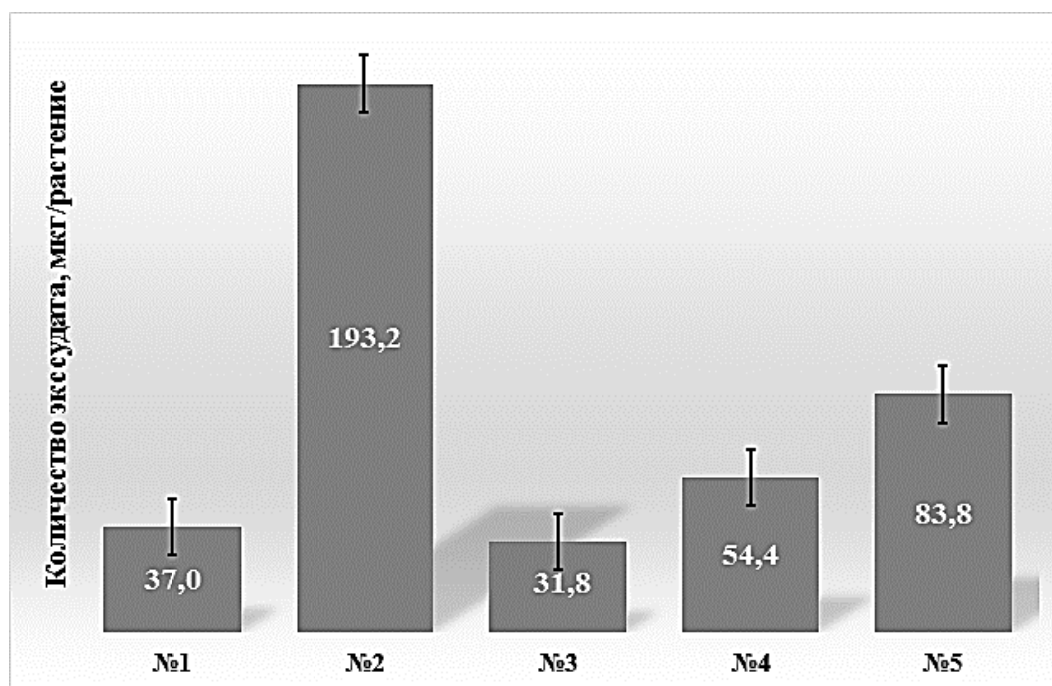


Рисунок. Средние значения корневой экссудации органических кислот у растений гороха посевного Софья в гидропонной культуре.

Обсуждение результатов. Наблюдаемые различия в скоростях роста корней и побегов растений в вариантах № 1 и № 2 объясняются наличием микробно-растительных взаимодействий во втором варианте, в результате которых бактериальные сигнальные молекулы (ауксины) активируют синтез этилена в растениях и сдерживают развитие растений. Возрастание масс корней и побегов в варианте № 3 по отношению к контролю демонстрирует опосредованное воздействие магнитных полей через изменение физического состояния воды на повышение интенсивности потоков веществ в трофических цепях микробно-растительной биосистемы [Коржаков и др., 2015]. Дополнительное воздействие магнитного поля в варианте № 4 на питательный раствор с бактериями приводит к блокировке растительно-бактериальных взаимодействий. В результате ингибирование развития растений не происходит. Вариант № 5 показал средние значения между вариантами № 2 и № 4, что не позволяет сделать однозначный вывод о блокировании постоянным магнитом ингибирующего действия бактерии, либо назвать его эффект менее выраженным в сравнении с вариантом № 4.

Таким образом, экспериментально установлен факт влияния магнитных полей на микробно-растительные взаимодействия в биосистемах. Однако данный эксперимент не позволяет точно утверждать, что блокировка воздействия происходит из-за

конформации бактериальных сигнальных молекул или из-за конформации растительных рецепторов.

Для более расширенного изучения особенностей влияния магнитных полей на микробно-растительные взаимодействия необходима аппаратура, контролирующая конформацию органических молекул и частотное сканирование биологических объектов магнитными полями с перестраиваемой частотой колебаний силы магнитного поля.

Работа выполнена по государственному заданию ФАНО ФГБНУ ВНИИСХМ №0664-2015-0014.

Литература

Бинги В.Н., Савин А.В. Физические проблемы действия слабых магнитных полей на биологические системы // *Успехи физических наук.* – 2003. – № 3. – С. 265–300.

Йулчиев Б. Магнитная вода и урожайность пшеницы // *Достижения науки и техники АПК.* – 2011. – № 7. – С. 37–38.

Коржаков А.В., Лойко В.И., Оськин С.В., Коржакова С.А., Коржаков В.Е. Результаты экспериментальных исследований влияния акусто-магнитного поля на электропроводность и водородный показатель гидропонного раствора // *Научный журнал КубГАУ.* – 2015. – № 110 (06). – С. 1–13.

Новицкий Ю.И., Новицкая Г.В. Действие постоянного магнитного поля на растения. – М.: Наука, 2016. – 352 с.

Тарасенко В.Я., Толмачев С.Ю. Пат. Рос. Федерации. № 2297392 от 28.12.2004 Устройство для обработки воды или водных растворов «Акватор».

Хомутов Г.Б. О возможной роли ионов железа в изменениях состава комплексов ДНК и их магнитных свойств в процессах клеточного цикла // *Биофизика.* – 2004. – № 49 (1). – С. 40–144.

Blakemore R.P. Magnetotactic bacteria // *Science.* – 1975. – No. 190(4212). – P. 377–379.

Çakmak T., Dumlupınar R., Erdal S. Acceleration of germination and early growth of wheat and bean seedlings grown under various magnetic field and osmotic conditions // *Bioelectromagnetics.* – 2010. – No. 31. – P. 120–129.

Evans M.E., Heller F. Environmental magnetism: Principles and applications of environmental magnetism. – San Diego: Academ. Press, 2003. – 296 p.

Galland P., Pazur A. Magnetoreception in plants // *Journal of Plant Research.* – 2005. – No. 118. – P. 371–389.

Hirano M., Ohta A., Abe K. Magnetic field effects on photosynthesis and growth of the cyanobacterium *Spirulina platensis* // *Journal of Fermentation and Bioengineering.* – 1998. – No. 87. – P. 313–316.

Lang C., Schüler D. Biogenic nanoparticles: production, characterization, and application of bacterial magnetosomes // *Journal of Physics Condensed Matter.* – 2006. – No. 18 (38). – P. 2815–2828.

Lu W.L., Cao Y.P., Zhang F.S. Role of root excluded organic acids in mobilization of soil phosphorus and micronutrients // *Chinese Journal of Applied Ecology.* – 1999. – No. 10. – P. 379–382.

Perez J.M., Josephson L., O'Loughlin T., Högemann D., Weissleder R. Magnetic relaxation switches capable of sensing molecular interactions // *Nature Biotechnology.* – 2002. – No. 20. – P. 816–820.

Potenza L., Ubaldi L., De Sanctis R., De Bellis R., Cucchiari L., Dacha M. Effects of a static magnetic field on cell growth and gene expression in *Escherichia coli* // *Mutation Research.* – 2004. – No. 561. – P. 53–62.

Sahebjamei H., Abdolmaleki P., Ghanati F. Effects of magnetic field on the antioxidant enzyme activities of suspension-cultured tobacco cells // Bioelectromagnetics. – 2007. – No. 28. – P. 42–47.

RESULTS EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS OF INFLUENCE THE VARIABLE MAGNETIC FIELDS ON THE BIOSYSTEM OF «BACTERIA *SPHINGOMONAS SP. K1B* – PLANTS OF PEAS» IN THE CONDITIONS OF HYDROPONIC CULTURE

Ya.V. Pukhalsky¹, N.I. Vorobyov¹, A.I. Shaposhnikov¹, V.N. Pishchik², O.V. Sviridova¹, S.Yu. Tolmachev³

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg-Pushkin, Russia, *puhalskyyan@gmail.com*

²Agrophysical Research Institute, Saint-Petersburg, Russia, *veronica-bio@rambler.ru*

³ANSO International Institute of Noosphere Technologies, Moscow, Russia

Abstract. In the sterile hydroponic culture study the effect of magnetic fields on the mechanisms of molecular signaling in the biosystem of pea seeds. cultivar Sophia and bacteria *Sphingomonas sp. K1B*, active producers of phytohormone – auxin, inhibiting the growth of the root system. It is shown that on the communicative signals of bacteria and their reception in plants are affected the external alternating field. As a result, blocking of the inhibitory effect of bacteria on plants was observed.

Keywords: *magnetic fields, plant-microbial interactions, auxins, hydroponics*

ИЗМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИОННОГО СОСТАВА КОРНЕВЫХ ЭКССУДАТОВ У РАСТЕНИЙ ГОРОХА ПОСЕВНОГО ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Я.В. Пухальский, А.И. Шапошников, С.И. Лоскутов, Т.С. Азарова, А.А. Белимов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия, *puhalskyan@gmail.com*

Аннотация. В условиях стерильной гидропонной культуры, и при интродукции токсичных концентраций тяжелых металлов, изучен состав корневых экзометаболитов (органических кислот и сахаров) у дикой линии гороха посевного – SGE и полученного на её основе генетического модификанта – SGECdt, обладающего повышенной устойчивостью и аккумуляцией кадмия и кобальта. Мутант выделял суммарно большее количество экссудатов в обеих фракциях. Установлены также и качественные различия в компонентах вышеназванных веществ.

Ключевые слова: *Pisum sativum*, тяжелые металлы, органические кислоты, сахара, гидропоника

Введение. Одними из главных компонентов корневых экссудатов являются сахара, аминокислоты и органические (алифатические карбоновые) кислоты [Битюцкий, 2014; Шапошников и др., 2016; Kuang et al., 2003]. Органические кислоты и аминокислоты относятся к конститутивным веществам, постоянно образующиеся и присутствующие в ризосфере при нормальном развитии растений.

При воздействии на растения токсичных концентраций тяжелых металлов (ТМ), синтез экзометаболитов корнями увеличивается, что направлено на устранение возникшего стресса, с помощью образования конъюгатов (хелатов), инактивирующих металлы в труднодоступные комплексы или осаждающие их на поверхности корня [Чиркова, 2002; Dong et al., 2007]. Органические кислоты при этом обладают более сильным сродством с ТМ в процессах мобилизации (комплексобразования), чем аминокислоты или сахара [Chen et al., 2007; Nigam et al., 2000].

Корневые экссудаты, являясь легкодоступными источниками питания для почвенных микробов, имеют немаловажное значение для взаимодействия с последними, поскольку они также участвуют в процессах биосорбции поллютантов, за счет продуцирования собственных соединений, способных мобилизовать ТМ в результате подкисления среды [Кравченко и др., 2011; Белимов и Тихонович, 2011; Kuang et al., 2003; Badri and Vivanco, 2009].

Из всего вышесказанного, целью нашего эксперимента было изучить изменение качественного и количественного состава низкомолекулярных фракций корневых экзометаболитов у двух генотипов зернобобовой культуры, в условиях моно- и биэлементной интродукции токсичных концентраций ТМ.

Объекты и методика исследования. Объектами для исследования послужили дикая линия гороха посевного (*Pisum sativum L.*) – SGE, и созданный на ее основе устойчивый к кадмию и кобальту мутант – SGECdt [Tsyganov et al., 2007; Belimov et al., 2016]. Механизм его устойчивости к кадмию не связан с биосинтезом глутатиона и фитохелатинов.

Эксперименты проводили в пластиковых гнотобиотических системах, содержащих стерильный питательный раствор, следующего состава: MgSO₄ (400 мкМ), KCl (100 мкМ), KNO₃ (2 М), KH₂PO₄ (600 мкМ), CaCl₂ (100 мкМ), Ca(NO₃)₂ (100 мкМ), Fe-тарtrat (20 мкМ), смесь микроэлементов, pH=6,0. ТМ вносили в среду в виде

растворов солей: CdCl_2 в концентрации 4 мкМ и/или CoCl_2 в концентрации 40 мкМ. Контролем служили пластиковые сосуды с растениями без добавления ТМ.

Анализ экссудатов проводили с использованием сверхпроизводительной жидкостной хроматографии высокого давления Acquity UPLC H-class (Waters, США) согласно разработанной ранее методике [Шапошников, 2015].

Обработку экспериментальных данных проводили с помощью статистических программ Statistica v.6 (StatSoft, США) и Excel 2007 (Microsoft Corp., США).

Результаты. Установлено, что корневая экссудация органических кислот у SGECdt значительно выше по сравнению с исходной линией SGE в отсутствие и присутствии токсичных концентраций кадмия и/или кобальта (рисунок). В процентном соотношении, преобладающим компонентом данной фракции во всех вариантах и у обоих генотипов являлась пировиноградная кислота (66-99%).

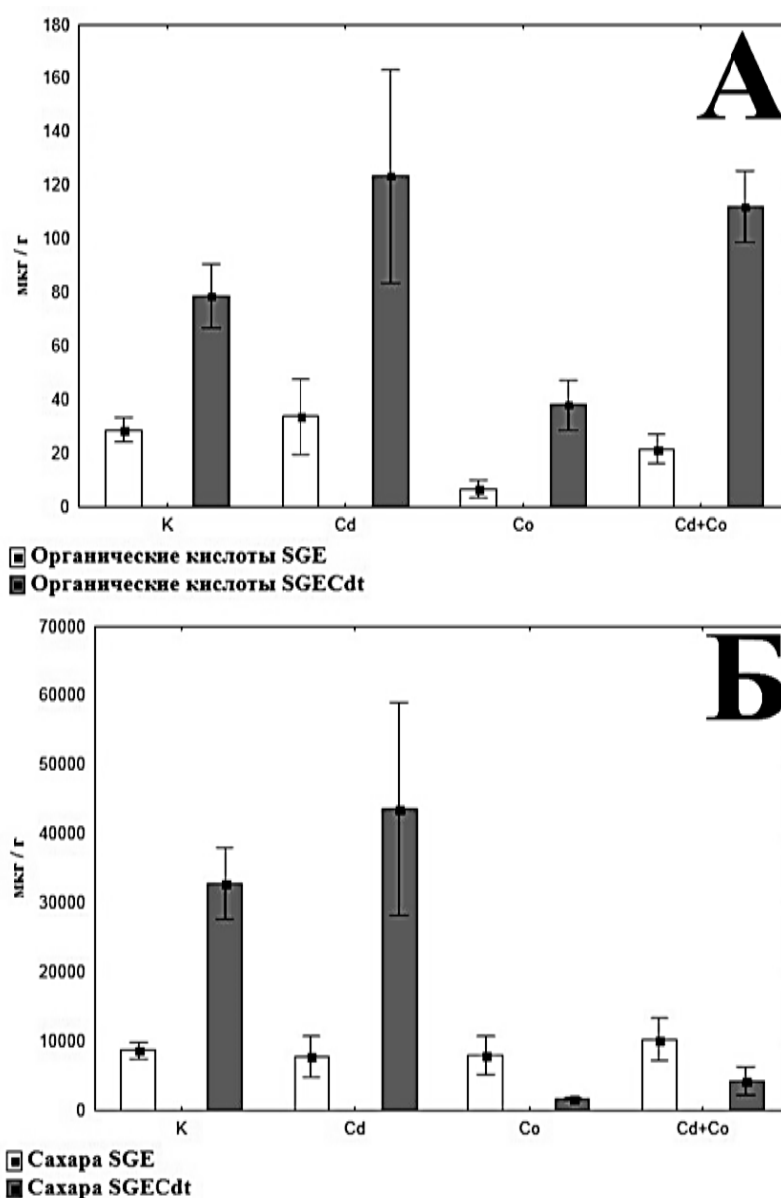


Рисунок. Суммарное содержание отдельных фракций корневых экссудатов в корневой зоне генотипов гороха SGE и SGECdt в гнотобиотических условиях в присутствии токсичной концентрации тяжелых металлов. А - органические кислоты, Б - сахара. Вертикальные отрезки обозначают ошибки средних.

Суммарные показатели по экссудации сахаров у мутанта также были значительно выше в контроле и при интродукции кадмия. Однако, в вариантах с отдельным и/или комбинированным внесением кобальта в раствор, значения корневых выделений снижались по сравнению с дикой линией. Фракция была представлена в основном фруктозой (80-90%). Также присутствовали глюкоза и рибоза. Причем, по содержанию фруктозы и рибозы в контроле и при внесении кадмия, мутант характеризовался более активной экссудацией последних. Напротив, уровень глюкозы заметно снижался в вариантах с добавлением ТМ.

Результаты по весовым и морфометрическим показателям в опыте приведены в нашей ранней работе [Шапошников и др., 2017].

Выводы. Роль пировиноградной кислоты в симбиотических взаимодействиях остается неизученной. Хотя уже точно известно, что она входит в цепочку промежуточных продуктов при синтезе фитогормона-ауксина в растениях и микробах [Cook et al., 2016; Sardar and Kempken, 2018; Mano and Nemoto, 2012; Zhao, 2013], способных также влиять друг на друга [Dodd et al., 2010, 2013]. При этом пировиноградная кислота образуется при расщеплении глюкозы в процессе гликолиза. Снижение уровня данного углевода и увеличение выхода кислоты у SGECDt может означать возрастание биосинтеза ауксинов в растениях, в ответ на толерантную устойчивость мутанта при введении в раствор ТМ. Имеются также свидетельства того, что сахара могут контролировать уровни ауксина в растениях [LeClere et al., 2010; Sairanen et al., 2012]. Глюкоза может модулировать степень регуляции почти 63% генов, индуцирующих или подавляющих синтез ауксина [Gupta et al., 2009]. Далее они могут быть преобразованы в сложные эфиры с сахарами [Müller, 2011].

Так как, практически всегда ауксины действуют во взаимодействии с другими фитогормонами, главным образом, с цитокининами и гиббереллинами, то изменение уровня качественного и количественного состава низкомолекулярных фракций корневых экзометаболитов говорит о большой доле вероятности участия в этом процессе иммунной системы растений и именно она заслуживает особый интерес в дальнейших исследованиях.

Работа проводилась в рамках проекта Минобрнауки (ГК № 16.512.11.2162), а также при содействии гранта РФФИ 14-16-00137.

Литература

Белимов А.А., Тихонович И.А. Микробиологические аспекты устойчивости и аккумуляции тяжелых металлов у растений (обзор) // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 3. – С. 10–15.

Битюцкий Н.П. Минеральное питание растений. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2014. – 540 с.

Кравченко Л.В. Методика изучения корневой экссудации для оценки эффективного функционирования и интеграции микроорганизмов с растениями. – СПб.: Информнавигатор, 2015. – 32 с.

Кравченко Л.В., Шапошников А.И., Макарова Н.М., Азарова Т.С., Львова К.А., Костюк И.И., Тихонович И.А. Видовые особенности состава корневых выделений растений и его изменение в ризосфере под влиянием почвенной микрофлоры // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 3. – С. 71–75.

Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. – СПб.: СПбГУ, 2002. – 244 с.

Шапошников А.И., Пухальский Я.В., Кравченко Л.В., Белимов А.А. Роль корневой экссудации в трофических взаимодействиях растений с ризосферными микроорганизмами. – СПб: Информнавигатор, 2016. – 104 с.

Шапошников А.И., Пухальский Я.В., Лоскутов С.И., Белимов А.А. Анализ ростовых показателей различных сортов гороха при воздействии кадмия и кобальта в начальный период онтогенеза // Коллективная монография «Реализация методологических и методических идей профессора Б.А. Доспехова в совершенствовании адаптивно-ландшафтных систем земледелия» Том. 2. – 2017. – С. 70–76.

Badri D.V., Vivanco J.V. Regulation and function of root exudates // *Plant, Cell & Environment*. – 2009. – No. 32. – P. 666–681.

Belimov A.A., Malkov N.V., Puhalsky J.V., Safronova V.I., Tikhonovich I.A. High specificity in response of pea mutant SGECdt to toxic metals: Growth and element composition // *Environmental and Experimental Botany*. – 2016. – V. 128. – P. 91–98.

Chen S., Sun L.N., Chao L., Zhou Q.X., Sun T.H. Influence of organic acid and amino acid on cadmium and lead desorption from soil // *Australian Journal of Soil Research*. – 2007. – V. 45 (7). – P. 554–558.

Cook S.D., Nichols D.S., Smith J., Chourey P.S., McAdam E.L., Quittenden L., Ross J.J. Auxin biosynthesis: are the indole-3-acetic acid and phenylacetic acid biosynthesis pathways mirror images? // *Plant Physiology*. – 2016. – V. 171 (2). – P. 1230–1241.

Dodd I.C., Belimov A.A., Elphinstone E.D., Chen L., Teijeiro R.G., Kemp C., Fielding H., Wright H. Exploiting Rhizobacteria that mediate plant hormone status // *Aspects of Applied Biology*. – 2013. – V. 120. – P. 29–34.

Dodd I.C., Zinovkina N.Y., Safronova V.I., Belimov A.A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status // *Annals of Applied Biology*. – 2010. – V. 157. – P. 361–379.

Dong J., Mao H., Zhang G.P., Wu F.B., Cai Y. Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity – a review // *Plant, Soil and Environment*. – 2007. – V. 53 (5). – P. 193–200.

Gupta A., Singh M., Mishra B.S., Kushwah S., Laxmi A. Role of glucose in spatial distribution of auxin regulated genes // *Plant Signal Behavior*. – 2009. – V. 4 (9). – P. 862–863.

Kuang Y.W., Wen D.Z., Zhong C.W., Zhou G.Y. Root exudates and their roles in phytoremediation // *Acta Phytoecology*. – 2003. – V. 27. – P. 709–717.

LeClere S., Schmelz E.A., Chourey P.S. Sugar levels regulate tryptophan-dependent auxin biosynthesis in developing maize kernels // *Plant Physiology*. – 2010. – V. 153. – P. 306–318.

Mano Y., Nemoto K. The pathway of auxin biosynthesis in plant // *Journal of Experimental Botany*. – V. 63 (8). – 2012. – P. 2853–2872.

Müller J. L. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants // *Journal of Experimental Botany*. – 2011. – V. 62 (6). – P. 1757–1773.

Nigam R., Srivastava S., Prakash S., Srivastava M.M. Effect of organic acids on the availability of cadmium in wheat // *Chemical Speciation & Bioavailability*. – 2000. – V. 12 (4). – P. 125–132.

Sairanen I., Novák O., Pencík A., Ikeda Y., Jones B., Sandberg G. Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. – 2012. – V. 24. – P. 4907–4916.

Sardar P., Kempken F. Characterization of indole-3-pyruvic acid pathway-mediated biosynthesis of auxin in *Neurospora crassa* // *PLoS ONE*. – 2018. – V. 13 (2). – e0192293.

Tsyganov V.E., Belimov A.A., Borisov A.Y., Safronova V.I., Georgi M., Dietz K.-J., Tikhonovich I.A. A chemically induced new pea (*Pisum sativum* L.) mutant SGECdt with increased tolerance to and accumulation of cadmium // *Annals of Botany*. – 2007. – V. 99. – P. 227–237.

Zhao Y. Auxin Biosynthesis: A Simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants // *Molecular Plant*. – 2013. – V. 5. – P. 334–338.

CHANGE OF COMPOSITION COMPOSITION OF ROOT EXUDATES IN PEA PLANT PLANTS UNDER EXPOSURE TO HEAVY METALS

Ya.V. Pukhalsky, A.I. Shaposhnikov, S.I. Loskutov, T.S. Azarova, A.A. Belimov

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg-Pushkin, Russia, *puhalskyan@gmail.com*

Abstract. Under the conditions of a sterile hydroponic culture, and the introduction of toxic heavy metal concentrates was study the composition of root exometabolites (organic acids and sugars) from the wild line of pea – SGE and on its basis a genetic modifier – SGECDt, increased stability and accumulation of cadmium and cobalt. The mutant releases a larger amount of exudates in both fractions. Qualitative differences in the components of the above substances were also established.

Keywords: *Pisum sativum L., heavy metals, organic acids, sugars, hydroponics*

ВЛИЯНИЕ ПЕСТИЦИДОВ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ

Е.А. Саратовских

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химической физики Российской академии наук, Черноголовка, Россия, earar@icp.ac.ru

Аннотация. Исследованы пестициды: зенкор, лонтрел, базагран, тачигарен, тил, кузагард, раундап, сетоксидим и комплексы лонтрела с Fe, Co, Ni, Zn, Mo, Mn, Mg, Cu. Все эти вещества образуют комплексные соединения с аденозинтрифосфорной кислотой. Константы комплексообразования ($K_{к/обр}$) коррелируют с физиологическими эффектами, вызываемыми у растений, почвообитающих коллембол и гидробионтов. Действие пестицидов приводит к энергодефициту, является причиной токсичности и приводит к гибели живых организмов.

Ключевые слова: пестициды, комплексы пестицидов с металлами, связывание с аденозинтрифосфорной кислотой, энергодефицит

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1126-1134

Экологическая опасность химического загрязнения окружающей среды проявляется в прямом и опосредованном токсическом действии на живые организмы веществ, не предназначенных природой к естественному метаболизму. Техногенные выбросы в окружающей среде приводят к изменению нормального протекания биохимических реакций. В результате этого, экосистемы теряют способность к самоочищению. Накопление токсикантов в природных объектах обуславливает прогрессирующие темпы сокращения ресурсов – запасов питьевой воды, промысловых организмов, плодородия почв. Преобладающими загрязнителями окружающей среды являются пестициды и тяжёлые металлы, что было признано ещё в 1986 году на конференции ООН по окружающей среде и развитию [Коптюг, 1992].

Существует стойкое мнение, что применение гербицидов повышает урожайность полей. Однако, значительное количество научных исследований [Скурлатов и др., 1994; Яблоков, 1990] доказывают обратное: использование пестицидов не способствует росту урожайности, а приводит к обратному эффекту из-за уничтожения микрофлоры и гумусовых веществ плодородного слоя земли [Головлёва, Филькенштейн, 1984]. Имеющиеся в литературе данные показывают, что применение пестицидов обуславливает большинство болезней современного человека [Гичев, 2003; Ключников, 2005] и влечёт поражения последующих поколений теплокровных существ, в том числе человека. Следствие этого - рост числа генетических заболеваний, врождённых отклонений, снижение иммунного статуса организма, появление новых заболеваний. Системы санитарно-гигиенических и медицинских технологий помогают увеличить продолжительность жизни, но не сократить число больных людей, которое непрерывно растёт [Хомяков и др., 2001; Лисичкина, Чернова, 2003].

Поскольку пестициды не обладают избирательностью действия, то для повышения устойчивости сельскохозяйственных (с/х) культурных против действия конкретных пестицидов проводится создание генно-модифицированных (ГМО) видов растений [Siddavattam et al., 2003; Bayes et al., 2005; Pyke et al., 2004; Sakagami et al., 2005; Christoffers et al., 2002; Didierjean et al., 2002]. Абсурд ситуации усиливается расширением применения ГМО видов растений. Объяснить происходящее невозможно с научной точки зрения, но можно попытаться с экономической. Болезни и гибель людей во всех странах мира, огромные затраты правительств государств на: а) оплату больничных листов; б) строительство онко- и других медицинских центров; в) оплаты разного рода медицинских страховок и пр. – всё это приносит прибыль нескольким

крупным химическим концернам. Несколько химических концернов производят: а) пестициды; б) ГМО сорта с/х культурных; в) лекарственные препараты – всё более дорогие и с серьёзными побочными эффектами.

Экспериментальная часть. В работе использовали действующие вещества гербицидов и фунгицидов (рис.1) выделяли из коммерческих форм экстракцией [Саратовских и др., 1988]. Синтез металлокомплексов лонтрела осуществляли кипячением спиртовых растворов лонтрела с соответствующими солями двухвалентных металлов [Алиев и др., 1988; Саратовских, 1989] (рис. 2).

Результаты.

1. Связывание АТФ - механизм ингибирования роста растений.

При обработке семян гербициды проникают внутрь семени и сохраняются в проростках, что приводит к ингибированию прорастания. Медленное прорастание с

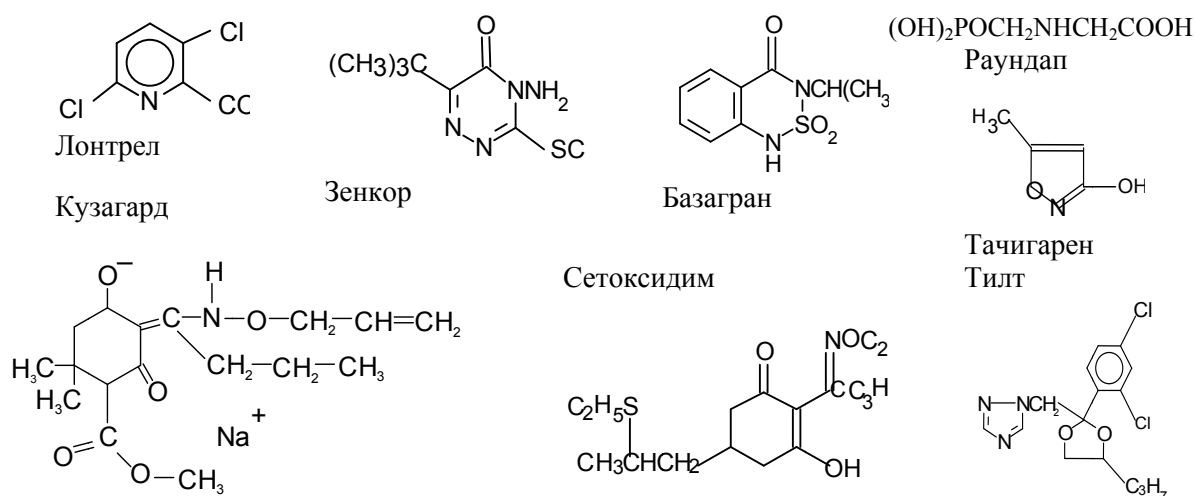


Рис. 1. Химические формулы действующих веществ, использованных в работе.

биохимической точки зрения означает, что в клетках снижен уровень АТФ, а его увеличение коррелирует с выходом из состояния покоя. Прослеживается чёткая зависимость: с убыванием константы комплексообразования падает гербицидный эффект, вызываемый пестицидом (табл. 1). Та же тенденция прослеживается во влиянии пестицидов на прорастание семян злаковых культур.

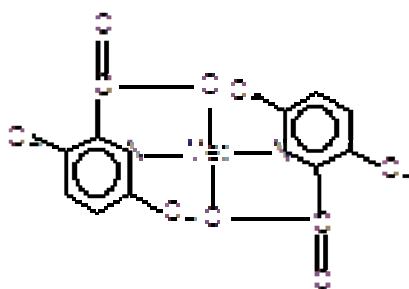


Рис. 2. Структура металлокомплексов гербицида лонтрел.

Все комплексы металлов в концентрации 10^{-8} – 10^{-4} М ингибируют прорастание семян гороха и пшеницы (рис. 3). Фитотоксические свойства металлокомплексов несколько отличны от свойств самого лонтрела.

Присутствие металлов: Co, Ni, Cu увеличивает ингибирующее действие лонтрела; Fe и Mn его несколько снижают. Это находится в соответствии с величинами $K_{к/о}$ данных соединений с АТФ.

Опрыскивание вегетирующих растений пестицидами приводит к различным повреждениям: хлороз, некроз листьев, скручивание, полегание стеблей пшеницы, отмирание точки роста. Проращивание семян в присутствии АТФ и АТФ+пестицид показало, что лонтрел, зенкор, раундап, тилт на горохе; лонтрел, базагран, сетоксидим, тачигарен на пшенице проявляют сильно выраженную АТФ-зависимость. Всхожесть семян в среде АТФ+пестицид на 20-50% выше, чем без АТФ.

Таблица 1.

Подавление прорастания семян и образования хлорофилла в двудольных растениях (горох «Улановский юбилейный») при действии пестицидов и их константы комплексообразования с ϵ -АТФ и их константы комплексообразования с ϵ -АТФ

Пестицид, $[10^{-3} \text{ M}]$	зенкор	лонтрел	кузагард	сетоксидим	базагран	тачигарен	тилт
$K_{к/о} \cdot 10^{-3}, \text{ M}^{-1}$	26,5±3,3	15,9±2,0	9,7±0,5	5,0±0,3	4,7±0,4	1,1±0,04	0,8±0,06
подав. прораств%	92±4	90±1	80±10	75±5	60±10	55±5	45±10
$[\text{хлрф}] \cdot 10^{-3}, \text{ мл}^{-1}$	8,37	8,48	20,46	22,20	23,15	87,5	87,5

Содержание хлорофилла в образцах гороха и пшеницы на 5-7 день после обработки (табл. 1) демонстрирует обратную зависимость от $K_{к/о}$ соответствующего пестицида.

Во всех сериях экспериментов, на двудольных и злаковых растениях чётко прослеживаются закономерности: а) максимально активны – зенкор и лонтрел; б) активны – раундап, кузагард, сетоксидим; в) слабо активны – базагран, тачигарен, тилт. Полученные данные показывают, что комплексование с АТФ – нарушение энергетического метаболизма или возникновение энергодефицита, реализуется *in vivo* в живой клетке.

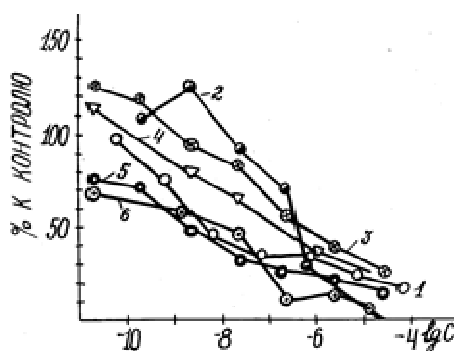


Рис. 3. Влияние комплексов гербицида лонтрел на прорастание злаковых культур. 1. – лонтрел; 2. – CuL_2 ; 3. – FeL_2 ; 4. – MnL_2 ; 5. – NiL_2 ; 6. – CoL_2 .

2. Химическое взаимодействие с ДНК и РНК – причина изменения жизненного цикла микроантропоид.

При многократном внесении препаратов изменяются показатели процесса размножения (табл. 2). Наблюдается задержка появления первых кладок до 42 дней (14 в контроле) при внесении кузагарда (10^{-2} M). Снижается количество яиц в кладках: под влиянием кузагарда (50% от контроля, 10^{-2} M) в большей степени, чем раундапа (60% от контроля, 10^{-2} M). Продолжительность эмбрионального периода в присутствии раундапа 6 дней=контролю; кузагарда – возрастает в 1,5–2 раза. Кузагард снижает долю выхода ювенильных особей в 2,3 раза (при 10^{-2} M); раундап – в 1,2–1,5 раза. Кратность

увеличения численности популяции через месяц после обработки раундапом (при 10^{-2} М) падает в 2 раза; под воздействием кузагарда – более чем в 5 раз (10^{-2} М); в 2 раза (10^{-3} М), и только при 10^{-4} М близка к контролю. Раундап оказывает большее влияние на первое поколение, кузагард на второе.

Комплексы оказывают существенное воздействие на общее число взрослых и молодых особей коллембол *Xenylla grisea* (*Hypogastruridae*) при однократной обработке во всех рассмотренных концентрациях. Рост концентрации увеличивает эффект. При 10^{-2} М количество коллембол в 2 раза ниже, чем при 10^{-4} М – за 5 недель. При равных исходных концентрациях действие CuL_2 существенно сильнее, чем MnL_2 : в 3,1 раза при 10^{-4} М; в 2,6 раз при 10^{-3} М. Аналогично – при 10^{-2} М.

Таблица 2.

Размножение коллембол при многократном внесении гербицидов

Показатели	Кузагард <i>F. candida</i>		Раундап <i>F. candida</i>		Лонтрел <i>F. candida</i>		Базагран <i>C. denticulata</i>	
	Контр	10^{-2} М	Контр	10^{-2} М	Контр.	10^{-2} М	Конт	10^{-2} М
Сроки появления первых кладок, дни	14±0	42±0	3±0	3±0	10±0,6	48±1,5	6±2	8±0
Количество яиц в кладках (экз.)	100±1	50±1	51±10	30±20	16,3±4,9	5,3±1,8	12±48	12±3
Продолжительность эмбрион. развития (дни)	7±0	10±3	6±4	6±0	7,7±0,3	13,3±1,6	9±1	9±1
Доля выхода ювенильных особей, %	77±0	33±20	60±17	40±18	100±0	78±0	80±0	50±0
Кратность увелич. числ. через месяц	16±0	3±1,5	18±8	9±7	16±0	0,9±0	6,3±0	0,5±0

По убыванию воздействия на численность микроартропод, изученные вещества выстраиваются в ряд: CuL_2 >лонтрел>кузагард>раундап>базагран> MnL_2 , который коррелирует с их $K_{к/обр}$ с ϵ -АТФ. Почти в 400 раз $K_{к/обр}$ CuL_2 выше, чем $K_{к/обр}$ MnL_2 – во столько раз CuL_2 превосходит MnL_2 по прочности связи с АТФ. По сравнению с лонтрелом, $K_{к/обр}$ CuL_2 больше в 54,6; и в 7 раз меньше у MnL_2 . Биологическая активность CuL_2 также выше, чем у MnL_2 . В большей степени MnL_2 влияет на численность взрослых особей, а CuL_2 – на численность потомства, прирост молоди самый низкий (10^{-4} М).

Комплексы пестицидов с ДНК [Саратовских и др., 1989] изменяют вторичную структуру двойной спирали. Сопоставление показателей размножения микроартропод (табл. 2) с $K_{к/обр}$ пестицидов с ϵ -ДНК и ϵ -РНК [Саратовских и др., 1989], демонстрирует корреляцию молекулярных параметров с эффектами, проявляемыми живыми организмами. Рассмотренные пестициды изменяют строение и функции ДНК и РНК коллембол, что является причиной нарушения процесса размножения и снижения численности потомства. Величины $K_{к/обр}$ токсичных химических соединений с нуклеотидами (АТФ, ДНК) коррелируют с биологической активностью, проявляемой пестицидами – степенью воздействия на жизненные циклы почвообитающих коллембол.

Таким образом, ингибирование энергетического метаболизма, энергодефицит клеток является причиной снижения численности почвенных микроартропод при соприкосновении с гербицидами.

3. Процессы комплексообразования, как причина формирования токсичности в организмах гидробионтов.

Токсичность растворов в отношении светящихся бактерии *Benekea harvey* возрастает пропорционально концентрации пестицидов [Саратовских и др., 2008]: нарастание токсичности максимальное у зенкора, наиболее слабое – у тачигарена (рис. 4). Тачигарен (10^{-1} М) нетоксичен – индекс токсичности $T < 19\%$. Базагран во всей области концентраций слабо токсичен: $24 < T \leq 40\%$. Высокая токсичность наблюдалась при концентрации зенкора $5 \cdot 10^{-3}$ М; лонтрела – 10^{-2} М; раундапа – 10^{-1} М. Во всех концентрациях наибольшую токсичность проявляет зенкор. Токсичность пестицидов уменьшается в ряду: зенкор > лонтрел > раундап > базагран > тачигарен. Значения EC_{50} полученные на бактериях и инфузориях близки (табл. 3).

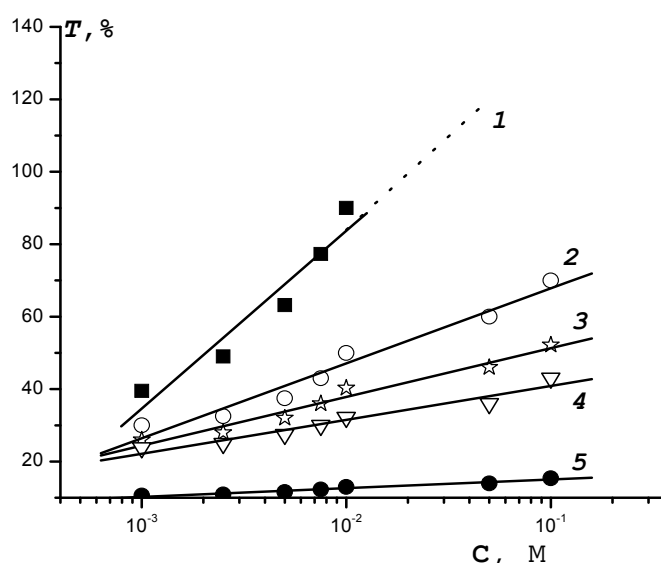


Рис. 4. Изменение токсичности в отношении *Benekea harvey* от концентрации пестицидов. 1. - зенкор; 2. - лонтрел; 3. – раундап; 4. - базагран; 5. – тачигарен.

Комплексы металлов обладают токсичностью по отношению к *Benekea harvey* вплоть до концентрации 10^{-7} М. При концентрации 10^{-4} М CuL_2 , CoL_2 , NiL_2 , – а при 10^{-3} М и выше – комплексы всех металлов проявляют токсичность в отношении *Tetrahymena pyriformis* $K > 50\%$. Различия в вычисленных значениях токсичности для *Benekea harvey* и *Tetrahymena pyriformis*, возможно, объясняется тем, что в первом случае – *in vitro* на модельной системе контролируется инактивация только одного фермента – люциферазы, в отличие от опыта *in vivo* на *Tetrahymena pyriformis* и повышением резистентности живого организма.

Таблица 3.

Значения EC_{50} пестицидов и комплексов металлов, М

пестицид	<i>Benekea harv.</i>	<i>Tetrahymena</i>	Комплекс	<i>Benekea harv.</i>	<i>Tetrahymena</i>
зенкор	$5,2 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$	CuL_2	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$
лонтрел	$6,0 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \cdot 10^{-3}$	CoL_2	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$
раундап	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	NiL_2	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$3,2 \cdot 10^{-4}$
базагран	$2,9 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^{-2}$	MoL_2	$7,0 \cdot 10^{-4}$	$7,0 \cdot 10^{-3}$
тачигарен	$1,0 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^{-1}$	MnL_2	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$5,1 \cdot 10^{-3}$
MgL_2	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	ZnL_2	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$

Токсичность комплексов металлов проявляется при концентрациях на один – два порядка более низких, чем любого из рассмотренных пестицидов (табл. 3).

Аналогично, параметры EC_{50} пестицидов и комплексов металлов указывают, что токсичность последних на один - два порядка выше, чем у всех пестицидов и исходного лиганда – лонтрела, в частности. В области изученных концентраций, как пестициды, так и комплексы металлов располагаются в одной и той же последовательности по убыванию степени токсичности.

Изменение токсичности в отношении *Tetrahymena pyriformis* от $K_{к/обр}$ (рис. 5), свидетельствует о наличии корреляции между снижением ферментативной активности и репродуктивной способности инфузорий от величины энергодефицита, возникающего под действием пестицидов. Зависимость прямо пропорциональная: токсичность веществ с низкими значениями $K_{к/обр}$ – наименьшая, а у веществ с высокими значениями константы, с высокой способностью к комплексообразованию – наибольшая. По отношению к *Benekea harvey* зависимость аналогичная. Наблюдается корреляция эффекта токсичности по отношению к бактериям и инфузориям от величины энергодефицита, создаваемого комплексами металлов. Обе зависимости прямо пропорциональные и имеют место при концентрациях 10^{-1} - 10^{-7} М.

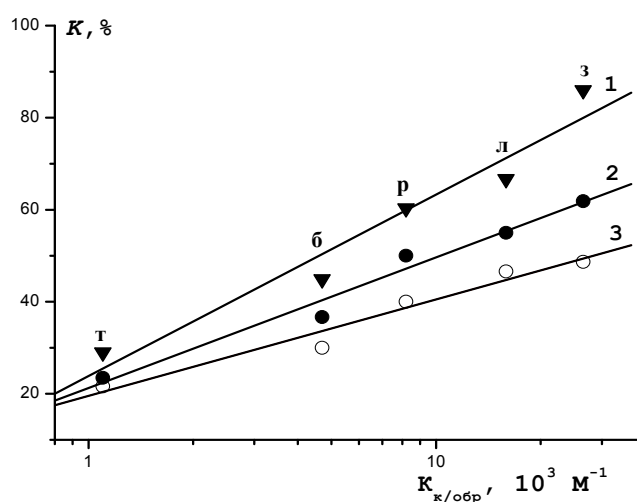


Рис. 5. Изменение степени токсичности пестицидов в отношении *Tetrahymena pyriformis* в зависимости от их констант комплексообразования с АТФ. Концентрации: 1 – 10^{-1} М; 2 – 10^{-2} М; 3 – 10^{-3} М. з – звездочка; л – лонтрел; р – раундап; б – базагран; т – тачигарен.

Выявленная закономерность изменения величины токсичности пестицида от его константы комплексообразования с АТФ подтверждается литературными данными на большом количестве разных видов многоклеточных организмов (рис. 5). Она может быть использована в качестве экспресс-теста для определения токсичности ЗВ по отношению к гидробионтам.

Заключение. Проведённые нами исследования показывают, что при попадании пестицида (или его комплекса с металлом) внутрь организма происходит его химическое связывание с АТФ. Образуется прочный комплекс пестицид-АТФ, характеризующийся $K_{к/обр}$. Возникновение биоорганических комплексов приводит к нарушению энергетического метаболизма в организме. Возникает энергодефицит клетки, который приводит к её гибели и гибели всего организма. На организменном уровне, такой внутримолекулярный механизм действия пестицидов выражается в форме снижения ферментативной активности бактерий или репродуктивной способности инфузорий.

Причиной изменений, проявляемых растениями (гербицидный эффект, в отношении прорастания семян и вегетирующих растений, уровень хлорофилла), насекомыми; водными (ингибирование люциферазы, снижение прироста клеток), почвообитающими (изменение жизненных циклов, снижение репродуктивных функций) организмами, является подавление энергетического метаболизма и возникновение **энергодифицита** клетки, вследствие взаимодействия пестицида с АТФ.

Прерывание энергетических процессов и цепей транспорта электронов, блокирование функционирования цикла трикарбоновых кислот и фотосинтетических процессов – всё это результат энергодифицита, возникающего из-за образования комплексных соединений пестицидов с нуклеотидами.

Пестициды связываются с металлами, составляющими свободный пул внутри клетки и необходимыми для синтеза металл-содержащих ферментов. Таким образом, они ингибируют систему функционирования окислительно-восстановительных ферментов. В результате, в организме блокируются процессы жизнедеятельности, осуществляемые этими ферментами. С другой стороны, организм не может «вывести» токсины.

В клетке перечисленные химические реакции протекают одновременно. Полученные результаты дают основания утверждать, что пестициды являются опасными химическими токсикантами, применение которых в практике сельскохозяйственного производства приводит к химическому заражению почв и угрожает здоровью нации.

Применение пестицидов и гербицидов давно перестало способствовать росту урожайности [Скурлатов и др., 1994; Яблоков, 1990]. Их использование привело к весьма суровым негативным последствиям. Имеющиеся в литературе данные показывают, что пестициды обуславливают большинство болезней современного человека [Гичев, 2003; Ключников, 2005]. Конференция ООН по окружающей среде и развитию в 1986 году признала пестициды преобладающими загрязнителями окружающей среды [Коптюг, 1992]. Однако, масштабы применения пестицидов, гербицидов и ускорителей роста растений и животных не сокращаются. Фирмы-производители меняют названия препаратов, маскируя таким образом, одно и то же химическое действующее вещество, или же создают генно-модифицированные растения, устойчивые к тому или иному конкретному пестициду.

Человечество уже перешло допустимый порог использования ёмкости природы и стоит перед лицом экологической катастрофы. Эта формулировка прозвучала в 1987 г. в докладе Премьер министра Норвегии Г.Х. Брунтланд, и получила развитие в 1992 г. на Конференции ООН на уровне глав государств и правительств по окружающей среде и развитию в Рио-де-Жанейро [Sustaining ..., 1997; Sustainable ..., 1996].

Экологическая защищенность отдельной страны или группы стран - иллюзия, поскольку в экологической угрозе доминирует глобальный фактор. Локальные улучшения, достигаемые за счёт разрушения экосистем и бесконтрольного использования природных ресурсов других регионов, приводят к дальнейшей деградации глобальной экосистемы и усилению экологической опасности для всех стран [Данилов-Данильян, Лосев, 2000; Бейтсон, 2005].

Полученные результаты и анализ имеющейся совокупности данных мировой научной литературы по всему спектру проблем, связанных с использованием пестицидов в практике сельского хозяйства доказывает, что применение пестицидов не приносит даже прямой пользы; некогда «отдалённые» последствия их введения в настоящее время обернулись огромным числом разнообразных заболеваний взрослого и детского населения, а, значит, и огромными экономическими убытками. На этом основании неизбежно напрашивается вывод – применение пестицидов следует резко сократить.

Литература

Алиев З.Г., Атовмян Л.О., Саратовских Е.А., Криничный В.И., Карцев В.Г. Синтез, структура и спектральные характеристики комплексов меди с производными пиколиновой кислоты // Изв. АН СССР. Сер. хим. – 1988. – № 11. – С. 2495–2501.

Бейтсон Г. Шаги в направлении экологии разума: Избранные статьи по антропологии. Пер. с англ. – М.: КомКнига, 2005. – 232 с.

Гичев Ю.П. Загрязнение окружающей среды и экологическая обусловленность патологии человека: Аналит. обзор. – Новосибирск: ГПНТБ СО РАН, 2003. – 138 с. – (Сер. Экология, вып. № 68).

Головлёва Л.А., Филькенштейн З.И. Условия микробной деградации пестицидов // Агрехимия. – 1984. – № 3. – С. 105–119.

Данилов-Данильян В.И., Лосев К.С. Экологический вызов и устойчивое развитие. – М.: Прогресс-Традиция, 2000. – 416 с.

Клюшников В.Ю. Организм человека как индикатор загрязнений природной среды // Сенсор. – 2005. – № 3. – С. 26–33.

Коптюг В.А. Конференция ООН по окружающей среде и развитию (Рио-де-Жанейро, июнь 1992г.): Информ. Обзор / СО РАН. – Новосибирск, 1992. – 62 с.

Лисичкина Г.В., Чернова Н.Н. (ред.) Человек и среда его обитания. – М.: Мир, 2003. – 460 с.

Саратовских Е.А., Кондратьева Т.А., Психа Б.Л., Гвоздев Р.И., Карцев В.Г. Комплексообразование некоторых пестицидов с аденозинтрифосфорной кислотой // Известия АН СССР. Сер. хим. – 1988. – № 11. – С. 2501–2507.

Саратовских Е.А. Синтез бидентатных комплексов 3,6-дихлорпиколиновой кислоты // Известия АН СССР. Сер. хим. – 1989. – № 10. – С. 2327–2329.

Саратовских Е.А., Козлова Н.Б., Байкова И.С., Штамм Е.В. Корреляционная зависимость между токсическими свойствами загрязняющих веществ и их константами комплексообразования с АТФ // Химическая физика. – 2008. – Т. 27, № 11. – С. 87–92.

Саратовских Е.А., Личина М.В., Психа Б.Л., Гвоздев Р.И. О характере взаимодействия ди- и полинуклеотидов с некоторыми пестицидами // Известия АН СССР. Сер. хим. – 1989. – № 9. – С. 1984–1989.

Скурлатов Ю.И., Дука Г.Г., Мизити А. Введение в экологическую химию. – М.: Высш.шк., 1994. – 400 с.

Хомяков П.М., Кузнецов В.И., Алферов А.М., Бусаров В.Н., Дубовский С.Н., Иванов В.Д., Искандарян Р.А., Кирьянов Д.В., Кирьянова Е.Н., Конищев В.Н., Кривобок И.Г., Крутько В.Н., Менжухин Г.В., Пегов С.А., Савенко В.С., Смирнова В.А., Смолин В.С., Смолина С.Г., Тумель Н.В. Влияние глобальных изменений климата на функционирование экономики и здоровье населения России. – М.: Эдиториал УРСС, 2001. – 380 с.

Яблоков А.В. Ядовитая приправа. Проблемы применения ядохимикатов и пути экологизации сельского хозяйства. – М.: Мысль, 1990. – 125 с.

Bayes A., Comellas-Bigler M., de la Rodriguez V.M., Maskos K., Bode W., Aviles F.X., Jongsma M.A., Beekwilder J., Vendrell J.S.O. Structural basis of the resistance of an insect carboxypeptidase to plant protease inhibitors // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2005. – V. 102, No. 46. – P. 16602–16607.

Christoffers M.J., Berg M.L., Messersmith C.G., An isoleucine to leucine mutation in acetyl-CoA carboxylase confers herbicide resistance in wild oat // Genome. – 2002. – V. 45, No. 6. – P. 1049–1056.

Didierjean L., Gondet L., Perkins R., Lau S.M., Schaller H., O'Keefe D.P., Werck-Reichhart D.E.I. Engineering herbicide metabolism in tobacco and Arabidopsis with CYP76B1, a cytochrome P450 enzyme from Jerusalem artichoke // Plant Physiol. – 2002. – V. 130, No. 1. – P. 179–189.

Pyke F.M., Bogwitz M.R., Perry T., Monk A., Batterham P., McKenzie J.A. The genetic basis of resistance to diazinon in natural populations of *Drosophila melanogaster* // *Genetica* (Dordrecht). – 2004. – V. 121, No. 1. P. 13–24.

Sakagami H., Hashimoto K., Suzuki F., Ogiwara T., Satoh K., Ito H., Hatano T., Takashi Y., Fujisawa S. Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities // *Phytochem.* – 2005. – V. 66, No. 17. – P. 2108–2120.

Siddavattam D., Khajamohiddin S, Manavathi B, Pakala SB, Merrick M. Transposon-like organization of the plasmid-borne organophosphate degradation (opd) gene cluster found in *Flavobacterium sp.* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69, No. 5. – P. 2533–2539.

Sustainable development: old conundrums, new discords // *System dynamics rev.* Cambridge, VCH. – 1996. – V. 12, No. 1. – P. 59–80.

Sustaining social security. – New York: United Nations, 1997. – 200 p.

INFLUENCE OF PESTICIDES ON THE PHYSIOLOGICAL PROCESSES OF THE GROWTH AND MICROORGANISMS

E.A. Saratovskikh

Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow, Russia, esarar@icp.ac.ru

Abstract. Pesticides: zenkor, lontrel, basragran, tachigaren, til, kuzagard, roundup, sethoxydim and lontrel complexes with Fe, Co, Ni, Zn, Mo, Mn, Mg, Cu have been studied. All these substances form complex compounds with adenosine triphosphoric acid. The complexing constants (K_c / ob) correlate with the physiological effects caused by plants, soil-forming cymbol and hydrobionts. The action of pesticides leads to energy deficiency, is the cause of toxicity and leads to the death of living organisms.

Keywords: pesticides, pesticide complexes with metals, binding with adenosine triphosphoric acid, energy deficiency

СТАБИЛЬНОСТЬ РАЗВИТИЯ ЛИСТОВОЙ ПЛАСТИНКИ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ В ПРИГОРОДАХ КРАСНОЯРСКА

Л.Н. Скрипальщикова, В.В. Стасова

Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия, lara@ksc.krasn.ru

Аннотация. В период наблюдений по совокупности морфологических и анатомических показателей листьев березы повислой не выявлено существенных нарушений ассимиляционного аппарата на уровне органа и тканей. Полученные данные подтверждают, что береза является породой, толерантной к техногенному воздействию. В качестве индикаторов техногенного воздействия можно использовать такие показатели как длина второй жилки, расстояние между концами 1-ой и 2-ой жилок, площадь клетки верхнего эпидермиса.

Ключевые слова: промышленное воздействие, береза повислая (*Betula pendula* Roth.), листовая пластинка, флуктуирующая асимметрия, анатомические показатели

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1135-1138

В настоящее время сложившаяся экологическая ситуация в г. Красноярске указывает на значительную дополнительную нагрузку на пригородные леса. Диагностика экологического состояния городской и пригородной среды возможна по реакции биометрических показателей древесных растений [Шемберг, Жарко, 1984]. Морфологические характеристики древесной растительности являются достаточно информативными для определения степени стабильности роста отдельных видов растений, находящихся в условиях индустриального пресса и городской среды.

Цель исследований заключалась в определении стабильности развития березовых фитоценозов Красноярской лесостепи по морфологическим и анатомическим показателям листовой пластинки в условиях изменяющейся среды. Для достижения поставленной цели выполнялись следующие задачи:

1. Установить величину современной пылевой техногенной нагрузки на березовые фитоценозы;
2. Рассчитать индекс флуктуирующей асимметрии листовой пластинки березы повислой в насаждениях Красноярской лесостепи;
3. Определить анатомические показатели тканей листьев березы.

В Красноярской лесостепи в северо-восточном направлении от г. Красноярска были обследованы березняки разнотравные в пределах зеленой зоны. Исследования проводились в березняках, произрастающих под воздействием промышленных выбросов города (Речфлот, Дачи, Есаулово, Березовка) и в фоновых условиях (Погорелка, Академгородок). Березовые насаждения V-VII классов возраста, произрастают на антропогенно-преобразованных почвах [Скрипальщикова и др., 2017]. Травяной покров образован видами лесостепного, лугово-лесного и степного разнотравья, имеет черты ксерофитизации.

Аккумуляция пыли изучалась адаптированным к лесным объектам седиментометрическим методом [Детри, 1973]. На каждой пробной площади с пяти модельных деревьев с нижней части кроны по ее периметру отбирались образцы листьев. По методике В.М. Захарова (2000) был рассчитан интегральный индекс флуктуирующей асимметрии (ИФА) листа березы повислой. Анатомические показатели тканей определяли на поперечных и парадермальных срезах листовой пластинки.

В результате исследований установлено, что пылевые нагрузки на обследованные березняки в 2016 г. снизились в сравнении с 2013 г. и в настоящее время соответствуют средней степени загрязнения. Максимальное количество пыли приходится на березняки, произрастающие под факелом ТЭЦ-3. Критических значений содержания валового фтора в ассимиляционной массе и в почвах березняков в 2016 г. не выявлено.

В зоне промышленных выбросов рассчитанный ИФА березы варьирует от 0,047 до 0,053 и характеризует степень асимметричности листовой пластинки как условная норма. Вариации ФА для листьев березы приведены на рис. 1.



Рис. 1. Вариация индекса флуктуирующей асимметрии листа березы повислой на пробных площадях в березовых насаждениях.

В первом приближении можно утверждать, что накопившаяся на поверхности листа пыль в 2016 г. оказывает незначительное воздействие на морфологические показатели листа березы повислой в районе воздействия выбросов ТЭЦ-3. Коэффициенты корреляции (таблица) между количеством пыли и такими показателями как длина второй жилки и расстояние между концами 1-ой и 2-ой жилок показывают среднюю отрицательную связь, а такими как ширина половинок листа и расстояние между основаниями 1-ой и 2-ой жилок говорят о слабой отрицательной связи ($p=0,05$) (уровень достоверности приведен по методике [Кобзарь, 2006]).

Таблица.

Коэффициенты корреляции между значениями показателей ФА и количеством пыли на листьях, $p=0,05$

Признак	Значения показателей ФА			
	Ширина половинок листа, см	Длина второй жилки, см	Расстояние между основаниями 1-ой и 2-ой жилок, мм	Расстояние между концами 1-ой и 2-ой жилок, см
Количество пыли, г/кг абс. сух. массы	-0,39	-0,53	-0,48	-0,53

Анализ анатомических характеристик показал, что у листьев березы под влиянием техногенного загрязнения появляются признаки ксерофитизации: при очень незначительном увеличении толщины листовой пластинки увеличивается толщина столчатого мезофилла, уменьшается толщина верхнего и нижнего эпидермисов, а также площадь эпидермальных клеток. Но степень выраженности этих структурных изменений невелика, что может быть обусловлено как толерантностью березы к загрязнению, так и уровнем загрязнения, не достигающим критических значений.

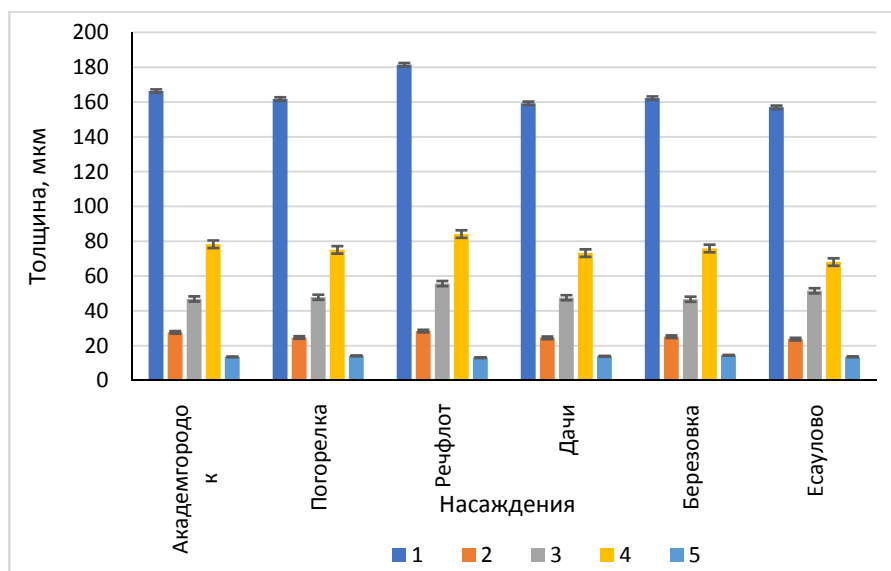


Рис. 2. Толщина тканей листовой пластинки березы повислой (1 – лист, 2 – верхний эпидермис, 3 – палисадный мезофилл, 4 – губчатый мезофилл, 5 – нижний эпидермис).

Следует отметить, что у листьев загрязненных мест произрастания отмечалась более сильная индивидуальная изменчивость показателей по сравнению с фоновыми условиями. Кроме того, несмотря на то, что средние размеры устьиц практически не различаются во всех древостоях, но на каждом листе размеры их сильно варьировали (от 47 до 20 мкм в длину и от 31 до 16 мкм в ширину).

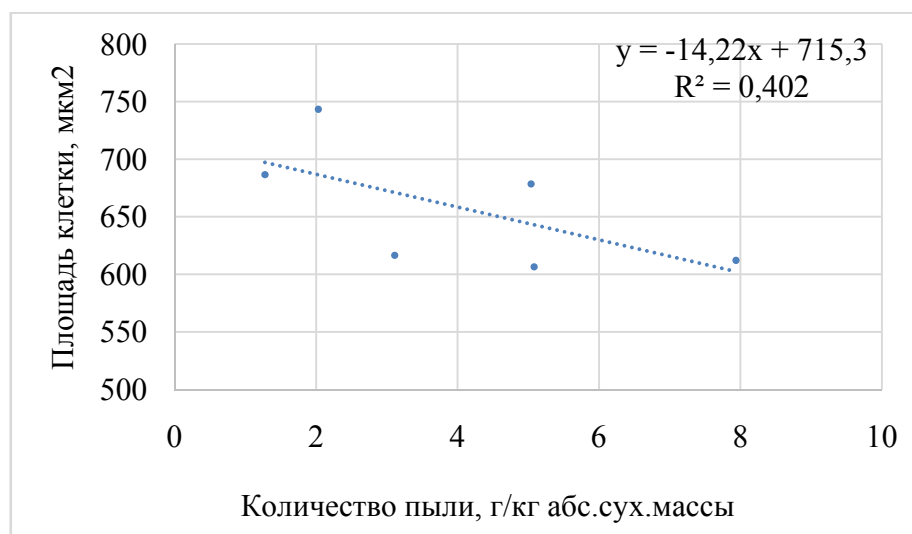


Рис. 3. Зависимость площади клетки верхнего эпидермиса листа березы от пылевой нагрузки.

Были рассчитаны коэффициенты корреляции между анатомическими характеристиками листьев березы и пылевой нагрузкой на них. Значения коэффициентов оказались низкими, отрицательная связь средней силы выявлена только для количества пыли и средней площади клетки верхнего эпидермиса ($r=-0,63$, $p<0,05$) (рис. 3).

Таким образом, совокупность морфологических и анатомических показателей листьев березы повислой не свидетельствует о существенных нарушениях ассимиляционного аппарата на уровне органа и тканей. Пылевые нагрузки в период проведения наблюдений характеризовались как средней степени и оказывали незначительное отрицательное воздействие на стабильность развития листьев, оцененную по индексу флуктуирующей асимметрии, а также на их анатомическую структуру. Полученные данные подтверждают, что береза является породой, толерантной к техногенному воздействию. В качестве индикаторов техногенного воздействия можно использовать такие показатели как длина второй жилки, расстояние между концами 1-ой и 2-ой жилок, площадь клетки верхнего эпидермиса.

Литература

- Детри Ж. Атмосфера должна быть чистой. – М.: Прогресс, 1973. – 380 с.
Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И. и др. Здоровье среды: методика оценки. – М.: Центр экологической политики России, 2000. – 66 с.
Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников. – М.: Физматлит, 2006. – 816 с.
Скрипальщикова Л.Н., Пономарева Т.В., Бажина Е.В., Барченков А.П., Белянин А.В. Техногенные нагрузки на березняки Красноярской лесостепи // Сибирский лесной журнал. – 2017. – № 6. – С. 130–135.
Шемберг М.А., Жарко Л.У. Морфо-анатомическая структура городских насаждений березы повислой // Ботан. исслед. в Сибири. – Красноярск: Вып. 2, 1994. – С. 151–156.

GROWTH STABILITY OF LEAF PLATE OF *BETULA PENDULA* ROTH. IN KRASNOYARSK SUBURBS

L.N. Skripal'shchikova, V.V. Stasova

«Sukachev Institute of Forest SB RAS», Krasnoyarsk, Russia, lara@ksc.krasn.ru

Abstract. The complex of morphological and anatomical parameters of *Betula pendula* leaf plates didn't reveal significant disturbances of assimilating apparatus on organ's and tissue's levels during period of monitoring. The data confirmed that birch is a tolerant species to industrial pollution. Such parameters as length of second vein, distance between ends of first and second veins and square of upper epidermis cell may be considered as indicators of technogenic effects.

Keywords: *industrial impact, Betula pendula Roth., leaf plate, fluctuating asymmetry, anatomical parameters*

ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НИКЕЛЯ В КОРНЯХ ПШЕНИЦЫ

Ю.В. Смирнова¹, З.М. Курамшина¹, Р.М. Хайруллин²

¹Стерлитамакский филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Башкирский государственный университет, Стерлитамак, Россия, kuramshina_zilya@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия, krm62@mail.ru

Аннотация. Изучено влияние инокуляции семян пшеницы мягкой сорта Омская 35 на распределение никеля в корнях растений. С помощью гистохимического анализа поперечных срезов корней 30-ти дневных растений пшеницы показано, что обработка семян клетками эндофитного штамма *Bacillus subtilis* 11ВМ увеличивает поступление ионов никеля в растительные ткани.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, эндофиты, никель, тяжелые металлы

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1139-1142

Никель является одним из наиболее распространенных тяжелых металлов, загрязняющих окружающую среду. В низких концентрациях он является важным элементом, необходимым для нормального роста и развития многих видов растений. Этот металл легко поглощается корневой системой и может накапливаться в корнях и побегах [Gautama et al., 2017]. Высокие дозы никеля вызывают значительные отклонения в метаболизме растительных клеток, нарушая ход реакций фотосинтеза и дыхания, индуцируя окислительный стресс. Тяжелые металлы поступают в растения, в основном, через корневую систему. Поэтому именно корни являются главным барьером на пути поступления тяжелых металлов в растительные ткани. Известно, что зрелые ткани экзодермы и эндодермы ограничивают радиальный транспорт ионов некоторых металлов по апопласту корня, в частности кадмия и свинца [Серегин и др., 2003]. Однако данный механизм не является универсальным для всех тяжелых металлов. Поэтому изучение особенностей их поступления и распределения в клетках корней является одной из важных задач.

В последнее десятилетие значительно возрос интерес к возможности использования ризосферных и эндофитных ростстимулирующих бактерий не только для стимуляции роста растений на загрязненных тяжелыми металлами почвах, но и для регуляции их поступления в растительный организм [Белимов, 2011; Sessitsch et al., 2013]. Ряд особенностей ризосферных бактерии рода *Bacillus*, таких как синтез хелатирующих соединений, подкисление среды за счет выделения органических кислот, растворение фосфатов и других труднорастворимых солей, делает изучение этих микроорганизмов наиболее перспективным.

В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение влияния инокуляции семян эндофитным штаммом бактерий *B. subtilis* 11ВМ на распределение никеля в тканях корней пшеницы.

В качестве объекта исследования были выбраны растения пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) сорта Омская-35. Все опыты проводили в лабораторных условиях. Семена растений перед обработкой клетками бактерий промывали в мыльной воде, стерилизовали этиловым спиртом (96%-ым раствором) в течение 1 мин, ополаскивали в дистиллированной воде, подсушивали на воздухе. Для инокуляции семян использовали 20-часовую культуру бактерий *Bacillus subtilis* 11ВМ (ВНИИСХМ, № 519),

выращенную на мясо-пептонном агаре при +37 °С. Обработку бактериями проводили в стерильных условиях, в ламинар-боксе. Клетки эндофитов отмывали 0,001 М раствором КСl, затем концентрацию суспензии довели до 10⁶ кл/мл по оптической плотности. Расход препарата составил 20 мкл на 1 г семян. После обработки препаратом семена выдерживали в течение часа, затем использовали в экспериментах. Семена контрольных растений обрабатывали дистиллированной водой. Обработанные бактериями и контрольные семена выращивали в вегетационных сосудах, в качестве субстрата использовали чернозем выщелоченный. Загрязнение почвы имитировали, поливая её раствором соли Ni(NO₃)₂×4H₂O в следующих концентрациях: 10, 200 мг/кг почвы. В контроле почву в сосудах поливали дистиллированной водой.

Растения выращивали в течение 30 дней при температуре 18-20 °С при освещении 12 клк и 16-часовом фотопериоде. Пробы отбирали одновременно во всех вариантах опыта. Корни 30-ти суточных растений, выросших в почве с различной концентрацией никеля, аккуратно отмывали в водопроводной, затем в дистиллированной воде, делали поперечные срезы (не менее 30 с одного варианта опыта).

Метод гистохимического определения локализации никеля основан на способности металла образовывать с диметилглиоксимом окрашенный в малиновый цвет комплекс. Поперечные срезы корня на расстоянии 10–15 мм от апекса помещали на предметное стекло, затем наносили 3–4 капли свежеприготовленного раствора диметилглиоксима. Через 2 минуты срезы рассматривали под микроскопом при разных увеличениях, отмечая ткани, локализовавшие никель [Серёгин, Кожевникова, 2008]. Микрофотографии клеток получали с помощью системы визуализации к микроскопу ЛабoМед-3 (Россия).

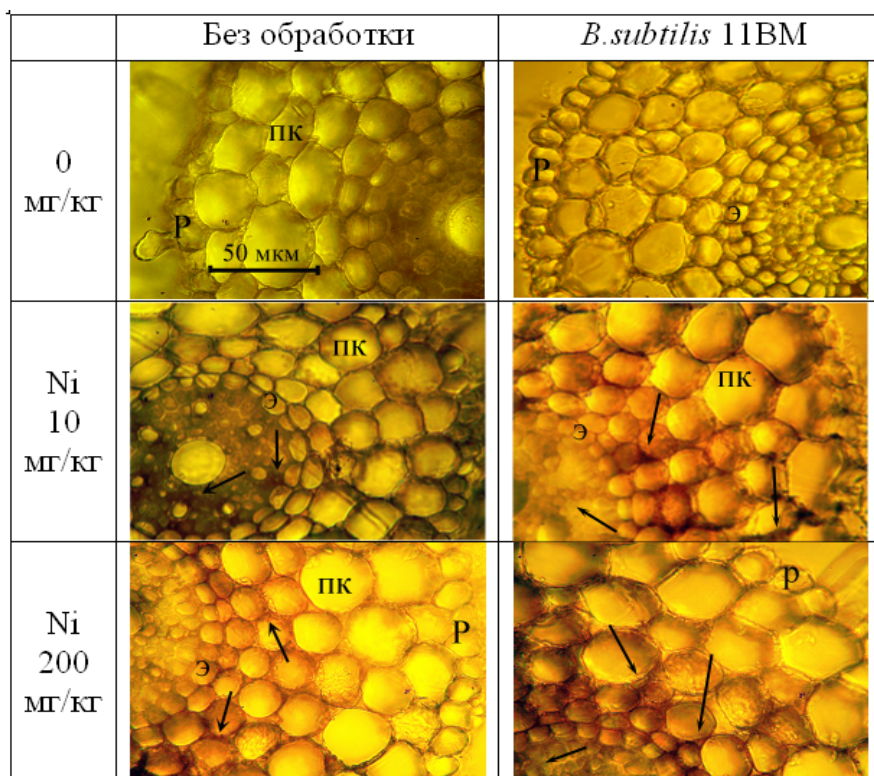


Рисунок. Локализация ионов никеля в клетках корней растений *Triticum aestivum* L., выращенных в условиях загрязнения почвы никелем: ПК – первичная кора, Р - ризодерма, Э – эндодерма. Стрелками указаны места локализации никеля.

В ходе экспериментов было выявлено, что количество никеля в тканях корней пшеницы повышалось с увеличением концентрации металла в почве. В корнях

необработанных бактериями растений металл откладывался преимущественно в клетках первичной коры и центрального цилиндра (рисунок).

В тканях корней растений, обработанных клетками эндофитных бактерий, растущих в почве с никелем (10 мг/кг), кристаллов никеля было больше по сравнению с необработанными растениями. Как и в клетках необработанных растений, металл выявлялся, главным образом, в первичной коре, и небольшая его часть проникала в клетки центрального цилиндра. С повышением концентрации никеля в почве (200 мг/кг), его содержание в корнях инокулированных растений пшеницы также увеличивалось, и визуальных отличий в локализации металла между обработанными и необработанными проростками не было обнаружено.

Ранее нами было показано уменьшение поступления кадмия в растения пшеницы, инокулированные клетками эндофитных штаммов *Bacillus subtilis*, за счет иммобилизации металла клетками бактерий [Курамшина и др., 2016]. Кроме того, известно, что ограничение поступления тяжелых металлов в растения может происходить за счет усиленной лигнификации клеточных стенок корня, которая препятствует передвижению металлов, в частности кадмия и свинца, по апопласту. В отличие от вышеназванных металлов, ионы никеля проникают в протопласты клеток корней [Серегин и др., 2003; Серегин, Кожевникова, 2008] и, следовательно, его транспорт может осуществляться как по апопласту, так и по симпласту. В таких условиях укрепление клеточной стенки за счет интенсивной лигнификации не будет ограничивать транспорт ионов никеля по растению, а повышение подвижных форм металла в ризосфере, вызванное продукцией бациллами органических кислот и других биологически активных веществ, напротив, будет способствовать более интенсивному поступлению никеля в растение.

Таким образом, инокуляция семян пшеницы клетками эндофитного штамма *B. subtilis* 11ВМ увеличивает поступление ионов никеля в растительные ткани, вследствие чего применение препаратов на основе данных штаммов бактерий при загрязнении почвы никелем требуется ограничить.

Литература

Белимов А.А., Кунакова А.М., Сафронова В.И., Кожемяков А.П., Степанок В.В., Юдкин Л.Ю., Алексеев Ю.В. Использование ассоциативных бактерий для инокуляции ячменя в условиях загрязнения почвы свинцом и кадмием // Микробиология. – 2004. – Т. 73. – С. 118–125.

Курамшина З.М., Смирнова Ю.В., Хайруллин Р.М. Повышение толерантности *Triticum aestivum* к кадмий-стрессу с помощью эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* // Физиология растений. – 2016. – Т. 63, № 5. – С. 1–9.

Серегин И.В., Кожевникова А.Д. Роль тканей корня и побега в транспорте и накоплении кадмия, свинца, никеля и стронция // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 1. – С. 3–26.

Серегин И.В., Кожевникова А.Д., Казюмина Е.М., Иванов В.Б. Токсическое действие и распределение никеля в корнях кукурузы // Физиология растений. – 2003. – Т. 50. – С. 793–800.

Gautama S., Rathoure A.K., Chhabra A., Pandey S.N. Effects of nickel and zinc on biochemical parameters in plants- a review // Octa Journal of Environmental Research Jan. – 2017. – V. 5 (1). – P. 014–021.

Sessitsch A., Kuffner M., Kidd P., Vangronsveld J., Wenzel W.W., Fallmann K., Puschenreiter M. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils // Soil Biology & Biochemistry. – 2013. – V. 60. – P. 182–194.

INFLUENCE OF ENDOPHYTIC *BACILLUS SUBTILIS* ON THE NICKEL DISTRIBUTION IN WHEAT ROOTS

Yu.V. Smirnova¹, Z.M. Kuramshina¹, R.M. Khairullin²

¹The Sterlitamak Branch of the Bashkir State University, Sterlitamak, Russia,
kuramshina_zilya@mail.ru

²Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia,
krm62@mail.ru

Abstract. The influence of inoculation of wheat seeds (Omskaya 35) on the nickel distribution in plant roots was studied. With the histochemical analysis of transverse sections of the 30-day wheat plants roots, it was shown that seed treatment by cells of *Bacillus subtilis* 11BM increases the flow of nickel ions into plant tissues.

Keywords: *Bacillus subtilis*, endophytes, nickel, heavy metals

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА МЕТАБОЛИЗМ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Е.В. Спиридонова, И.С. Нестеркина, В.В. Гурина, Н.В. Озолина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, yatakol@mail.ru

Аннотация. Кадмий считается одним из важных поллютантов из-за его высокой токсичности для многих организмов. Проникая внутрь растительных клеток, он оказывает влияние на протекание метаболических процессов, в том числе и на транспортную систему биологических мембран. Было изучено действие кадмия (1, 10, 100 мкМ) на транспортную активность вакуолярных протонных помп (H^+ -АТФазу и H^+ -пирофосфатазу). Проводилась оценка стрессового воздействия ионов кадмия на вакуолярную мембрану (тонопласт) по количеству образовавшихся продуктов перекисного окисления липидов.

Ключевые слова. Кадмий, растительная клетка, вакуоль, транспорт

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1143-1145

В результате увеличения техногенной нагрузки на окружающую нас среду происходит накопление вредных токсических веществ в воздухе, воде и почве. Значительную часть из них составляют тяжелые металлы. В процессе роста и развития растений на загрязненных территориях происходит их проникновение внутрь растительных клеток, влияя тем самым на протекание метаболических реакций. За счет своей способности накапливаться в органах растений и животных тяжелые металлы по пищевой цепи попадают в организм человека, оказывая влияние на здоровье [Khan et al., 2015]. Кадмий считается одним из важных поллютантов из-за его высокой токсичности для многих организмов [Khouidi et al., 2012]. Известно, что растения способны либо ограничивать поступление кадмия и других токсичных веществ внутрь клетки, либо осуществлять их детоксикацию [Regvar, Vogel-Mikuš, 2008], благодаря чему изучение процессов поступления и характера поведения тяжелых металлов внутри клетки остается важной задачей для исследователей разных стран.

Один из важных механизмов сдерживания негативного действия кадмия на растения связан с изоляцией его ионов и комплексов в вакуоль. Перенос через вакуолярную мембрану (тонопласт) происходит благодаря белкам-переносчикам, осуществляющих свою работу за счет трансмембранного потенциала, генерируемого протонными помпами (H^+ -АТФазой и H^+ -пирофосфатазой) [Maeshima, 2001]. За счет работы этих ферментов поддерживается необходимый уровень рН в цитозоле, идет подкисление вакуолярного содержимого, что играет важную роль в разнообразных клеточных процессах, в частности, в мембранных транспортных системах и т.д. [Inoue, Forgas, 2005; Toei et al., 2010]. Как показали результаты многих исследователей, поступление тяжелых металлов в клетку, в том числе и кадмия, вызывает окислительный стресс [Sandalio et al., 2009]. На сегодняшний день механизмы работы протонных помп в условиях стресса, вызванного действием тяжелых металлов, изучены не достаточно хорошо. Однако уже известно, что они принимают активное участие в адаптационных механизмах растительной клетки при осмотическом стрессе [Dietz et al., 2001; Wang et al., 2011; Liu et al., 2011.] и, вполне вероятно, что их роль при стрессе, вызванном присутствием кадмия, также будет достаточно значима. Кроме того, ранее нами было показано, что в условиях осмотического стресса активность H^+ -пирофосфатазы значительно преобладает, по сравнению с активностью H^+ -АТФазы [Озолина и др., 2010].

В проводимых исследованиях изучалось влияние различных концентраций кадмия (1, 10, 100 мкМ) на работу протонных помп тонопласта (H^+ -АТФазы и H^+ -пирофосфатазы). В качестве объекта исследования использовали корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). Фракцию вакуолярных мембран (тонопласт) получали макрообъемным методом с последующей очисткой при помощи дифференциального центрифугирования [Саляев и др., 1981]. Чистоту полученной фракции оценивали по белкам маркерам. Расчет полученных данных проводили на количество вносимого белка. Определение белка осуществляли по методу [Bradford, 1976]. Транспортную активность протонных помп тонопласта определяли методом флуоресцентных зондов. Для контроля специфичности реакций во всех экспериментах использовали общепринятые ингибиторы. Оценку стрессового влияния кадмия проводили по количеству образовавшихся продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов), а также по уровню проницаемости клеточных мембран. Изучение проницаемости клеточных мембран проводили кондуктометрическим методом.

В результате проведенных исследований было выяснено, что в присутствии ионов кадмия происходят изменения в проницаемости клеточных мембран. В ответ на добавление кадмия в инкубационный раствор наблюдалось увеличение выхода электролитов, однако значимые изменения отмечались только при использовании концентрации 100 мкМ. В условиях 1 и 10 мкМ кадмия достоверных отличий от контроля не наблюдалось. Для оценки влияния кадмия на биологические мембраны проводили определение продуктов перекисного окисления липидов. Было установлено, что используемые концентрации кадмия не достаточно влияли на количество образовавшихся диеновых конъюгатов, хотя в концентрации 100 мкМ и отмечалось небольшое увеличение их содержания. Можно сказать, что, несмотря на увеличение проницаемости клеточных мембран, в пределах используемых концентраций, кадмий не вызывает существенных изменений в липидной составляющей мембран. В дальнейшем проводилась работа по изучению влияния ионов кадмия на транспортные белки тонопласта (H^+ -АТФазу и H^+ -пирофосфатазу). Оценку активности этих ферментов проводили по результатам их протонтранслоцирующей активности. В ходе проведенных экспериментов было выявлено влияние ионов кадмия на транспорт обеих протонных помп. В присутствии 1, 10 и 100 мкМ ионов кадмия происходило частичное ингибирование их активности. Наблюдаемые изменения частично соотносимы и с результатами других исследователей [Kabała et al., 2010]. По-видимому, в данном случае снижение активности может быть связано с конформационными изменениями в структуре изучаемых протонных помп. В результате проводимых экспериментов было выявлено различное влияние кадмия на протекание метаболических реакций в растительном организме, что дает нам возможность для дальнейшего изучения механизмов его влияния на внутриклеточные процессы.

Литература

Озолина Н.В., Колесникова Е.В., Нурминский В.Н., Нестеркина И.С., Дударева Л.В., Донская Л.И., Саляев Р.К. Влияние экзогенного донора Ca^{2+} и изменения содержания ионов кальция на транспортную активность протонных насосов тонопласта в онтогенезе и при гиперосмотическом стрессе // Биологические мембраны. – 2010. – Т. 27, № 4. – С. 354–358.

Саляев Р.К., Кузеванов В.Я., Хаптагаев С.Б., Копытчук В.Н. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений // Физиология растений. – 1981. – № 28. – С. 1295–1305.

Bradford D.P. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilising the principal of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – No. 72. – P. 248–254.

Dietz K.J., Tavakoli N., Kluge C., Mimura T., Sharma S.S., Harris G.C., Chardonnens A.N., Golldack D. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level // *Experimental Botany*. – 2001. – V. 52 (363). – P. 1969–1980.

Inoue T., Forgac M. Cysteine-mediated cross-linking indicates that subunit C of the V-ATPase is in close proximity to subunits E and G of the V1 domain and subunit a of the V0 domain // *J. of Biol. Chemistry*. – 2005. – V. 280 (30). – P. 27896–27903.

Kabała K., Janicka-Russak M., Kłobus G. Different responses of tonoplast proton pumps in cucumber roots to cadmium and copper // *J. Plant Physiol.* – 2010. – V. 167 (16). – P. 1328–35.

Khan A., Khan S., Khan M.A. Qamar Z., Waqas M. The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrient, and associated health risk: a review // *Environ. Sci. Pollut. Pes.* – 2015. – V. 22. – P. 13772–13799.

Khoudi H., Maatar Y., Gouiaa S., Masmoudi K. Transgenic tobacco plants expressing ectopically wheat H⁺-pyrophosphatase gene TaVP1 show enhanced accumulation and tolerance to cadmium // *J. Plant Physiol.* – 2012. – V. 169 (1). – P. 98–103.

Maeshima M. Tonoplast transporters: organization and function // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2001. – V. 52. – P. 469–497.

Regvar M., Vogel-Mikuš K. Recent advances in understanding of plant responses to excess metals: exposure, accumulation and tolerance // *Sulfur assimilation and abiotic stress in plants* / Ed. N. A. Khan. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. – P. 227–251.

Sandalio L. M., Rodríguez-Serrano M., del Rio L. A., Romero-Puertas M. C. Reactive oxygen species and signaling in cadmium toxicity // *Signaling and communication in plants* / Eds. L. A. del Rio, A. Puppo. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. – P. 175–189

Toei M., Saum R., Forgac M. Regulation and isoform function of the V-ATPases // *Biochemistry*. – 2010. – V. 49. – P. 4715–4723.

INFLUENCE OF CADMIUM ON PLANT CELL METABOLISM

E.V. Spiridonova, I.S. Nesterkina, V.V. Gurina, N.V. Ozolina

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, yatakol@mail.ru

Abstract. Cadmium is considered one of the important pollutants because of its high toxicity for many organisms. Penetrating the plant cells, it affects the course of metabolic processes, including the transport system of biological membranes. The effect of cadmium (1, 10, 100 μM) on the transport activity of vacuolar proton pumps (H⁺-ATPase and H⁺-PPase) was investigated. The stress effect of cadmium ions on the vacuolar membrane (tonoplast) was estimated by the amount of lipid peroxidation products.

Keyword: cadmium, plant cell, vacuole, transport

ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ АНТРОПОГЕННО ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЭКОСИСТЕМ ДОНЕЦКО-МАКЕЕВСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОЙ АГЛОМЕРАЦИИ

Д.В. Сыщиков¹, И.В. Агурова¹, О.В. Сыщикова²

¹Государственное учреждение «Донецкий ботанический сад», Донецк, 2007dmitry@rambler.ru

²Государственная образовательная организация высшего профессионального образования Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецк, 2015oksana@rambler.ru

Аннотация. В результате проведенных исследований установлено, что блок целлюлозоразрушающих микроорганизмов является наименее представленным в микробоценозе почв мониторинговых участков. Максимальная численность микроорганизмов данной группы характерна для почв с явно выраженным гумусоаккумулятивным горизонтом. Возрастание целлюлозолитической активности эдафотопов зафиксировано для примитивных седиментационных неразвитых почв и чернозема обыкновенного.

Ключевые слова: почва, микробоценоз, целлюлозолитическая активность, антропогенная трансформация

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1146-1150

Общеизвестен тот факт, что устойчивое функционирование природных биоценозов в значительной мере определяется стабильностью биогенного обмена химических элементов (как природного, так и антропогенного происхождения), важная часть которого – минерализация органического вещества в почвах. Активность микрофлоры во многом определяет морфологию почвенного профиля, физико-химические свойства почвы, интенсивность ее биохимических процессов и скорость круговорота веществ [Богородская и др., 2010]. В связи с этим актуальным является изучение микробиологического состояния почв в условиях интенсивного антропогенного воздействия.

Объектом исследования являются эдафотопы техногенных экосистем Донецко-Макеевской промышленной агломерации. Исследования проводились на мониторинговых участках, расположенных в юго-западной части Донецко-Макеевской промышленной агломерации (в пределах Горняцкого административного района г. Макеевки и смежных территорий).

Описание почвенных разрезов проводили по [Назаренко и др., 2004; Полупан и др., 2005]. Отбор почвенных образцов проводили по почвенным горизонтам [Методы ..., 1991].

Мониторинговый участок № 1. Выведенное из эксплуатации шламохранилище (Горняцкий район, г. Макеевка) с бедным растительным покровом и доминированием в составе растительной группировки *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., с общим проективным покрытием 100%.

Разрез № 1-ш. Субстрат (черный песчаный шлам) с признаками почвообразования. Черный, бесструктурный, плотно сложенный, наблюдается первичное агрегатообразование на корнях растений, накопление гумуса не имеет морфологического выражения вследствие слабого развития глинистой составляющей. Включений, ходов и пор зоогенной природы не выявлено. Отбор почвенных образцов проводился по слоям 0-10 см, 10-20 см и 20-30 см.

Мониторинговый участок № 2. Выведенный из эксплуатации карьер по добыче строительного камня (балка Калиновая, Горняцкий район, г. Макеевка). Растительный

покров с высокой мозаичностью, имеются пятна как сорно-рудеральных видов, так и видов степного ценоэлемента. ОПП (за вычетом поверхности крупнообломочного камня) – 70-80%.

Разрез № 1-к. Примитивные неразвитые почвы на песчанике.

Н – 0-5 см. Черный, густо пронизан корнями растений. Структура мелкопорошистая, агрегаты 2 мм диаметром. Переход в горизонт Р четкий по цвету, структуре и плотности. Отмечаются ходы зоогенной природы, выцветы солей (розоватые). Каменистость – 5%.

Р – Светло-коричневый, продукты метаморфизации песчаников. Каменистость – 20%, пронизан корнями растений. Прослежен до глубины 20 см.

Мониторинговый участок № 3. Склон отвала шахты им. Ленина южной экспозиции (Горняцкий район, г. Макеевка). В средней части склона угол поверхности составляет около 30°, поэтому ОПП достигает только 20-30%.

Разрез № 1-о-с. Субстрат с признаками почвообразования.

Нэ – 0-15 см. Коричневый, рыхлый, мелкозернистый, суховатый. Каменистость – 5%. Переход в горизонт Р – постепенный, по цвету – затеками.

Р – палевый, прослежен до глубины 30 см. Каменистость – 15%.

Мониторинговый участок № 4. Зона выполяживания склона южной экспозиции у основания отвала шахты им. Ленина (Горняцкий район, г. Макеевка).

Разрез № 1-о-п. Примитивные седиментационные неразвитые почвы.

Н – 0-10 см. Коричневый, относительно уплотненный, мелкозернистый, суховатый. Каменистость – 5%. Густо пронизан корнями растений.

Р – Темно-серый, метаморфизированный сланец, пластинчатый, сухой, пронизан корнями растений. Каменистость – 30%. Прослежен до глубины 30 см.

Мониторинговый участок № 5. Заброшенное поле (м-н Зеленый, Горняцкий район, г. Макеевка). Дендрохронологически, по выросшим древесным растениям, период прекращения вспашки можно оценить в 7-8 лет. Общее проективное покрытие – 80-100%.

Разрез № 1-ч. Чернозем обыкновенный среднemosный суглинистый.

Н – 0-62 см. Черный, свежеватый, сплошно дернистый, умеренно плотный, структура – средне комковатая. Густо пронизан корнями растений. В горизонте отмечается незначительное количество ходов зоогенной природы. Вскипает с поверхности до глубины 50 см от 10% HCl. Переход в горизонт Нр постепенный, по цвету, затеками.

Нр – 62-80 см. Плотный, средне комковатый, светло-коричневый.

Р – материнская порода (палевый лессовидный суглинок) 80 см и ниже.

При изучении микробоценоза разных почвенных горизонтов образцы отбирались из свежевыкопанного почвенного разреза. Образцы почвы, отобранные для микробиологического анализа, диспергировали путем растирания почвы, извлекали корни растений и включения. Для посева готовили почвенную суспензию (10 г почвы в 100 мл стерильной водопроводной воды). Потом готовили необходимое для посева разведение. Почвенную суспензию высевали на агар Гетчинсона с нанесением фильтровальной бумаги как источника целлюлозы. Подсчет колоний проводили на 7-10-е сутки исследований. После подсчета количества колоний на 5 параллельных чашках производили перерасчет на 1 г почвы [Методы ..., 1991; Руководство ..., 1995].

Определение целлюлозолитической активности почвы проводили аппликационным методом. Стерильной хлопчатобумажной тканью обшивали стерильное предметное стекло и в подготовленный почвенный разрез к вертикальной поверхности почвы прикладывали предметное стекло с полотном и придавливали почвой так, чтобы верхняя грань стекла выступала около 1 см. Раз в месяц полотна

осторожно извлекались, отмывались от почвы, продуктов полураспада, подсушивались и взвешивались. Об интенсивности целлюлозолитической активности почвы судят по разнице массы полотна, которое не вносилось в почву и полотна такого же размера, которое извлекли из почвы. Активность выражается в процентах [Казеев, 2003].

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась по общепринятым методам параметрической статистики на 95% уровне значимости по [Доспехов, 1985; Приседский, 1999].

Одним из показателей биологической активности почвы служит ее целлюлозоразрушающая способность, свидетельствующая о темпах превращения растительных остатков в почве. Анализ данных таблицы позволил установить, что блок целлюлозоразрушающих микроорганизмов является наименее представленным в микробоценозе почв мониторинговых участков. Наряду с этим, субстрат шламохранилища характеризовался минимальными показателями численности микроорганизмов – деструкторов целлюлозы, которые практически не изменялись по почвенным слоям во все периоды исследований. В почвах участков с явно выраженным гумусоаккумулятивным горизонтом количество целлюлозоразрушающих микроорганизмов превышало аналогичные показатели верхнего слоя субстрата шламохранилища в 3,6-7,8 раз.

Таблица.

Численность целлюлозоразрушающих микроорганизмов (тыс. КОЕ/ г а.с.п.) почв антропогенно трансформированных экосистем

Участок	Весна		Лето		Осень	
	M±m	%	M±m	%	M±m	%
№ 1 0-10 см	0,06±0,004*	–	0,04±0,009	–	0,05±0,003	–
№ 1 10-20 см	0,03±0,008*	–	0,02±0,003	–	0,02±0,001	–
№ 1 20-30 см	0,01±0,003*	–	0,01±0,002	–	0,01±0,001	–
№ 2 Н	0,47±0,07*	783,3	0,25±0,01*	625,0	0,29±0,002*	580,0
№ 2 Р	0,39±0,06*	3900,0	0,3±0,008*	3000,0	0,27±0,03*	2700,0
№ 3 Н	0,12±0,05*	200,0	0,07±0,003*	175,0	0,09±0,004*	180,0
№ 3 Р	0,08±0,01*	800,0	0,04±0,001*	400,0	0,06±0,002*	600,0
№ 4 Н	0,25±0,004*	416,7	0,13±0,01*	325,0	0,18±0,02*	360,0
№ 4 Р	0,16±0,007*	1600,0	0,09±0,004*	900,0	0,12±0,01*	1200,0
№ 5 Н	0,31±0,06*	516,7	0,23±0,006*	575,0	0,26±0,03*	520,0
№ 5 Нр	0,17±0,04*	566,7	0,09±0,005*	450,0	0,14±0,009*	700,0
№ 5 Р	0,09±0,007*	900,0	0,04±0,004*	400,0	0,08±0,004*	800,0

Примечание. % – процент превышения значений по отношению к аналогичным почвенным горизонтам участка № 1, * – различия статистически достоверны при $p < 0,05$

В целом же, по количеству целлюлозоразрушающих микроорганизмов почвы мониторинговых участков располагаются в следующем убывающем ряду: примитивные неразвитые почвы на песчанике>чернозем обыкновенный среднemocный суглинистый>примитивные седиментационные неразвитые почвы>субстрат с признаками почвообразования на склоне породного отвала>субстрат с признаками почвообразования шламохранилища.

Наряду с чашечным методом определения целлюлозоразрушающей способности почв используется и аппликационный метод, основанный на измерении микробиологического разложения ткани за определенный временной промежуток.

Анализ полученных результатов свидетельствует о наиболее высоком уровне целлюлозолитической активности примитивных седиментационных неразвитых почв зоны выполаживания породного отвала, доходящей до 60% (рисунок).

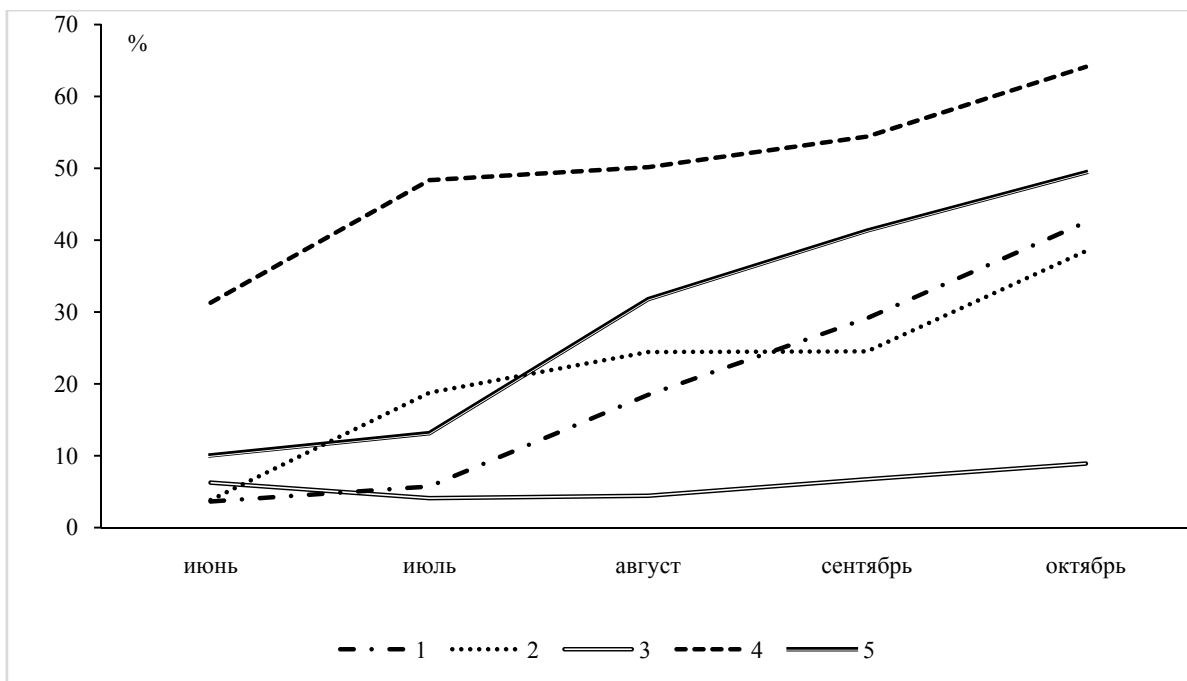


Рисунок. Интенсивность целлюлозолитической активности почв (%). 1 – участок № 1; 2 – участок № 2; 3 – участок № 3; 4 – участок № 4; 5 – участок № 5.

Исследования сезонной динамики изменений активности в исследованных эдафотопках показывают, что самый низкий уровень целлюлозолитической активности микроорганизмов установлен в июне во всех исследованных почвенных разрезах. Возрастание целлюлозолитической активности наблюдалось уже с июля и на разных мониторинговых участках имело неоднозначный характер. Так, если в субстрате шламохранилища и в черноземе обыкновенном наблюдалась практически линейная зависимость, то в почвах других участков отмечаемое повышение активности чередовалось с выходами на плато. Наиболее существенное возрастание целлюлозолитической активности характерно для участков № 4 и № 5, что свидетельствует о более активной деятельности микроорганизмов, а значит – и о большей доступности элементов минерального питания для растений.

Литература

Богородская А.В., Краснощёкова Е.Н., Трефилова О.В. Сезонная динамика развития микробоценозов и комплексов беспозвоночных на отвалах вскрышных пород Бородинского буроголивого разреза (КАТЭК) // География и природные ресурсы. – 2010. – № 4. – С. 36–45.

Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

Казеев К.Ш. Биологическая диагностика и интродукция почв: методология и методы исследований. – Ростов н/Д: изд-во РГУ, 2003. – 216 с.

Методы почвенной микробиологии и биохимии / под. ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.

Назаренко І.І., Польчина С.М., Нікорич В.А. Грунтознавство. – Чернівці: Книги-XXI, 2004. – 400 с.

Полупан М.І., Соловей В.Б., Величко В.А. Класифікація ґрунтів України. – К.: Аграрна наука, 2005. – 300 с.

Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: навчальний посібник. – Донецьк, Касіопія, 1999. – 210 с.

Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова.
М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.

**CELLULOSOLYTIC ACTIVITY OF SOILS OF ANTHROPOGENICALLY
TRANSFORMED ECOSYSTEMS OF THE DONETSK-MAKEEVKA INDUSTRIAL
AGGLOMERATION**

D.V. Syshchykov¹, I.V. Agurova¹, O.V. Syshchykova²

¹State institution Donetsk Botanical Garden, Donetsk, 2007dmitry@rambler.ru

²State educational institution of higher professional education M. Gorky Donetsk
national medical university, Donetsk, 2015oksana@rambler.ru

Abstract. As a result of the carried out researches it is established that the block of cellulose-destroying microorganisms is the least presented in a microbocenosis of soils of monitoring sites. The maximum number of microorganisms of this group is characteristic of soils with obviously expressed humus-accumulative horizon. Increase of cellulolytic activity of edafotop is recorded for primitive sedimentary undeveloped soils and the chernozem usual.

Keywords: soil, microbocenosis, cellulolytic activity, anthropogenic transformation

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАСТЕНИЯМИ, В УСКОРЕНИИ ПРОЦЕССОВ РАЗЛОЖЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ

М.С. Третьякова¹, Л.А. Беловежец², Л.Г. Соколова¹, С.Ю. Зорина¹, Ю.А. Маркова¹, Л.Е. Макарова¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *marina-tretjakova@yandex.ru*

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *lyu-sya@yandex.ru*

Аннотация. Исследована перспективность применения эндо- и ризосферных микроорганизмов для ускорения процессов разложения углеводородов нефти и биоремедиации нефтезагрязненной почвы. Показано, что исследованные штаммы способны к эффективной деструкции нефти в жидкой минеральной среде и почве.

Ключевые слова: нефть, эндо- и ризосферные бактерии-нефтедеструкторы, биоремедиация

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1151-1154

Негативным последствием добычи, переработки, транспортировки нефтяных углеводородов является загрязнение окружающей среды. Нефть и нефтепродукты, попадая в почву в результате разливов, приводят к снижению плодородия почвы, угнетению растительного покрова, изменению биологического разнообразия природных ландшафтов [Андреева и др., 2007].

Для ликвидации последствий подобного рода загрязнений в последнее время используют аборигенные углеводородоокисляющие микроорганизмы, которые, благодаря наличию ферментативных систем, окисляют вредные вещества до безопасных соединений, таких как CO₂ и H₂O [Fuentes et al., 2014; Xenia et al., 2016; Тарабукина и др., 2017]. Известно, что перспективными нефтедеструкторами являются микроорганизмы, ассоциированные с растениями. Есть данные, указывающие, что у эндосферных и ризосферных микроорганизмов встречаемость плазмид, которые ответственны за деградацию нефти выше, чем у почвенных микроорганизмов [Siliciano et al., 2001; Oliveira et al., 2011]. Поэтому целесообразно при биоремедиации нефтезагрязненной территории использовать эндофитные и ризосферные микроорганизмы как перспективные нефтедеструкторы [Ryan et al., 2006; Муратова, 2013; Чеботарь и др., 2015]. Целью настоящей работы стало выделение и оценка перспективности бактерий, ассоциированных с растениями нефтезагрязненной территории в процессе биоремедиации почвы, загрязненной нефтью.

В результате исследований из эндо- и ризосферы растений, которые произрастали на почве, подвергшейся нефтяному загрязнению в 1998 г. (п. Тыреть, Иркутская обл.), выделены и идентифицированы 6 штаммов микроорганизмов-нефтедеструкторов. Проверена их нефтеразлагающая активность в жидкой минеральной среде и почве. В жидкой минеральной среде при добавлении различных концентраций нефти микроорганизмы утилизировали около 30% нефти за 2 месяца культивирования при температуре 26 °С (табл. 1).

Для ускорения деструкции нефти микроорганизмами были составлены ассоциации микроорганизмов. Исследована их деструктивная активность при различных температурах: 4, 10, 26 °С (табл. 2). Показано, что при использовании

ассоциаций микроорганизмов при температуре 26 °С убыль нефти достоверно отличалась в случае применения монокультур. При температуре 4 °С разложение нефти практически не происходило. При температуре 10 °С отмечалось разрушение нефтяной пленки, образование мелких капель нефти. Степень деструкции нефти составляла 15% за 2 месяца культивирования при исходной концентрации нефти в среде 10 % (табл. 2).

Таблица 1.

Убыль нефти (в %) при разных её концентрациях в жидкой минеральной среде в результате деградации штаммами 90, 102, 108, 109, 112,114 в течение 60 сут, при температуре 26 °С с вычетом абиотической убыли

Степень биодegradации нефти, %						
Концентрация нефти, % (v/v)	Штамм					
	<i>Pseudomonas</i> (90)	<i>Pseudomonas</i> (102)	<i>Rhodococcus</i> (108)	<i>Pseudomonas</i> (109)	<i>Acinetobacter</i> (112)	<i>Acinetobacter</i> (114)
5	26±0.9	22±2.2	30±1.5	24±1.9	35±0.8	32±1
10	15±1.7	13±1.2	11±0.8	12±1.4	28±2	23±1.7
15	12±0.9	10±1.3	10±1.1	10±0.8	24±1.4	22±1.4
20	9±1.3	7±0.8	7±0.4	8±1.2	16±1.5	18±1.5
50	5±0.7	4±0.8	5±1	6±1.2	8±1.4	10±1

Таблица 2.

Разложение нефти ассоциациями микроорганизмов через 60 сут культивирования при различной температуре, концентрация нефти в среде – 10%

Температура культивирования	Ассоциации штаммов	Степень деструкции нефти, %
4 °С	108+114	2±1.5
	108+112	1,5±2.0
	112+114	3,4±0.5
	108+112+114	1,3±2.1
10 °С	108+114	5±0.2
	108+112	7±0.5
	112+114	15±0.2
	108+112+114	4,4±0.8
26 °С	108+114	26±1.5*
	108+112	30±3.5*
	112+114	32±1.0*
	108+112+114	25±3.8*

Примечание: звездочкой показаны достоверные различия показателя от монокультуры при уровне значимости $p \leq 0,05$

Эффективность выделенных микроорганизмов для целей биоремедиации загрязненной нефтью почвы определяли на основе показателей ее биологической активности и убыли нефти. Использовали следующие параметры: фитотоксичность почвы, изменение ферментативной и дыхательной активности почвы и общей численности почвенной микрофлоры [Плешакова и др., 2011; Сулейманов и др., 2012; Кириенко и др., 2015]. В результате исследования показано, что утилизация нефти за 60 сут эксперимента в варианте без бактерий составила 45%, в варианте с бактериями – до

70% от исходного загрязнения (рисунок). В вариантах с микроорганизмами увеличивалась активность почвенных оксидоредуктаз (до 8 раз), снижалось токсическое действие углеводородов нефти на растения (до 1,5 раз), усиливалась интенсивность почвенного дыхания (до 74% относительно варианта без бактерий). Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые штаммы микроорганизмов являются эффективными нефтеструкторами.

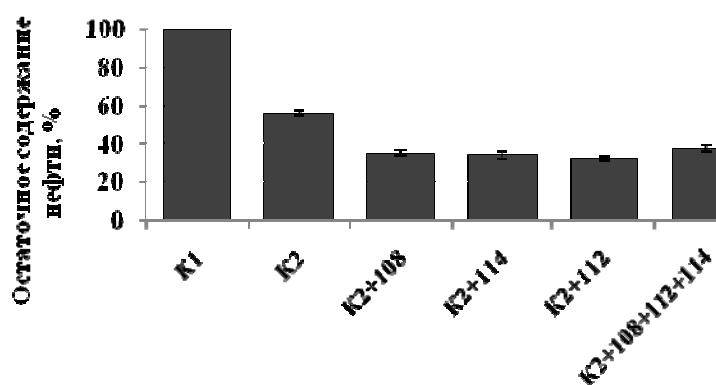


Рисунок. Остаточное содержание нефти в почве за 60 сут эксперимента: K1 – исходное содержание нефти, K2 – внесение нефти в почву без бактерий.

Таким образом, исследованы перспективные штаммы нефтеструкторы, выделенные из эндо- и ризосферы растений. Данные штаммы принадлежат к роду *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и могут быть использованы в целях биоремедиации.

Литература

Андреева И.С., Емельянова Е.К., Олькин С.Е., Резникова И.К. и др. Утилизация углеводородов психротолерантными штаммами-деструкторами // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 43, № 2. – С. 223–228.

Кириенко О.А., Имранова Е.Л. Влияние загрязнения почвы нефтепродуктами на состав микробного сообщества // Вестник ТОГУ. – 2015. – № 3 (38). – С. 79–86.

Муратова А.Ю. Растительно-микробные ассоциации в условиях углеводородного загрязнения: Автореф. дис. ... доктора биол. наук: 03.00.07, 03.01.06. – Саратов, 2013. – 47 с.

Плешакова Е.В. Муратова А.Ю., Турковская О.В. Изменение биологической активности загрязненной углеводородами почвы // Поволжский экологический журнал. – 2011. – № 4. – С. 482–488.

Сулейманов Р.Р., Шорина Т.С. Влияние нефтяного загрязнения на динамику биохимических процессов чернозема обыкновенного // Известия Самарского научного центра РАН. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 240–243.

Тарабукина Н.П. Саввинов Д.Д., Неустроев М.М., Степанова А.М., Неустроев М.П., Сазонов Н.Н., Парникова С.И. Экологическая оценка и биоремедиация нефтезагрязненных мерзлотных почв Якутии. – Новосибирск: Изд. АНС «СибАК», 2017. – 136 с.

Чеботарь В.К. Мальфанова Н.В., Щербаков А.В., Ахтемова Г.А., Борисов А.Ю., Люгтенберг Б., Тихонович И.А. Эндофитные бактерии в микробных препаратах, улучшающих развитие растений (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 3. – С. 283–289.

Fuentes S., Mendez V., Aguila P., Seeger M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications // Applied microbiology and biotechnology. – 2014. – V. 98, No. 11. – P. 4781–4794.

Oliveira V., Newton C., Gomes M., Almeida A. Hydrocarbon contamination and plant species determine the phylogenetic and functional diversity of endophytic degrading bacteria // Molecular Ecology. – 2014. – V. 23, No. 6. – P. 1392–1404.

Ryan R., Germaine K., Franks A., Ryan D., Dowling D. Bacterial endophytes: recent developments and applications // FEMS microbiology letters. – 2008. – V. 278, No. 1. – P. 1–9.

Siciliano S.D., Fortin N., Mihoc A., Wisse G., Labelle S., Beaumier D., Schwab P. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination // Applied and environmental microbiology. – 2001. – V. 67, No. 6. – P. 2469–2475.

Xenia M., Refugio R. Microorganisms metabolism during bioremediation of oil contaminated soils // J. of Bioremediation & Biodegradation. – 2016. – V. 7, № 340. – P. 1–6.

ASPECTS OF APPLICATION OF BACTERIA ASSOCIATED WITH PLANTS IN ACCELERATION OF OIL HYDROCARBONS DEVELOPMENT PROCESSES

M.S. Tretyakova¹, L.A. Belovezhets², L.G. Sokolova¹, S.Y. Zorina¹, Yu. A. Markova¹, L.E. Makarova¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, marina-tretjakova@yandex.ru

²A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, lyu-sya@yandex.ru

Abstract. The prospects of the use of endo- and rhizosphere microorganisms to accelerate the decomposition of petroleum hydrocarbons and bioremediation of contaminated soil are investigated. It is shown that the studied strains are capable of effective destruction of oil in a liquid mineral medium and soil.

Keywords: oil, endo- and rhizosphere bacteria-oil destructors, bioremediation

**СЕКЦИЯ 4.
БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ
И МИКРООРГАНИЗМОВ**

СОВРЕМЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И ЕЁ ПЕРСПЕКТИВЫ В ТАДЖИКИСТАНЕ

К. Алиев, К. Партоев, З.Б. Давлятназарова

Институт ботаники, физиологии и генетики растений Академии наук Республики Таджикистан, Душанбе, Таджикистан, *pkurbonali@mail.ru, lab.gen@mail.ru*

Аннотация. Определено, что соматональная изменчивость связана с необходимостью разработки методов, с помощью которых можно было выявлять достоверные генетические различия между каллусными культурами и исходными линиями, из которых они получены. Полученные клеточно-генным путем растений являются актуальными и приоритетными в биохимии и физиологии растений. Установлены гены, изменяющие морфологию растений при воздействии стрессоров в ходе роста и развития растений. Нами начаты работы для получения растений с двойным назначением: устойчивостью к высокой температуре и имеющих высокую продуктивность. Кроме того, нами планируется получение методом современной биотехнологии растений картофеля, не аккумулирующих акриламид в клубнях. В связи с этим планируется изучение регуляции синтеза белков теплового шока и других белков, отвечающих за повышение адаптивности различувствительных генотипов растений (пшеницы, эгилопса, картофеля и других сельскохозяйственных культур) в лабораторных условиях *in vitro*.

Ключевые слова: *современная биотехнология, растений, морфология, in vitro*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1156-1159

В настоящее время исследования в области биологических наук выходят на более высокий – на молекулярный и надмолекулярный уровень развития. Значительная доля исследований в этом направлении осуществляется в русле современной или новейшей биотехнологии, которая обусловлена как прогрессом науки, так и социально-экономическими потребностями общества, направленными на решение проблем экологии, создание новых лекарственных препаратов и диагностики болезней, новых высокопродуктивных сельскохозяйственных растений, устойчивых к стрессовым воздействиям.

Сам термин «биотехнология» появился не так давно, вместо него употреблялись слова «промышленная микробиология», «техническая биохимия» и др. Однако, надо учесть тот факт, что еще с древних времен люди применяли биотехнологию для собственных нужд, например в хлебопечении и получении молочнокислых продуктов. В традиционном, классическом понимании биотехнология – это наука о методах и технологиях производства различных веществ и продуктов с использованием природных биологических объектов и процессов [Алиев, 2012].

Термин «новая» биотехнология в противоположность «старой» биотехнологии применяют для определения биопроцессов, использующих методы клеточной и генной инженерии, основанные на современных достижениях молекулярной биологии.

Генная и клеточная инженерия являются важнейшими инструментами, лежащими в основе современной биотехнологии. Методы клеточной инженерии направлены на конструирование клеток нового типа. Они могут быть использованы для воссоздания жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток, для объединения целых клеток, принадлежавших различным видам с образованием клетки, несущей генетический материал обеих исходных клеток, и других операций. Наибольшее применение новейшая биотехнология нашла в сельском хозяйстве и в медицине.

С давних времен основным методом, который использовался в этих целях, была селекция. Она широко применяется до настоящего времени и направлена на создание новых и улучшение уже существующих сортов культурных растений, пород домашних

животных и штаммов микроорганизмов с ценными для человека признаками и свойствами. Селекция строится на отборе растений (животных) с выраженными благоприятными признаками и дальнейшем скрещивании таких организмов, в то время как генная инженерия позволяет непосредственно вмешиваться в генетический аппарат клетки. Стало возможным изменять у растений, например устойчивость к климату и стрессам или их чувствительность к насекомым или болезням, распространённым в определённых регионах, к засухе и т.д. Учёные надеются даже получить такие породы деревьев, которые были бы устойчивы к пожарам. Ведутся исследования по улучшению пищевой ценности различных сельскохозяйственных культур, таких как кукуруза, соя, картофель, томаты, горох и др.

Использование методов клеточной инженерии позволяет моделировать изменения генома, не манипулируя с генами. При определенном давлении на геном стрессовыми факторами (высокая температура, засуха, засоление, пестициды и другие факторы) можно получить в нем предполагаемые перестройки. В результате такого воздействия на уровне клетки могут появиться формы с измененными признаками, способные расти в стрессовых условиях. Этот феномен нами используется для создания новых форм с/х растений с улучшенной конструкцией генома, обеспечивающей высокую урожайность, качество урожая и устойчивость к различным стрессорам, а также для сортоулучшения культурных растений.

Поэтому особый приоритет вызывает исследование физиолого-биохимических механизмов, лежащих в основе ответных реакций растений к воздействию стрессоров (высокая и низкая температура, засуха, засоление, тяжёлые металлы и т.д.). В связи с этим планируется изучение регуляции синтеза белков теплового шока и других белков, отвечающих за повышение адаптивности разночувствительных генотипов растений (пшеницы, эгилопса, картофеля и других сельскохозяйственных культур). Мы предполагаем, что экспрессии стрессовых белков осуществляются в результате связывания транскрипционного фактора – шаперонов с промоторами соответствующих генов. Также будет уделяться особое внимание роли шаперонов в регуляции экспрессии стрессорных генов в усилении адаптационной реакции растений на воздействия стрессоров, ингибируя или активируя транскрипцию стрессорных генов. Также в лабораторных условиях будет изучаться роль азидата натрия, являющаяся одним из факторов стресса, так как может влиять на возможные индукции шаперонов сопоставимыми с природными стрессорами.

До сих пор мы обращали мало внимания на развитие фундаментальных исследований в области растениеводства, основу основ, которых составляют работы в области молекулярной биологии, молекулярной генетики и генетической инженерии растений. Успех в этих областях науки открывает широчайшую дорогу в сознательном контроле роста, развития и продуктивности растений. Ведь фундаментальные работы должны опираться на современные тенденции развития биологической науки.

Развитие молекулярной биологии и генной инженерии существенно ускоряет научно-технический прогресс в республике и создает предпосылки для создания экологически чистых сельскохозяйственных растений. В перспективе в биологических исследованиях большой удельный вес займут работы, направленные на повышение эффективности и скорости фотосинтеза. Ведутся интенсивные исследования биологической фиксации атмосферного азота. В отдаленной перспективе важную роль играет введение в растения бактериальных генов, обеспечивающих фиксацию азота, т.е. такие растения будут обеспечиваться азотом в нужном количестве и в нужное время азотом.

Успехи современной биотехнологии могут привести к получению совершенно новых генотипов растений с новыми или улучшенными признаками. Трудно

представить себе масштабы вмешательства в генетическую конструкцию растений и пользу, которую могут принести исследования в области современной биологической науки (физиология, биохимия, молекулярная биология, молекулярная генетика и т.д.), особенно в условиях всевозрастающего глобального изменения климата.

Для оценки генотипов на устойчивость к неблагоприятным факторам среды, таким как засоление, засуха, повышенная температура и т.п. культура клеток и тканей *in vitro* находит широкое применение. Такие инновационные технологии *in vitro* позволяют вести отбор растений на устойчивость к различным стрессорам и патогенам, уменьшают физические объемы экспериментального материала, трудозатраты и значительно сокращают сроки получения новых, высокопродуктивных форм и сортов сельскохозяйственных растений.

Для изучения общих механизмов устойчивости особый интерес представляет оценка ответных реакций растений на стрессовые факторы. При стрессе происходит индукция экспрессии различных групп генов, определяющих новообразование целого ряда функциональных макромолекул, таких как ключевые ферменты синтеза и деградации осмолитов, а также молекул, служащих защитой клеточных белков при стрессе, что способствует удалению денатурированных полипептидов, регулирующих водный статус растений. Аккумуляция осмолитов, таких как пролин и другие аминокислоты, оказывающих защитные, осморегуляторные и антиоксидантные эффекты, также важны для решения продовольственной ценности.

В этом плане нами разработана технология культуры клеток *in vitro* пшеницы и картофеля, методы молекулярного скрининга, основанные на исследовании физиологических и биохимических параметров с использованием селективных агентов, которые успешно используются для получения растений свободных от вирусов и устойчивых к высокой температуре и засолению. Это связано с тем, что в процессе культивирования клеток можно отобрать растения, содержащие комплекс генов, контролирующей устойчивость к различного рода вирусам, патогенным грибам, бактериям и природным стрессовым факторам. Для отбора растений, устойчивых к стрессам, нами разработан метод молекулярного скрининга, основанный на методах физиологии и биохимии с использованием селективных агентов, что непременно будет использоваться для получения стресс-толерантных и высокоурожайных сельскохозяйственных культур [Джонгиров, 1999].

При анализе новых форм растений (пшеница, картофель) широко используются молекулярные и биохимические маркеры. В настоящее время для молекулярно-генетического анализа растений используется более 20 разных маркеров. Эти маркеры можно использовать для анализа растений, полученных путем клеточной или генной технологии, которые позволяют охарактеризовать транслокации и инсерции генов, возникших в результате соматической изменчивости культивирования клеток *in vitro*, что имеет большое значение для новой селекции культурных растений [Киру, 2009; Carli et al., 2008].

Такой подход позволяет в кратчайший срок обнаружить перспективные формы растений, обладающие стресс-толерантностью и продуктивностью. В связи с этим изучение физиолого-биохимических особенностей этих растений является приоритетным направлением в современной биологии.

Трудности в изучении соматической изменчивости связаны с необходимостью разработки методов, с помощью которых можно было бы четко выявлять достоверные генетические различия между каллусными культурами и исходными линиями, из которых они получены. Поэтому исследования полученных клеточно-генным путем растений, также является актуальным и приоритетным в биохимии и физиологии растений. Для этого необходимо выявить гены, изменяющие морфологию растений при

воздействии стрессоров в ходе роста и развития растений. В перспективе нами начаты работы с целью получения растений с двойным назначением. Например, высокая урожайность картофеля должна сочетаться с активностью антиокислительных систем. Метаболически активное железо, аккумулирующееся в клубнях, способствует улучшению содержания гемоглобина в крови человека, т.е. является лекарственным препаратом активно участвующим в процессе синтеза гемоглобина. Кроме того, нами планируется получение методом современной биотехнологии растений картофеля не аккумулирующих акриламид в клубнях. Многие сорта картофеля, возделываемые в Республике Таджикистан, не тестировались на содержание акриламида, который является канцерогенным, мутагенным и очень опасным для организма человека веществами. Далее нами также проводятся работы по получению длительно цветущих растений картофеля с выделением большого количества нектара, который привлекает пчел. Такие растения должны иметь высокую клубневую продуктивность. Намеченные в перспективы работы соответствуют уровню мировых стандартов и являются приоритетными в мировой науке в области физиологии, биохимии и молекулярной биологии.

Конечным результатом нашей научной деятельности является оценка эффективности растений, полученных методом современной биотехнологии, оценка молекулярных изменений, происходящих в растениях при действии стрессоров, для выявления оптимальных путей получения сортов сельскохозяйственных растений, обладающих устойчивостью к неблагоприятным природным факторам и повышенной урожайностью и их реализация в производство с целью решения продовольственной безопасности в Республике Таджикистан.

Литература

Алиев К.А. Биотехнология растений: клеточно-молекулярные основы. – Душанбе, 2012. – 173 с.

Джонгиров Д.О. Биологические особенности диких видов, межвидовых гибридов и сортов картофеля в горных условиях Западного Памира // Автореф. дис. ... к.б.н., Душанбе, 1995. – 25 с.

Киру С.Д. Итоги и перспективы исследований мировой коллекции картофеля // Сборник докладов Международной конференции - Генетические ресурсы культурных растений в XX веке. – Санкт-Петербург, 2009. – С. 233–238.

Carli C., Khalikov D., Yuldashev F., Partoev K., Melikov K., Naimov S. // In: Abstracts Global Potato Conference, Delhi, 2008. – P. 31–32.

MODERN BIOTECHNOLOGY AND IT PROSPECTS IN TAJIKISTAN

K. Aliev, K. Partoev, Z.B. Davlyatnazarova

Institute of botany, plant physiology and genetics of Academy Science of the Republic of Tajikistan, pkurbonali@mail.ru, lab.gen@mail.ru

Abstract. It is defined that the selfclonale variability is connected with need of development of methods by means of which it was possible to reveal reliable genetic differences between callus cultures and initial lines from which they are received. Received by a cellular and gene way of plants, are relevant and priority in biochemistry and physiology of plants. The genes changing morphology of plants at influence of stressor are established during growth and development of plants. We began works for receiving plants with dual purpose: resistance to high temperature and having high efficiency. Besides, by us it is planned on the basis of use of methods of modern biotechnology of the plants of potatoes which are not accumulating acrylamide in tubers. In this regard studying of regulation of synthesis of proteins of thermal shock and other proteins answering behind increase in adaptability of different genotypes of plants (wheat, an egilopsa, potatoes and other crops) in laboratory conditions *in vitro*.

Keywords: *modern biotechnology, plants, morphology, in vitro*

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К РЖАВЧИНЫМ БОЛЕЗНЯМ

Б.Б. Анапияев¹, К.М. Исакова¹, Е.Б. Бейсенбек¹, А.Т. Сарбаев², А.Б. Ахметова²

¹Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный исследовательский технический университет имени К.И. Сатпаева», Институт химических и биологических технологий, Алматы, Казахстан, bak_anapiyayev@mail.ru

²Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, Алмалыбак, Казахстан

Аннотация. В работе приведены результаты использования гаплоидной биотехнологии на основе культуры изолированных микроспор *in vitro* в селекции пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на устойчивость к ржавчинным болезням. Методом гаплоидной биотехнологии были созданы ценные дигаплоидные линии пшеницы из перспективных гибридов. Дигаплоидные линии были испытаны на устойчивость к ржавчинным болезням. Из дигаплоидных линий был отобран и создан новый высокопродуктивный сорт пшеницы, который был районирован в Алматинской и Жамбылской области Южного Казахстана

Ключевые слова: гаплоидная биотехнология, культура микроспор, пшеница, *Triticum aestivum* L., ржавчинные болезни

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1160-1163

Гаплоиды являются уникальным объектом для клеточной селекции и генетической инженерии растений. Экономическая эффективность использования гаплоидов заключается в возможности ускоренного создания генетически стабильных гомозиготных линий из перспективных гибридов и ценных генетических материалов и мутантных форм [Zheng, 2003]. Обычно для генетической стабилизации перспективных гибридов и ценных форм при использовании традиционных методов селекции требуется 6-8 лет. Использование гаплоидной биотехнологии позволяет создать генетически стабилизированные, гомозиготные константные дигаплоидные линии всего за 1-2 года. Также очень важным является то, что у полученных дигаплоидных линий проявляются и рецессивные гены, многие из которых могут нести ценные признаки. Это является очень важным преимуществом гаплоидной биотехнологии, поскольку позволяет экспрессироваться и закрепляться в растениях-регенерантах рецессивным генам, которые могут нести ценные гены. Гены также контролируют устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессовым факторам окружающей среды. Ржавчинные болезни пшеницы наносят ощутимый урон урожаю. В годы эпифитотии они снижают урожайность пшеницы до 60%. Ржавчинные болезни также значительно ухудшают технологические качества зерна. Существует несколько методов получения гаплоидов [Grauda et al., 2010]. Гаплоиды пшеницы можно получать на основе культуры изолированных пыльников [El-Hennawy et al., 2011] и на основе отдаленной гибридизации, где происходит элиминация хромосом отцовских форм [Moradi, 2009]. Для опыления пшеницы и получения гаплоидов при этом используется кукуруза [Saulescu, 2012]. Гаплоидная биотехнология успешно используется для увеличения эффективности селекционного процесса на засухоустойчивость [Anapiyayev et al., 2000].

В нашей работе приведены результаты использования гаплоидной биотехнологии в практической селекции *Triticum aestivum* L. на устойчивость к ржавчинным болезням.

Материалом для исследования служили сорта, изогенные линии и гибриды мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.: Казахстанская-3, Казахстанская-4, Казахстанская-10, Казахстанская-17, Саратовская-29, Стекловидная-24, Эритроспермум-350,

Эритроспермум-841 и Жетысу. Для селекции пшеницы на устойчивость к ржавчинным болезням были использованы изогенные линии Lr 24, Lr 25 и Lr 19 и гибриды, созданные с участием указанных изогенных линий, андроклинные дигаплоидные (АДГ) – линии АДГ 1227, АДГ 1254, АДГ 1255, АДГ 1257, АДГ 1252, АДГ 1251, АДГ 1249, АДГ 1248, АДГ 1245, АДГ 1241, созданные с применением культуры изолированных микроспор *in vitro*. Донорные растения выращивали в полевых условиях на экспериментальных участках до фазы трубкования. Срезанные колосья, содержащие микроспоры на одноядерной стадии подвергали холодной предобработке при +4 °С в течение 7 дней. Для культуры пыльников и микроспор *in vitro* использовали базовые питательные среды Blaydes (0,5 мг/л 2,4-Д) и N6 (1 мг/л 2,4-Д) с нашими модификациями [Анапияев, 2001]. Культивирование пыльников и микроспор *in vitro* осуществляли в темноте при 27 °С. После 20-30 дней культивирования наблюдали образование эмбриоидов и каллусов. Для получения растений-регенерантов эмбриоиды и морфогенные каллусы пересаживали на среды для регенерации Мурасиге-Скуга с 0,5 мг/л ИУК. Статистический анализ полученных результатов проводили по общепринятой методике.

В первой серии экспериментов были определены полевая устойчивость исходных сортов и гибридов пшеницы в условиях инфекционного питомника. Было обнаружено, что поражаемость сортов Казахстанская 3, Казахстанская 10, Казахстанская-4 и Казахстанская 17 варьировала от 40 до 80%, тип поражения – 4 балла, т.е. данные сорта являются восприимчивыми к желтой, бурой и стеблевой ржавчинам. Средневосприимчивыми оказались сорта Стекловидная-24, Эритроспермум-350, Саратовская-29 и Жетысу. Сорта Саратовская-29 и Алмалы характеризовались как слабовосприимчивые, которые поражались на 20%, с типом поражения 2 балла.

Наибольшую устойчивость к ржавчинам показала изогенная линия Lr 24: к желтой ржавчине – 2/20, к бурой – 2/10 и была невосприимчива к стеблевой ржавчине. Сходные значения устойчивости к желтой и бурой ржавчинам проявили изогенные линии Lr 19, Lr 25. По устойчивости к стеблевой ржавчине изогенная линия Lr 25 оказалась слабовосприимчивой – 2/20, а Lr 19 показала среднюю восприимчивость – 3/30, соответственно (табл. 1).

Таблица 1.

Оценка полевой устойчивости сортов и Lr линий пшеницы (инфекционный питомник)

№	Генотипы	Желтая ржавчина <i>Stripe rust</i>		Бурая ржавчина <i>Leaf rust</i>		Стеблевая ржавчина <i>Stem rust</i>	
		1	2	1	2	1	2
1	Казахстанская 3	4	40	4	40	4	60
2	Казахстанская-4	4	40	4	40	3	60
3	Казахстанская-10	3	60	3	30	3	60
4	Казахстанская-17	3	60	3	30	3	30
5	Алмалы	2	20	3	30	3	30
6	Эритроспермум-841	3	30	3	30	3	30
7	Эритроспермум-350	3	30	2	20	3	30
8	Саратовская-29	2	20	3	30	3	60
9	Жетысу	2	20	3	30	3	30
10	Стекловидная 24	4	80	4	40	4	40
11	Lr 19	2	20	2	20	3	30
12	Lr 25	2	20	2	10	2	20
13	Lr 24	2	20	2	10	0	0

Во второй серии экспериментов сорта мягкой пшеницы скрещивали с донорами эффективных генов устойчивости – изогенными линиями Lr 19, Lr 24, Lr 25 (табл. 2). При гибридизации наиболее высокий процент завязываемости отмечен в комбинациях: Казахстанская-3×Lr 24 – 63.1%, Жетысу×Lr 24 – 60.6%, Стекловидная-24×Lr 25 – 59.0%, Казахстанская-4×Lr24 – 50.0 %. Отмечена более высокая завязываемость при внутривидовом скрещивании по сравнению с отдаленной гибридизацией.

Таблица 2.

Создание гибридов мягкой пшеницы с источниками генов устойчивости к ржавчинам пшеницы

Комбинации скрещиваний		Количество опыленных завязей	Количество полученных зерен	Процент завязываемости
1	Казахстанская-3×Lr24	76	48	63.1
2	Казахстанская-4×Lr24	90	45	50.0
3	Казахстанская-10×Lr24	136	63	46.3
4	Казахстанская-10×Lr19	44	23	27.6
5	Казахстанская-17×Lr24	60	16	26.7
6	Саратовская-29×Lr24	104	15	14.4
7	Казахстанская раннеспелая×Lr25	72	24	33.3
8	Стекловидная-24×LR25	44	26	59.0
9	Жетысу×Lr 24	66	40	60.6
10	Казахстанская раннеспелая×Lr24	44	17	38.6

Ценные гибриды пшеницы были генетически стабилизированы методом гаплоидной биотехнологии на основе культуры изолированных микроспор *in vitro*. В результате проведенных исследований по использованию гаплоидной биотехнологии на основе культуры изолированных микроспор *in vitro* в селекции пшеницы *Triticum aestivum* L. на устойчивость к ржавчинным болезням нами были получены эмбриоиды, морфогенные каллусы и растения-регенеранты, из которых были созданы дигаплоидные линии. Для определения устойчивости дигаплоидных линий к ржавчинным болезням они были исследованы в условиях инфекционного питомника Юго-Востока Казахстана (табл. 3).

Таблица 3.

Оценка полевой устойчивости дигаплоидных линий пшеницы (инфекционный питомник)

№	Генотипы	Желтая ржавчина <i>Stripe rust</i>		Бурая ржавчина <i>Leaf rust</i>		Стеблевая ржавчина <i>Stem rust</i>	
		1	2	1	2	1	2
1	АДГ 1227	3	30	2	20	3	30
2	АДГ 1254	1	10	2	20	4	40
3	АДГ 1255	2	10	2	20	4	40
4	АДГ 1257	0	0	2	10	4	40
5	АДГ 1252	2	20	4	60	4	100
6	АДГ 1251	2	10	4	60	4	60
7	АДГ 1249	2	20	4	60	4	60
8	АДГ 1248	0	0	4	70	4	60
9	АДГ 1245	3	10	4	70	4	50
10	АДГ 1241	2	20	4	70	4	50

Примечание: 1 – тип поражения в баллах; 2 – процент поражения

В результате проведенных исследований в условиях инфекционного питомника были отобраны дигапloidные линии пшеницы, которые показали высокий уровень устойчивости к ржавчинным болезням. Дигапloidные линии АДГ 1257 и АДГ 1248 показали высокую устойчивость к желтой ржавчине. Также были выделены дигапloidные линии АДГ 1254 и АДГ 1255.

Указанные дигапloidные линии в последующем были размножены и использованы как исходный материал для создания нового сорта, несущего ценные признаки устойчивости к ржавчинным болезням.

Таким образом, было показано, что гапloidная биотехнология является эффективным методом для ускорения селекционного процесса и быстрой генетической стабилизации перспективных гибридов. На ранних стадиях селекционного процесса были отобраны АДГ линии пшеницы, несущие гены устойчивости к ржавчинным болезням. Созданные в результате исследований дигапloidные линии пшеницы были переданы на испытания в селекционные центры Казахстана и зарубежные страны по линии Международного центра улучшения кукурузы и пшеницы СУММИТ.

Литература

Анапиев Б.Б. Культура микроспор и гапloidная биотехнология пшеницы. – Алматы, 2001. – 220 с.

Anapiyayev B.B., Satybaldiev D., Bogdanova E.D., Polimbetova F.A. Haploid technology in ecological selection of *Triticum aestivum* L. for drought tolerance // Биотехнология. Теория и практика. – 2000. – No. 1-2 (13). – P. 37–41.

El-Hennawy M.F., Abdalla A.F., Shafey S.A., Al-Ashkar I.M. Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique // Annals of Agricultural Science. – 2011. – V. 56. – P. 63–72.

Grauda D., Lepse N., Strazdina V. et al. Obtaining of doubled haploid lines by another culture method for the Latvian wheat breeding // Agronomy Research. – 2010. – V. 8. – P. 545-552.

Moradi P., Haghazari A., Bozorgipour R., Sharma B. Development of yellow rust resistant doubled haploid lines of wheat through wheat×maize crosses // International Journal of Plant Production. – 2009. – V. 3. – P. 77–88.

Saulescu N.N., Ittu G., Giura A. et al. Results of using Zea method for doubled haploid production in wheat breeding at NARDI Fundulea – Romania // Romanian Agriculture Research. – 2012. – V. 29. – P. 6.

Zheng M.Y. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) – doubled haploid production via induced embryogenesis // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2003. – V. 73. – P. 213–230.

BIOTECHNOLOGICAL METHODS IN THE SELECTION OF WHEAT TO RESISTANCE OF RUST DISEASES

B.B. Anapiyayev¹, K.M. Iskakova¹, Y.B. Beisenbek¹, A.T. Sarbayev², A.B. Akhmetova²

¹The Kazakh National Research Technical University after K.I. Satpaev, Institute of Chemical and Biological Technologies, Almaty, Kazakhstan, bak_anapiyayev@mail.ru

²Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Growing, Almaty, Kazakhstan

Abstract. The results of the use of haploid biotechnology based on the culture of isolated microspores in vitro in the selection of wheat (*Triticum aestivum* L.) for resistance to rust diseases were presented. By the method of haploid biotechnology, valuable doubled haploid lines of wheat from promising hybrids were created. Doubled haploid lines of wheat were tested for resistance to rust diseases. A new high-yielding wheat variety was selected from doubled haploid lines and it was zoned in the Almaty and Zhambyl regions of Southern Kazakhstan.

Keywords: haploid biotechnology, microspore culture, wheat, *Triticum aestivum* L., rust disease

ВОЗМОЖНОСТИ ЦИФРОВОЙ РЕНТГЕНОГРАФИИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЗЕРНОВКИ В ПРЕЦИЗИОННЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ И СЕМЕНОВОДСТВЕ

М.В. Архипов^{1,2}, Н.Н. Потрахов³, Ю.А. Тюкалов¹, Т.А. Данилова¹, Н.С. Прияткин², Л.П. Гусакова²

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Западный Центр междисциплинарных исследований проблем продовольственного обеспечения», Санкт-Петербург-Пушкин, Россия, szcentr@bk.ru

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Агрофизический научно-исследовательский институт», Санкт-Петербург, Россия, prini@mail.ru

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия, kzhamova@gmail.com

Аннотация. В статье рассматриваются вопросы визуализации скрытых дефектов и аномалий семян, которые необходимо учитывать при проведении прецизионных морфофизиологических исследований, а также при анализе скрытой травмированности в производственных партиях семян. Дается описание основных типов скрытых дефектов и методики их дешифрирования на основе метода цифрового рентгенанализа семян. Использование современной рентгенаппаратуры и методов автоматизированного анализа рентгенообразов зерновки позволяет проводить оцифровку рентгеновского изображения, что дает возможность автоматизировать их анализ для получения количественных характеристик выявленных скрытых дефектов семян.

Ключевые слова: *цифровая рентгенография, биологическая полноценность семян, скрытые дефекты и аномалии зерновки*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1164-1167

Вопрос о биологической неоднородности семян и причинах ее вызывающих методом контроля широко обсуждается в ботанической и агрономической литературе.

Необходимо подчеркнуть, что существующие различия между ботаническими и агрономическими семенами, связаны с тем, что первые при выращивании подвергаются экогенным воздействиям, а вторые – как экогенным, так и техногенным, обусловленным термомеханическими воздействиями на семенной материал в условиях промышленного семеноводства.

Исследования, проведенные в семеноведении и семеноводстве, показали, что гетерогенность партий агрономических семян зависит от условий выращивания, режимов уборки, сушки и послеуборочной обработки [Тарасенко и др., 2014; Якушев и др., 2015].

Существующие семенные технологии обеспечивают получение партий семян с минимальным уровнем внешних повреждений, в то же время доля семян со скрытыми дефектами остается достаточно высокой и достигает 80% [Тарасенко и др., 2014].

Для выявления скрытых микроповреждений семян требуется разработка эффективных экспресс-методов, позволяющих проводить как анализ индивидуальных семян, так и качество производственных партий семенного материала. Исследования по визуализации различных типов скрытых дефектов семян и оценке их биологической и хозяйственной значимости проводится в Агрофизическом институте с помощью метода мягколучевой микрофокусной рентгенографии [Архипова и др., 2001; Архипов и др., 2006, 2008, 2013; Гусакова, 1997; Методика анализа ..., 1995; Савин и др., 1991].

В настоящее время эти исследования как для прецизионных целей изучения структурной целостности зерновки, так и для массового анализа партий семян продолжают развиваться как на научном, так и на практическом плане представляются перспективными.

Предложенный подход позволяет:

– обеспечить быстрый анализ наличия в зерновке биологически полноценных, щуплых, поврежденных насекомыми и травмированными семенами, а также семенами с ЭМИС и поврежденными клопом - вредная черепашка - скрытых дефектов и аномалий экогенного и техногенного происхождения;

– получить цифровое изображение, отражающее наличие этих рентгенпризнаков, как у индивидуального семени, так и в анализируемой пробе.

Рентгенограммы семян, имеющих скрытые дефекты, представлены на рисунках 1-3 для семян ржи, овса, ячменя и пшеницы.

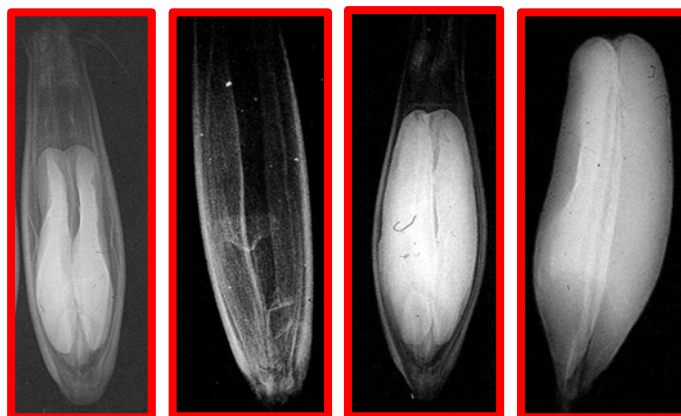


Рис. 1. Рентгенограммы с аномалиями развития зерновки.

Рентгенографический признак: нерегулярность распределения оптической плотности по площади рентгеновской проекции, как в сторону её увеличения, так и уменьшения, обусловленные бесформенным развитием эндосперма, его отсутствием или неполным развитием.

Опорные параметры для компьютерного распознавания и оценки признака: резкие оптически-плотностные отклонения от эталона, общие и локальные, квалифицирующие семя как неполноценное.



Рис. 2. Рентгенограммы семян, зараженных насекомыми.

Рентгенографический признак: каналы, выеденные насекомыми, в виде тёмных, слегка извитых, полос на светлом фоне не повреждённой ткани эндосперма. Внутри каналов иногда видны светлые проекции личинок.

Опорные параметры для компьютерного распознавания и оценки признака: потемнения, расположенные вне регулярных мест проекции, однозначно

квалифицируются программой как дефект. В случае необходимости выявления именно заражённости насекомыми в программу вводится характерный образ каналов и личинок в них.



Рис. 3. Рентгенограммы семян с показателем скрытого прорастания.

Рентгенографический признак: проекция зародыша имеет светлые участки разных показателей длины, ширины и степени потемнения.

Опорные параметры для компьютерного распознавания и оценки признака: топографическая характеристика проекции зародыша, показатели её длины ширины и яркости ее светлых участков.

Цифровое отображение рентгенообраза семени при его компьютерной обработке позволяет извлечь количественную и качественную информацию о структурной целостности зерновки и перейти от интуитивно-эмпирического анализа изображения к объективно измеренному. Особенная ценность такого подхода заключается в возможности полного отказа от рентгеновской пленки и связанного с ней фотохимического процесса, что делает метод цифровой рентгенографии экономически более эффективным, а хранение информации в цифровом виде позволит создать легкодоступные рентгеновские архивы.

Важная возможность цифровой рентгенографии - передача изображения на любые расстояния, а также получение и обсуждение результатов рентгенанализа в режиме «on-line». Методика цифровой рентгенографии и разработанные алгоритмы автоматизированной обработки скрытых дефектов в зерновке позволят получать новые знания о механизмах формирования семян, более качественно проводить прецизионные физиологические эксперименты для оценки связи рентгенообразов семени с ростовыми характеристиками при его прорастании, а также усовершенствовать принципы оценки и отбора партий наиболее биологически и хозяйственно ценного посевного материала [Макрушин и др., 2015].

В заключении следует отметить, что:

- будут получены принципиально новые результаты в теоретическом семеноведении, семеноводстве и физиологии растений о различных видах структурных нарушениях зерновки и их влияние на морфофизиологические показатели при прорастании;

- из инструментальных неразрушающих методов оценки качества зерновки наиболее эффективным является метод рентгенографии, т.к. он стандартизирован, позволяет проводить прижизненные исследования и в короткие сроки;

- использование современного оборудования позволяет проводить оцифровку рентгеновского изображения, что дает возможность автоматизировать их анализ для получения количественных характеристик выявленных скрытых дефектов;

- существующие технологии получения биологически полноценных семян требуют получения семенного материала с минимальным уровнем скрытых дефектов, что позволит повысить конкурентоспособность отечественных семян на мировом рынке.

Литература

Архипов М.В., Великанов Л.П., Желудков А.Г. и др. Возможности биофизических методов агрофизике и растениеводстве // Биотехносфера. – 2013. – № 6 (30). – С. 40–43.

Архипов М.В., Михайленко И.М., Великанов Л.П. и др. Аппаратно-программный комплекс для автоматизации интроскопической технологии экспресс-контроля запасов зерна длительного хранения. Материалы 9 Междунар. конф. Автоматизация и информационное обеспечение производственных процессов в сельском хозяйстве. – М.: 2006. – С. 12–16.

Архипов М.В., Потрахов Н.Н. Микрофокусная рентгенография растений. СПб.: Технолит, 2008. – 192 с.

Архипова М.В., Алексеева Д.И., Батыгин Н.Ф. и др. Методика рентгенографии в земледелии и растениеводстве. – М.: РАСХН, 2001. – 93 с.

Гусакова Л.П. Рентгенографический и цитофотометрический анализ жизнеспособности семян сельскохозяйственных культур: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – СПб., 1997. – 20 с.

Макрушин Н.М., Бабицкий Л.Ф., Клищенко О.А. и др. Инновационные принципы оценки и отбора биологически ценного посевного материала // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – № 3 (54). – С. 371–375.

Методика анализа семян. – М., 1995. – С. 76.

Савин В.Н., Архипов М.В., Баденко А.Л. и др. Рентгенография для выявления внутренних повреждений и их влияние на урожайные качества семян // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1981. – №10 (301). – С. 99–104.

Тарасенко А.П., Оробинский В.И., Георгиевский А.М. и др. Совершенствование механизации производства семян зерновых культур: рекомендации. – М.: ФГБНУ «Росинформагротех». – 2014. – 60 с.

Якушев В.П., Михайленко И.М., Драгавцев В.А. Агротехнологические и селекционные резервы повышения урожая зерновых культур в России // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50, № 5. – С. 550–560.

DIGITAL RADIOGRAPHY FOR QUALITY CONTROL OF THE WEEVIL IN THE PRECISION OF PHYSIOLOGICAL EXPERIMENTS AND SEED PRODUCTION

M.V. Arkhipov^{1,2}, N.N. Potrakhov³, Yu.A. Tyukalov¹, T.A. Danilova¹, N.S. Pritkin², L.P. Gusakova²

¹Federal state scientific institution “North-western centre for interdisciplinary studies of the problems of food security”, St. Petersburg-Pushkin, Russia, *szcentr@bk.ru*

²Federal state budgetary institution “Agrophysical scientific research Institute”, Saint-Petersburg, Russia, *prini@mail.ru*

³Sain-Petersburg Electrotechnical University, St. Petersburg, Russia, *kzhamova@gmail.com*

Abstract. The article deals with the issues of visualization of hidden defects and anomalies of seeds, which must be taken into account when conducting precision morphological and physiological studies, as well as in the analysis of hidden injury in the production batches of seeds. The description of the main types of latent defects and methods of their decoding based on the method of digital x-ray analysis of seeds is given. The use of modern x-ray equipment and methods of automated analysis of x-ray images of the seed allows digitizing x-ray images, which makes it possible to automate their analysis to obtain quantitative characteristics of the detected hidden defects of the seeds.

Keywords: *digital radiography, biological value of seeds, hidden defects and anomalies of the seed*

БЕЗОТХОДНАЯ ПЕРЕРАБОТКА БИОМАССЫ СИБИРСКОЙ ЛИСТВЕННИЦЫ – ОСНОВНОЙ ЛЕСООБРАЗУЮЩЕЙ ПОРОДЫ БУРЯТИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЙ

В.А. Бабкин, Л.А. Остроухова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, babkin@irioch.irk.ru

Аннотация. Описан новый подход к технологии комплексной переработки биомассы хвойных пород деревьев на примере лиственницы сибирской. Приведены данные по биологической активности основных продуктов на базе экстрактивных веществ биомассы лиственницы. Описаны возможности их практического применения в медицине и сельском хозяйстве.

Ключевые слова: лиственница сибирская, экстрактивные вещества, флавоноиды, полисахариды

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1168-1171

Бурятия расположена на стыке таежных районов Сибири и пустынь Центральной Азии, что приводит к формированию специфичных природных экосистем. По совокупности всех экологических условий Бурятия весьма своеобразна.

Практически вся территории Бурятии покрыта лесами, большая часть которых состоит из хвойных пород деревьев. Лиственные породы занимают только 15% от общего запаса древесины. Бурятия покрыта лесом на 63,3%.

Леса защищают почвы от сухости и эрозии, регулируют водный сток.

Естественная растительность Бурятии соответствует местным климатическим условиям. В составе древесной флоры свыше 140 видов деревьев и кустарников. Горы в юго-западной части страны покрыты лесами из лиственницы, сосны, кедра, различных листопадных пород деревьев.

Деревообрабатывающая и лесная промышленность вносят свой существенный вклад в развитие Республики. Большую часть леса заготавливают на восточном берегу озера Байкал в бассейне реки Уда. Из Бурятии вывозится много необработанной древесины в Казахстан, Кузбасс и Среднюю Азию. На территории Республики функционирует Селенгинский целлюлозно-картонный комбинат. Широко производятся пиломатериалы.

Из древесных пород более 70% общих запасов приходится на лиственницу сибирских видов (*Larix sibirica* Ledeb. и *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) и 12% на долю кедра, реже встречаются ель и пихта. Сосновые леса сосредоточены в основном около Селенги.

Естественная регенерация бурятских лесов является медленной, и леса часто гибнут от огня, насекомых и хозяйственной деятельности человека. Древесину лиственницы в основном используют как источник топлива, также как сосну, березу. На севере республики деревья вырубают на нужды строительства.

Углубляющийся кризис органического сырья способствует привлечению внимания исследователей к использованию возобновляемых растительных ресурсов, к их глубокой переработке с целью получения максимального выхода полезных продуктов. Древесина является наиболее распространенным и непрерывно возобновляемым продуктом биосферы. Современные тенденции переработки древесины свидетельствуют о переходе в недалеком будущем на ее использование в качестве основного органического сырья для химической промышленности, включая

производство полимеров, новых композиционных материалов, медицинских и ветеринарных препаратов и стимуляторов роста растений.

Все более остро встающая проблема полного и рационального использования всей лесной биомассы ставит насущную задачу вовлечения в переработку сырьевых ресурсов, которые до настоящего времени относятся к древесным отходам.

Экономическое значение хвойных лесов должно определяться, в первую очередь, широким использованием древесины и коры, представляющих по ряду физических и химических свойств ценнейшие объекты для переработки.

Комплексная переработка лиственницы является одним из направлений био-рефайнинга древесины - глубокой переработки древесины с превращением ее основных компонентов в товарные продукты с высокой добавленной стоимостью.

Необходимо отметить, что на сегодняшний день огромный потенциал глубокой химической переработки биомассы лиственницы не исчерпан и способен дать в будущем новые инновационные медицинские и ветеринарные препараты, стимуляторы роста растений, биологически активные добавки к пище и новые композиционные материалы.

Из 8 видов рода *Larix*, произрастающих на территории РФ, с точки зрения уникального химического состава экстрактивных веществ, их количественного соотношения внутри отдельных классов соединений, наибольший интерес представляют лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.) и лиственница Гмелина (*L. gmelinii* (Rupr.) Rupr.), произрастающие в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке.

Химический состав экстрактивных веществ этих видов лиственниц представлен низкомолекулярными продуктами вторичного метаболизма древесины, такими как терпеноиды, флавоноиды, фенолокислоты, лигнаны и полимерные соединения (арабиногалактан) [Бабкин и др., 2011].

Феноменом лиственниц сибирской и Гмелина является химический состав флавоноидов в экстрактивных метаболитах ядровой древесины. Флавоноидная составляющая представлена на 80-85% дигидрокверцетином - соединением с чрезвычайно высокой антиоксидантной и капилляропротекторной активностью. Это обстоятельство позволяет рассматривать древесину лиственниц сибирских пород как безальтернативный источник возобновляемого сырья для промышленного производства высокоэффективных антиоксидантов для медицины и пищевой промышленности. Еще одним замечательным свойством лиственниц сибирской и Гмелина является то, что их древесина имеет повышенное содержание гемицеллюлозы - арабиногалактана, достигающее до 15-25% от веса древесины. Это обстоятельство также позволяет организовать экономически эффективный и экологически чистый промышленный способ производства пищевых волокон, комплексных медицинских препаратов, носителей лекарственных средств, ветеринарных препаратов и функциональной пищи на основе этого легкоутилизируемого в живом организме биополимера [Бабкин и др., 2007].

Выделение из биомассы лиственницы в чистом виде новых природных соединений, установление их химической структуры - это фундаментальная задача химии древесины.

Определение функции выделенных веществ в живом дереве, установление путей их биосинтеза, их биологической активности дает возможность не только глубже понять процессы, происходящие в живой природе, но и предложить направление и способы практического применения экстрактивных веществ лиственницы, оценить экономическую целесообразность их использования.

Учитывая особенности произрастания лиственницы в Бурятии необходимо, прежде всего, исследовать состав и распределение экстрактивных веществ в коре и

ядровой древесине представленного в этом районе вида лиственницы, что позволит определить пути их практического использования.

В Иркутском институте химии им. А.Е.Фаворского совместно с ООО ИНПФ "Химия древесины" (г. Иркутск) на основе экстрактивных веществ древесины лиственницы разработаны и зарегистрированы в Роспотребнадзоре следующие биологически активные продукты:

Дигидрокверцетин (ДКВ) – натуральный природный биофлавоноидный препарат, получаемый из древесины лиственницы сибирской. Состав действующего вещества - более 98 % оптически активного транс-изомера дигидрокверцетина, обладающего наибольшей биологической активностью. Относится к группе витаминов и ангиопротекторных веществ. Мощное средство для улучшения состояния сердечно-сосудистой системы, активный стимулятор мозгового кровообращения.

Дигидрокверцетин обладает антиоксидантными свойствами, капилляропротекторной и противоотечной активностью. ДКВ активизирует процессы регенерации слизистой желудка, оказывает гепатопротекторное (антитоксическое) действие, обладает радиопротекторной активностью, инактивирует процессы свободно-радикального окисления липидов. Антиоксидант, по активности и стабильности превосходит токоферол и бета-каротин. Эффективный капилляропротектор, гастро- и гепатопротектор, ДКВ также характеризуется высокой противовирусной активностью. Малотоксичен (IV класс опасности), ДКВ не обладает мутагенным, эмбриотоксическим и тератогенным свойствами, не проявляет аллергизирующего действия.

Еще одним продуктом, выделенным из древесины лиственницы, является Арабиногалактан (АГ) - природный полисахарид, биологически активное вещество, способное повышать защитные функции организма, характеризуется свойствами пребиотического растворимого пищевого волокна. Арабиногалактан – это новый для России препарат. Широко известен в США [Медведева и др., 2003]. Созданная в нашей лаборатории на его основе БАД, предназначена для применения в пищевой промышленности для обогащения пищевых продуктов, при производстве биологически активных добавок к пище.

Сотрудниками лаборатории Химии древесины разработана новая биологически активная добавка к пище Ардиксин, которая представляет собой нанобиокомпозит, содержащий не более 95,0% природного полисахарида арабиногалактана и не менее 5 % биофлавоноида дигидрокверцетина.

Ардиксин – нанобиокомпозит, полученный механохимическим способом. Оригинальная технология получения Ардиксина позволила создать препарат без использования органических растворителей и добавки наполнителей. Проведено изучение его биологической активности, которое показало эффективность препарата при лечении онкологических больных в качестве сопутствующего средства при проведении лучевой и химиотерапии. Ардиксин способствует уменьшению токсичности лечения, профилактике гематологических осложнений и улучшению качества жизни пациентов [Остроухова и др., 2015].

Основные результаты получены с использованием оборудования Байкальского центра коллективного пользования СО РАН.

Литература

Бабкин В.А., Иванова С.З., Федорова Т.Е. и др. Научные основы технологии комплексной переработки биомассы лиственницы // Химия растительного сырья. – 2007. – № 3. – С. 9–21.

Бабкин В.А., Остроухова Л.А. Трофимова Н.Н. Биомасса лиственницы: от химического состава до инновационных продуктов // Изд-во СО РАН, Новосибирск, 2011. – 235 с

Медведева Л.А. Остроухова В.А. Бабкин Е.Н. Арабиногалактан лиственницы – свойства и перспективы использования // Химия растительного сырья. – 2003. – № 1. – С. 27–37.

Остроухова Л.А., Левчук А.А., Онучина Н.А., Бабкин В.А. Разработка биокомпозита Ардиксин на основе экстрактивных веществ лиственницы // Сборник «Актуальные проблемы науки Прибайкалья». – 2015. – Выпуск 1. – С. 155–159.

WASTE-FREE PROCESSING OF BIOMASS OF SIBERIAN LARCH IS THE MAIN TREE SPECIES IN BURYATIA REPUBLIC AND ADJACENT TERRITORIES

V.A. Babkin, L.A. Ostroukhova

A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *babkin@irioch.irk.ru*

Abstract. The contribution of non-waste biomass of Siberian larch, the main tree species Buryatia, ecological and economic development in Buryatia and adjacent territory. New approach to the technology of complex larch biomass processing, completely eliminating any production waste is described. The properties of all of the obtained products and field of their application are characterized. The new data on the biological activity of the main products is cited.

Keywords: *larch wood, extraction, flavonoids, polysaccharides*

МИКРОЧЕРЕНКОВАНИЕ ВИНОГРАДА *IN VITRO*

М.С. Батукаев^{1,2}, Д.О. Палаева², А.А. Батукаев^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Чеченский научно-исследовательский институт сельского хозяйства», Грозный, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Чеченский государственный университет», Грозный, Россия, batukaevmalik@mail.ru

Аннотация. Материалы исследований могут быть использованы в виноградарстве для ускоренного размножения оздоровленных от вирусной инфекции перспективных сортов винограда путем снижения затрат на дорогостоящие препараты. Введение в состав питательных сред кроме минеральных солей жидкого концентрированного органоминерального препарата Гумат+7В оказало существенное значение для роста и развития экспланта в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: виноград, *in vitro*, питательная среда, гумат, эксплант

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1172-1175

Введение. Во многих странах мира большое значение в настоящее время придается внедрению в производство интенсивных методов производства высококачественного, оздоровленного от патогенных микроорганизмов и вирусов посадочного материала винограда и разработке новых высокоэффективных способов закладки виноградников [Батукаев, 1998; Батукаев и др., 2014].

Известен способ размножения винограда, при котором проводят вычленение меристематических эксплантов, их высадку и культивирование [Дорошенко и др., 1998].

Однако в известном техническом решении для стимуляции микроэксплантов используют электромагнитное СВЧ-поле в комплексе с узкополосным лазерным лучом, что усложняет способ, повышает затраты.

Известен также способ микроклонального размножения, включающий расчленение пробирочных растений на питательной среде Мурасиге-Скуга с одновременным использованием биопрепаратов [Дорошенко, Соколова, 2005].

Однако экспланты для своего развития требуют дополнительного введения и других элементов для своего развития, что снижает эффективность способа и повышает затраты.

Наиболее близким техническим решением является способ, при котором проводят микроразмножение *in vitro* путем микрочеренкования пробирочных растений и высадку их на жидкую питательную среду с добавлением макроэлементов, витаминов и биопрепаратов [Ребров и др., 2016].

Результаты исследований. Технология черенкования пробирочных растений обычная. Наблюдения за растениями проводились в течение 41 дня, ежедневно, отмечая дату появления корней и листьев. Измерения высоты растений, подсчет листьев и основных корней провели через 41 день после черенкования.

Во всех вариантах начало образования корней отмечено на 8-й день после черенкования. На 13 день после черенкования укоренились все растения. Отмечено, что рост корней в варианте 5 существенно увеличился и по количеству корней, которые превосходили контроль. Образование листьев в варианте 5 началось на десятый день после черенкования, а на 13 день образование листьев началось на всех вариантах опыта. Дальнейшие наблюдения за ростом и развитием растений, показали, что экспланты в вариантах 2 и 3 на бедных питательных средах, хотя и показали вначале

неплохие результаты по укоренению, намного отставали в росте и развитии по сравнению с вариантами 1, 4, 5 (таблица).

Существенные различия по количеству корней, листьев и по высоте растения наблюдаются в вариантах 4 и 5. У эксплантов, помещенных на эти среды, проходил более интенсивный рост растения в высоту и образование корней, по сравнению с контрольным вариантом (таблица).

Лучшие результаты по росту и развитию растений показал вариант 5 на питательной среде № 4. Введение в состав питательных сред кроме минеральных солей, жидкого концентрированного органоминерального препарата Гумат+7В оказало существенное значение для роста и развития экспланта в условиях *in vitro*.

Данные результаты сведены в таблицу, из которой следует, что питательная среда № 4 наиболее оптимальная, обеспечивает за сравнительно короткий период увеличение количества основных корней, листьев и высоту растений.

В питательных средах № 4 и № 5 (таблица) значительно снижается количество агар-агара, сахарозы, солей натрия, магния, калия и кальция, мезоинозита, сернокислой меди и хлористого никеля, никотиновой кислоты, пиридоксина, тиамина, сернокислого железа, трилона Б, активированного угля за счет значительного сокращения этих элементов в питательной среде и добавлением Гумата+7В в количестве 5-10 мл/л.

Следовательно, в предлагаемом способе снижаются затраты на питательную среду и повышается его эффективность.

Выводы. Существенные различия по количеству корней, листьев и по высоте растения наблюдаются в вариантах 4 и 5. У эксплантов, помещенных на эти среды, проходил более интенсивный рост растения в высоту и образование корней по сравнению с контрольным вариантом.

Лучшие результаты по росту и развитию растений показал вариант 5 на питательной среде № 4. Введение в состав питательных сред кроме минеральных солей жидкого концентрированного органоминерального препарата Гумат+7В оказало существенное значение для роста и развития экспланта в условиях *in vitro*.

Литература

Батукаев А.А. Совершенствование технологии ускоренного размножения и оздоровления посадочного материала винограда методом *in vitro*. – М.: Изд-во МСХА, 1998. – 222 с.

Батукаев А.А., Магомадов А.С., Малых Г.П., Батукаев М.С. Совершенствование технологии выращивания саженцев винограда и повышение продуктивности виноградных насаждений // «Вестник» Чеченского государственного университета. – 2014. – № 1. – С. 223–227.

Дорошенко Н.П., Лузгин Г.В., Карлов А.Ф. Разведение растений из тканевых культур. – Патент № 2120739 от 27.10.1998 г. МПК А01Н4/00.

Дорошенко Н.П., Соколова Г.В. Разведение растений из тканевых культур. – Патент № 2265319 от 10.12.2005 г. МПК А01Н4/00

Ребров А.Н., Дорошенко Н.П., Трошин Л.П., Алзубайди Х. Введение в культуру *in vitro* новых перспективных столовых сортов винограда // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2016. – № 124. – С. 168–180.

Таблица.

Влияние различных питательных сред на рост и развитие растений винограда при микроочерковании (метод *in vitro*) (через 41 сутки после черенкования)

Варианты	Кол-во основных корней, шт						Кол-во листьев, шт						Высота растений, см					
	Повторности			Всего	Среднее на 1 растение	Повторности			Всего	Среднее на 1 растение	Повторности			Всего	Среднее на 1 растение			
	1	2	3			1	2	3			1	2	3					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Вариант-контроль, модифицированная среда МС	1,7	1,5	2,3	5,5	1,8	6,17	5,50	5,83	17,5	5,8	7,0	5,3	6,3	18,6	6,2			
Питательная среда №1	2,0	1,5	1,8	5,3	1,8	3,17	3,33	1,00	7,5	2,5	2,2		1,2	6,4	2,1			
Питательная среда №2	1,7	1,3	1,0	4,0	1,3	0,5	1,00	1,17	2,7	0,9	0,5	0,8	0,7	2,0	0,7			
Питательная среда №3	1,7	1,8	1,8	5,3	1,8	6,33	5,50	6,33	18,2	6,1	7,0	6,5	7,3	20,8	6,9			
Питательная среда №4	1,8	2,0	2,2	6,0	2,0	6,33	6,50	5,83	18,7	6,2	7,3	7,7	7,8	22,8	7,6			
	НСР-1,25						НСР-2,14						НСР-2,39					

MICROPROPAGATION OF GRAPES *IN VITRO*

M.S. Batukaev^{1,2}, D.O. Palaeva², A.A. Batukaev^{1,2}

¹Chechen research Institute of agricultural, Grozny, Russia

²The Chechen State University, Grozny, Russia, batukaevmalik@mail.ru

Abstract. Research materials can be used in viticulture for the accelerated reproduction of promising varieties of grapes from viral infection by reducing the cost of expensive drugs. The introduction of nutrient media in addition to mineral salts, the liquid concentrated organomineral drug Humat+7B, was essential for the growth and development of the explant in vitro conditions.

Keywords: *grapes, in vitro, nutrient medium, humate, explant*

ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРИ РАЗМНОЖЕНИИ НОВЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА *IN VITRO*

М.С. Батукаев^{1,2}, М.Г. Шишхаева², А.А. Батукаев^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Чеченский государственный университет», Грозный, Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Чеченский научно-исследовательский институт сельского хозяйства», Грозный, Россия, batukaevmalik@mail.ru

Аннотация. Основная цель исследований заключалась в совершенствовании технологий клонального микроразмножения с использованием регуляторов роста. В эксперимент были включены следующие сорта: Августин, Молдова, Восторг, Мускат итальянский, Ранний Магарача, Подарок Магарача, Виорика. В качестве регуляторов роста в питательную среду добавляли ауксины и цитокинины в различных концентрациях и сочетаниях. Проведенные эксперименты показали, что регенерация побегов из изолированных апексов происходила при всех концентрациях 6-БАП, кроме добавки препарата в количестве 5,0 мг/л, когда верхушки сразу начинали чернеть и гибли. Эффективное влияние 6-БАП оказал в диапазоне концентрации 0,5...1,0 мг/л. Тем не менее, следует отметить наибольший прирост микропобегов, который был зафиксирован в варианте с концентрацией 1,0 мг/л. Для ускорения процесса удлинения микропобегов параллельно проводили изучение действия гибберелловой кислоты в различных концентрациях в сочетании 6-БАП. Как показал опыт, при сочетании 0,5 мг/л 6-БАП+1,0 мг/л ГК был достигнут наилучший результат.

Ключевые слова: виноград, сорта, питательная среда, регуляторы роста, *in vitro*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1176-1179

Введение. Современное виноградарство России должно базироваться на производстве сертифицированного посадочного материала. Производство посадочного материала высших категорий в РФ отсутствует [Батукаев, 1988].

Современная технология производства оздоровленного посадочного материала в качестве составной части включает биотехнологические приемы, комплексное оздоровление с использованием культуры изолированных апексов, ускоренное размножение оздоровленных экземпляров на искусственных питательных средах и создание коллекций оздоровленных форм *in vitro* [Бургутин и др., 1983; Высоцкий, 2011]. Наиболее иллюстративным примером реализации потенциала растений (или их отдельных тканей и органов) с помощью биотехнологических приемов может стать клональное микроразмножение, при котором реальные коэффициенты размножения в сотни и даже тысячи раз выше, чем при любом из традиционных приемов [Батукаев, 1988; Дорошенко, 1997].

Результаты исследований. Одним из важнейших и неотъемлемых компонентов питательной среды являются регуляторы роста [Garre et al., 1979; Гамбург и др., 1990; Кулаева, 1973]. Их тщательный подбор и выявление оптимальных концентраций позволяют повысить эффективность метода клонального микроразмножения винограда.

Проведенные эксперименты показали, что регенерация побегов из изолированных апексов происходила при всех концентрациях 6-БАП, кроме добавки препарата в количестве 5,0 мг/л, когда верхушки сразу начинали чернеть и гибли. Микропобеги, выращиваемые на среде с концентрацией 0,1 мг/л 6-БАП, развивались очень медленно. Вероятно, это связано с тем, что такие низкие концентрации препарата слабо стимулируют процессы органогенеза растений.

Эффективное влияние 6-БАП оказал в диапазоне концентрации 0,5...1,0 мг/л. Тем не менее, следует отметить наибольший прирост микропобегов, который был зафиксирован в варианте с концентрацией 1,0 мг/л. Минимальная длина микропобега наблюдалась в вариантах с концентрациями 0,1, а при концентрации 5,0 мг/л вообще подавлялось развитие побега. Это свидетельствует о том, что низкая концентрация недостаточна для роста и развития микропобега, а во втором случае, наоборот, – высокая концентрация препарата ингибирует развитие микропобегов.

Для ускорения процесса удлинения микропобегов параллельно проводили изучение действия гибберелловой кислоты в различных концентрациях в сочетании 6-БАП. Как показал опыт, при сочетании 0,5 мг/л 6-БАП + 1,0 мг/л ГК был достигнут наилучший результат. Такое сочетание препаратов ускоряло вытягивание стеблей у растений, и через две недели размер побегов достигал 25...26 мм. В других сочетаниях побеги намного уступали побегам, выращенным на среде с 6-БАП в концентрации 0,1 мг/л. Таким образом, проведенные нами эксперименты показали эффективное действие ГК (1,0 мг/л) и пониженной концентрации 6-БАП (0,5 мг/л) для удлинения побегов перед этапом укоренения.

Как известно, для стимуляции корнеобразования применяют ауксины. Учитывая это, нами был изучен характер действия регулятора роста ауксиновой природы с целью установления оптимальной концентрации использования препарата.

Вначале были испытаны на укоренение побегов *in vitro* различные концентрации ИМК. Через 15 дней после применения наибольшее число корней образовалось в варианте опыта при концентрации ИМК 2,0 мг/л. В дальнейшем корнеобразование продолжалось, и через 30 дней количество корней увеличилось. Параллельно начался интенсивный рост растений, удлинялись черешки листьев, разрасталась листовая пластинка, вытягивался стебель.

Спустя месяц число укоренившихся побегов ни при одной концентрации ИМК не увеличилось, продолжался только рост центральных и частично боковых корней.

Следует отметить, что к 30-му дню у многих растений при концентрации ИМК 5,0 мг/л наблюдалось почернение корней.

В последующем, с целью увеличения коэффициента размножения исследовали два варианта комбинаций регуляторов роста – 6-БАП с 2-іР и 6-БАП с кинетином. Контролем служила модифицированная среда Мурасиге-Скуга, дополненная 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и 1,0 мг/л. На экспериментальные среды высаживали одноглазковые микрочеренки винограда сортов Августин и Надежда АЗОС. Длительность культивирования составляла 4 недели, после чего определяли коэффициент размножения и среднюю длину побегов.

Присутствие 2іР в питательной среде оказывало отрицательное действие на образование дополнительных побегов у эксплантов винограда, снижая как коэффициент размножения, так и среднюю длину побегов. Так, при одинаковой концентрации 6-БАП, равной 0,5 мг/л, коэффициент размножения у эксплантов сорта Августин снизился от 2,5 до 1,9; у эксплантов сорта Надежда АЗОС - от 2,7 до 1,9. Еще в большей степени снижение коэффициента размножения наблюдали в вариантах с использованием комбинации 2-іР с 6-БАП в концентрации 1,0 мг/л.

Присутствие кинетина в питательной среде в комбинации с 6-БАП положительно влияло на развитие эксплантов. Так, на фоне концентрации 6-БАП 0,5 мг/л присутствие кинетина (0,5 мг/л) обеспечило максимальный коэффициент размножения для обоих сортов винограда 2,9 и некотором уменьшении средней длины побегов. В вариантах с концентрацией 6-БАП 1,0 мг/л присутствие кинетина не уменьшало коэффициент размножения побегов сорта Августин, по сравнению с вариантом без кинетина. При культивировании эксплантов сорта Надежда АЗОС отмечено некоторое уменьшение

коэффициента размножения на 11% (кинетин 0,25 мг/л) и 20% (кинетин 0,5 мг/л). Таким образом, для этапа микроразмножения винограда сортов Августин и Надежда АЗОС целесообразно совместное использование 6-БАП и кинетина в концентрации 0,5 мг/л каждого, что обеспечивает максимальный коэффициент размножения.

Выводы. Проведенные исследования показали возможность успешного размножения испытуемых сортов винограда методом культуры изолированных тканей и органов *in vitro*, что объясняется высокой потенциальной способностью винограда к вегетативному размножению вообще и к микроклональному, в частности.

Приживаемость апикальных меристем, из которых вырастает растение *in vitro* (10-12 см), дает возможность дальнейшего их культивирования и размножения (путем повторного черенкования), при котором возможно получение оздоровленного посадочного материала.

Из испытанных регуляторов роста наиболее результативно проходила регенерация побегов при концентрации 6-БАП 0,5...1,0 мг/л. При массовом размножении побегов оптимальной оказалась концентрация 6-БАП 2 мг/л.

Действие ГК в концентрации 1,0 мг/л в сочетании с 6-БАП 0,5 мг/л, ускоряло вытягивание стеблей у микрорастений *in vitro*.

Присутствие кинетина в питательной среде в комбинации с 6-БАП положительно влияло на развитие эксплантов. Так, на фоне концентрации 6-БАП 0,5 мг/л присутствие кинетина (0,5 мг/л) обеспечило максимальный коэффициент размножения для испытываемых сортов винограда.

Литература

Батукаев А.А. Совершенствование технологии ускоренного размножения и оздоровления посадочного материала винограда методом *in vitro*. – М.: изд-во МСХА, 1988. – 221 с.

Бургутин А.Б., Бутенко Р.Г., Катаева Н.В., Голодрига П.Я. Быстрое клональное размножение виноградного растения // С.-х. биология. – 1983. – № 7. – С. 48–50.

Высоцкий В.А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве // Сборник научных работ ВСТИСиП РАСХН – Т. XXVI. – Москва, 2011. – С. 3–10.

Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах тканей и клеток растений. – Новосибирск: Наука, 1990. – 243 с.

Дорошенко Н.П. Повышение регенерационной способности меристем при получении безвирусного материала винограда // Виноград и вино России. – 1997. – № 2. – С. 6–9.

Кулаева О.Н. Цитокинины, их структура и функции. – М.: Наука, 1973. – 264 с.

Garre M., Martin-Tanguy J., Mussillon P. La cultur de meristemes et la multilpication Végetative *in vitro* au service de la pepiniere // Bulletin Petits Fruit. – 1979. – No. 14. – P. 7–65.

OPTIMIZATION OF THE NUTRIENT MEDIUM WHILE BINDING NEW VARIETY GRAPES *IN VITRO*

M.S. Batukaev^{1,2}, M.G. Shishkhaeva², A.A. Batukaev^{1,2}

¹The Chechen State University, Grozny, Russia, batukaevmalik@mail.ru

²Chechen research Institute of agricultural, Grozny, Russia

Abstract. The main objective aim of study was to improve the technology of clonal micropropagation using growth regulators. There were included in experiment the following varieties: Augustine, Moldova, Vostorg, Muscat Italian, Early Magaracha, Gift of Magaracha, Viorica. Auxins and cytokinins in various concentrations and combinations were added into the culture medium as growth regulators. The conducted experiments showed the shoots regeneration of isolated apices occurred at all concentrations of 6-BAP except additive formulation in an amount of 5.0 mg/l when the tops immediately began to blacken and died. Effective influence of 6-BAP concentrations was in the range of 0.5...1.0 mg/l. Nevertheless, the greatest increase of microshoots fixed in the embodiment with a concentration of 1.0 mg/l should be noted. To speed up the process of microshoots lengthening, the study of the gibberellic acid effect in different concentrations combined with 6-BAP was simultaneously conducted. The experience has shown that the combination of 0.5 mg/l 6-BAP+1.0 mg/l (GA) achieved the best result.

Keywords: *grape, varieties, culture media, growth regulators, in vitro*

СПОСОБНОСТЬ ЭТИЛАЦЕТАТНЫХ ФРАКЦИЙ ДРЕВЕСИНЫ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ ПОДАВЛЯТЬ РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

Л.А. Беловежец, А.А. Левчук, Н.А. Онучина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, levchuk@irioch.irk.ru

Аннотация. Проведено исследование антимикробной активности этилацетатных фракций различных частей лиственницы сибирской, а именно древесины и коры ствола и древесины корней. Установлено, что экстракты коры и древесины ствола проявляют антибактериальную активность по отношению к модельному грамположительному микроорганизму *Enterococcus durans*.

Ключевые слова: экстракция, лиственница сибирская, антимикробная активность, *Enterococcus durans*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1180-1182

В настоящее время при переработке древесины лиственницы полезно используется не более половины ее биомассы, а такие части, как кора, зелень, шишки полностью являются отходом производства. В то же время, все эти отходы представляют большой интерес с точки зрения получения биологически активных веществ. Особенно это касается сложных химических веществ антагонистического действия – антибиотиков. Так как более чем полувековое использование антибиотиков привело к возникновению устойчивых штаммов, что усугубилось бесконтрольным и зачастую необоснованным применением антибиотических веществ, непрерывно ведется поиск новых химических соединений, способных оказывать бактериостатическое или бактерицидное действие.

Известно, что эфирные масла хвойных растений оказывают противовоспалительное и бактерицидное действие, применяются при лечении ран и гнойных поражениях кожи. Также антибактериальную активность проявляют и другие части дерева, такие как кора и шишки [Кротова и др., 2017; Гуляев, 2016]. Недостаточно изученными с точки зрения биологической активности остаются соединения, полученные из корней деревьев.

Целью нашей работы было проведение фракционирования образцов различных частей лиственницы и исследование их антимикробной активности относительно микроорганизмов различных таксономических групп.

Пробы образцов были отобраны в районе озера Байкал в октябре 2015 г. Отбор проб древесины и коры проводили с четырех деревьев, имеющих диаметр ствола не менее 20 см. Кору и древесину (ядровую, без луба и заболони) отбирали на высоте 1 м от земли в количестве 100-150 г. Пробы корней отбирали с боковых корней на расстоянии 20 см от стержневого корня. Идентификацию до вида проводили в Иркутском институте физиологии растений СО РАН.

Экстракцию исходного сырья проводили этилацетатом в колбе с обратным холодильником при температуре кипения растворителя (75-78 °С). Гидромуль 1:10, время экстракции 4 часа. Высушенный экстракт обрабатывали гексаном (1:10) настаиванием без нагрева в течение суток. Обработку проводили дважды. Количественный выход отдельных фракций представлен в табл. 1.

Дальнейшим этапом работы стало изучение антимикробной активности этилацетатных фракций относительно микроорганизмов различных таксономических групп: *Enterococcus durans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Penicillium citreo-viride* диск-диффузионным методом на соответствующих твердых питательных средах.

Таблица 1.

Выход отдельных фракций экстрактивных веществ из древесины, корней и коры лиственницы сибирской

Объект исследования	Выход этилацетатного экстракта, % от а.с.д.	Выход гексанового экстракта, % от а.с.д.
Древесина	2,57	0,83
Корни	2,54	1,27
Кора	8,65	0,69

Образцы исследовались в концентрациях 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06 мг/мл 5% спиртового раствора. Также были исследованы арабиногалактан, дигидрокверцетин и дигидрокверцетин-сырец, представляющий собой смесь, содержащую 70-75% дигидрокверцетина, родственные минорные флавоноиды и смолистые вещества.

Результаты по подавлению роста *Enterococcus durans* представлены в табл. 2.

Таблица 2.

Антимикробная активность в отношении *Enterococcus durans*

№ образца	Концентрация действующего вещества, %					
	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06
Экстракт древесины ствола	-	-	-	-	±	±
Экстракт древесины корней	+	+	+	+	+	+
Экстракт коры ствола	-	-	-	±	±	+
Дигидрокверцетин	+	+	+	+	+	+
Арабиногалактан	-	-	-	±	+	+
Дигидрокверцетин-сырец	-	-	-	-	±	+

Показано, что экстракты древесины и коры ствола, арабиногалактан и дигидрокверцетин-сырец проявляют антибактериальную активность по отношению к тестовому грамположительному микроорганизму *Enterococcus durans*. Минимальная ингибирующая концентрация для этих образцов составляет 0.25 и 0.5%.

Интересно, что более чистая фракция дигидрокверцетина такой активности не проявила. Возможно, это связано с наличием минорных композиций в дигидрокверцетине-сырце или синергическим эффектом различных компонентов, которые отсутствуют в чистом дигидрокверцетине. Тем не менее, в ходе исследования антибактериальной активности в отношении к *Bacillus subtilis*, чистый дигидрокверцетин проявил активность в концентрациях 1 и 2%, тогда как остальные исследованные вещества не обладали даже минимальной бактериостатической активностью по отношению к данному микроорганизму.

В отношении *Escherichia coli* и *Penicillium citreo-viride* исследуемые фракции показали полное отсутствие задержки роста во всех исследуемых концентрациях.

Таким образом, изученные нами экстракты могут быть интересны с точки зрения использования их в качестве антимикробных агентов.

Основные результаты получены с использованием оборудования Байкальского аналитического центра коллективного пользования СО РАН.

Литература

Кротова И.В., Гродницкая И.Д., Кузина А.Н. и др. Исследование антибактериальной активности водных экстрактов коры лиственницы сибирской/ Вестник КрасГАУ. – 2017. – № 5. – С. 163–169.

Гуляев Д.К. Фармакогностическое исследование ели обыкновенной, произрастающей в Пермском крае. Диссертация канд. фармацевтических наук, 2016 г.

THE ABILITY ETHYL ACETATE FRACTION SIBERIAN LARCH WOOD INHIBITS THE GROWTH OF MICROORGANISMS

L.A. Belovezhets, A.A. Levchuk, N.A. Onuchina

A.E. Favorsky Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

Abstract. The antimicrobial activity of ethyl acetate fractions of various parts of Siberian larch, namely wood trunk bark and root wood, has been carried out. It is found that the extracts of bark and wood trunk exhibit antibacterial activity against modeling gram-positive microorganism *Enterococcus durans*.

Keywords: *extraction, Siberian larch, antimicrobial activity, Enterococcus durans*

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ БЕЛКОВ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ С ПОМОЩЬЮ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ, НА ПРИМЕРЕ АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ $\Delta 9$ -ДЕСАТУРАЗЫ

М.А. Берестовой^{1,2}, О.С. Павленко², А.А. Тюрин², Р.А. Сидоров², И.В. Голденкова-Павлова²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия, m.berestovoy1181@gmail.com

Аннотация. Нами проведено исследование локализации и функциональной роли целевого белка в растительной клетке с использованием унифицированных векторов для транзientной экспрессии, несущих последовательности гена $\Delta 9$ -десатуразы и лидерные последовательности для локализации белкового продукта гена в цитоплазме, хлоропластах и ЭР. Исследование включает тонкую визуализацию целевого белка в компартментах клеток и оценку изменения в составе и массовой доле жирных кислот в зависимости от локализации.

Ключевые слова: транзientная экспрессия, протопласты, агроинфильтрация, $\Delta 9$ -десатураза, субклеточная локализация.

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1183-1186

Клеточная локализация белков у всех живых организмов тесно взаимосвязана с их функциями. Получение экспериментальных данных о взаимосвязи локализации белка и его функциональной эффективности, может оказать неоценимую помощь в понимании регуляции ключевых биологических процессов на клеточном уровне. На сегодняшний день имеется недостаточно данных том, как локализация $\Delta 9$ -десатуразы в различных компартментах растительной клетки взаимосвязана с ее функциональной эффективностью, а именно, с процессом модуляции ненасыщенности жирных кислот (ЖК) мембранных липидов растений.

В данной работе нами проведен анализ локализации целевого белка в растительной клетке при использовании разных сигнальных последовательностей с последующим исследованием его функциональной роли. Для транзientной экспрессии в растениях табака *N. benthamiana* нами использовался гибридный ген *desC-egfp*, включающий последовательность *desC* гена, кодирующего $\Delta 9$ -десатуразу цианобактерий, и последовательность гена *egfp*, белковым продуктом которого является зеленый флуоресцентный белок. В растительные экспрессионные вектора введены последовательности, обеспечивающие транспорт белкового продукта гибридного *desC-egfp* гена в разные клеточные компартменты (хлоропласты и эндоплазматический ретикулум (ЭР)). Из агроинфильтрированных листьев взяты участки с максимальным уровнем флуоресценции eGFP с последующей оценкой локализации гибридного белка методом лазерной конфокальной микроскопии. Однако, с использованием этого метода оценить локализацию гибридного белка как в хлоропластах, так и ЭР оказалось затруднительно (рис. 1).

Вероятно, это обусловлено сложными очертаниями клеток и пространственной структурой самих растительных компартментов. Схожие ограничения при исследовании локализации белков в растительных клетках с использованием метода агроинфильтрации отмечены и другими исследователями [Wang et al., 2015; Xu et al., 2014].

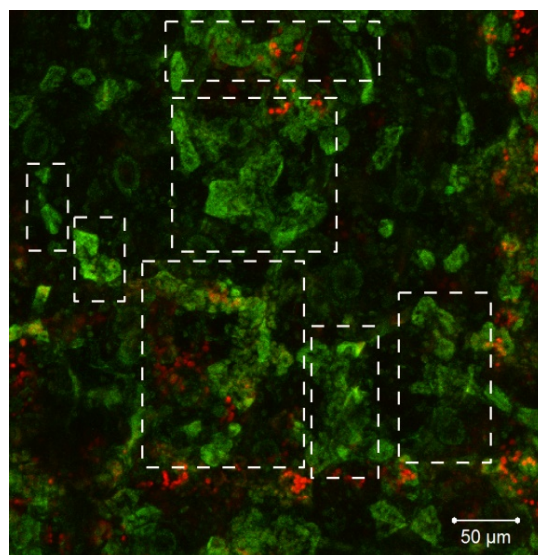


Рис. 1. Флуоресценция GFP в агроинфильтрированных листьях *Nicotiana benthamiana*. Агробактерии, несущие кассеты экспрессии слитых с GFP белков были инфильтрированы в листья *N. benthamiana* и флуоресценцию GFP наблюдали через 4 дня после агроинфильтрации при УФ свете. Области флуоресценции отмечены пунктирными линиями.

Чтобы преодолеть это ограничение, из участков агроинфильтрированных листьев с максимальной флуоресценцией выделены протопласты, которые затем были проанализированы с помощью флуоресцентной микроскопии. В результате продемонстрировано, что получение протопластов из инфильтрированной листовой ткани после транзientной экспрессии позволяет легко визуализировать локализацию целевых белковых продуктов в растительной клетке. А именно, нами визуализирована локализация слитого белка DesC-EGFP в соответствующих компартментах клетки для каждой сигнальной последовательности (рис. 2).

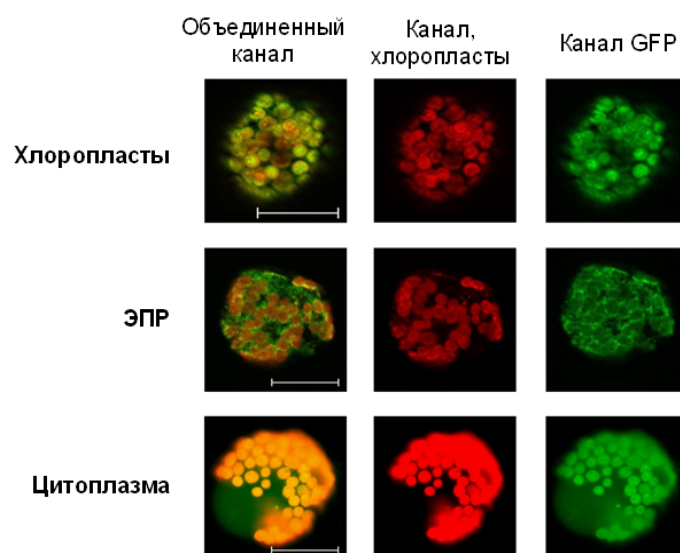


Рис. 2. Анализ субклеточной локализации слитых с GFP белков в протопластах табака, полученных из клеток агроинфильтрированной области листьев. Объединенные рисунки (первая колонка) включает зеленый канал (последняя колонка) и канал автофлуоресценции хлоропластов (средняя колонка). Размерность 10 μм.

Для того чтобы ответить на вопрос как локализации $\Delta 9$ десатуразы влияет на жирнокислотный состав суммарных липидов и как локализация дельта-9-десатуразы взаимосвязана с ее функциональной эффективностью, а именно, с процессом модуляции ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов растений, был изучен жирнокислотный состав суммарных липидов. На основе полученных данных о весовых процентах жирных кислот от их общего содержания в исследуемом образце и массы жирных кислот в миллиграммах относительно количества стандартного соединения (гептадекановой кислоты) было рассчитано отношение массы продукта реакции десатурации (олеиновая кислота) к массе его субстрата (стеариновая кислота) и индекс ненасыщенности (ИН). Было убедительно продемонстрировано, что отношение продукт/субстрат и значение ИН всегда выше у образцов, трансформированных плазмидами несущими ген дельта-9-десатуразы по сравнению с контрольными образцами (рис. 3-4) и значения рассчитанных показателей при разной локализации $\Delta 9$ -десатуразы в растительной клетке различаются.

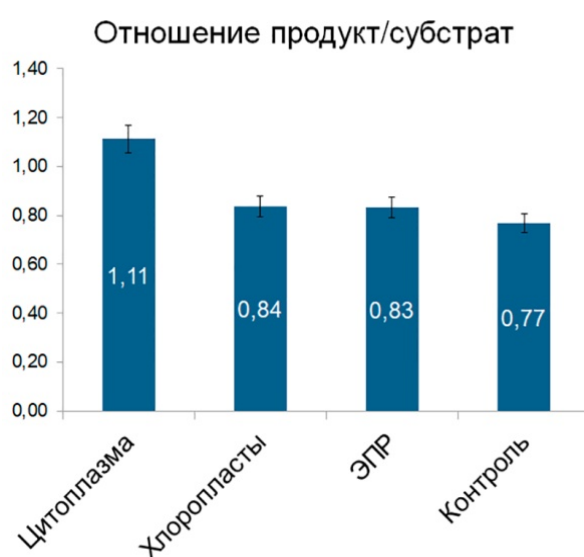


Рис. 3. Отношение продукта реакции десатурации к его субстрату в образцах.

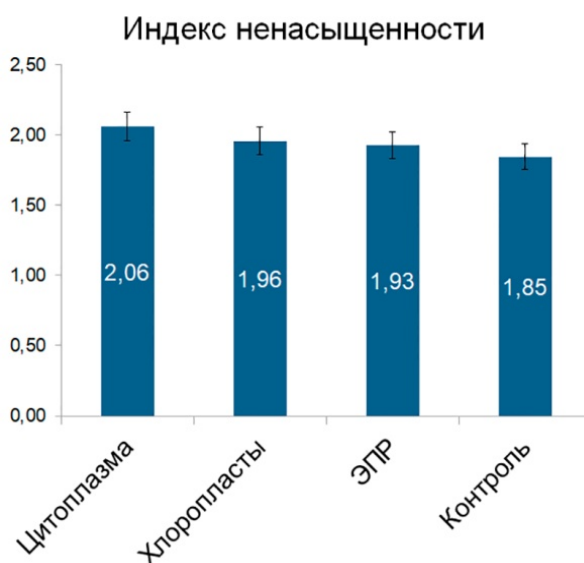


Рис. 4. Индекс ненасыщенности, рассчитанный по методу [Lyons et al., 1964].

Таким образом, нами доказано, что лидерные последовательности обеспечивают корректную локализацию белкового продукта рекомбинантного гена в соответствующих компартментах растительной клетки: в хлоропластах, в ЭР и в цитоплазме. Убедительно продемонстрирована региоспецифичность гетерологичной $\Delta 9$ -десатуразы в зависимости от ее локализации в растительной клетке. Оценен вклад $\Delta 9$ -десатуразы в состав и массовую долю насыщенных и ненасыщенных жирных кислот суммарных липидов, и установлено, что эти показатели при разной локализации $\Delta 9$ -десатуразы в растительной клетке различаются. Показано, что метод транзientной экспрессии может быть применен для изучения вклада десатураз в модуляцию жирнокислотного состава мембранных липидов растений. Предложена удобная, быстрая и надежная система транзientной экспрессии генов, перспективная для характеристики сигнальных последовательностей и оценки локализации целевых белков в растительной клетке, протокол которой включает агроинфильтрацию с последующим получением протопластов из агроинфильтрированных участков листьев.

Литература

Lyons J.M., Wheaton T.A., Pratt H.K. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants// *Plant Physiol.* – 1964. – V. 39, No. 2. – P. 262–268.

Wang H., Wang W., Zhan J., Huang W., Xu H. An efficient PEG-mediated transient gene expression system in grape protoplasts and its application in subcellular localization studies of flavonoids biosynthesis enzymes // *Scientia Horticulturae.* – 2015. – V. 191. – P. 82–89.

Xu K., Huang X., Wu M., Wang Y., Chang Y., Liu K., Zhang J., Zhang Y., Zhang F., Yi L., Li T., Wang R., Tan G., Li C. A rapid, highly efficient and economical method of agrobacterium-mediated in planta transient transformation in living onion epidermis // *PLoS ONE.* – 2014. – V. 9, No. 1. – e83556.

USE TRANSIENT EXPRESSION FOR STUDY OF THE LOCALIZATION AND FUNCTIONAL ROLE OF PROTEINS IN A PLANT CELL, ON THE EXAMPLE OF ACYL-LIPID $\Delta 9$ -DESATURASE

M.A. Berestovoy, O.S. Pavlenko, A.A. Tyurin, R.A. Sidorov, I.V. Goldenkov-Pavlova

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia,
m.berestovoy1181@gmail.com

Abstract. We studied the localization and functional role of the target protein in the plant cell using unified vectors for transient expression with the gene sequence of $\Delta 9$ desaturase and leader sequences for localization the protein product of the gene in the cytoplasm, chloroplasts, and ER. The study includes fine visualization of the target protein in cell compartments and an estimation of the changes in composition and mass fraction of fatty acids, depending on its localization.

Keywords: *transient expression, protoplasts, agroinfiltration, $\Delta 9$ -desaturase, subcellular localization*

ДУАЛИСТИЧНЫЕ ЦИТОХРОМЫ P450 ПОДСЕМЕЙСТВА CYP74B

Е.К. Бессолицына, С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, *bessolicina_elen@mail.ru*

Аннотация. Подсемейство ферментов CYP74B включает в себя 13-гидропероксидспецифичные гидропероксидлиазы (ГПЛ) и дивинилэфирсинтазы (ДЭС). Объектами настоящей работы являются рекомбинантные ферменты CYP74B3 (*Solanum tuberosum*), CYP74B4v1 (*Medicago sativa*), CYP74B6 (*Cucumis sativus*), CYP74B16 (*Linum usitatissimum*) и DcCYP74B (*Daucus carota subsp. Sativus*). Помимо основных продуктов данные ферменты катализируют образование дополнительных продуктов эпоксиалкогольсинтаз (ЭАС) оксиранил карбинолов.

Ключевые слова: оксиплины; цитохромы P450; ферменты подсемейства CYP74B; эпоксиалкогольсинтаза; гидропероксидлиаза; дивинилэфирсинтаза

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1187-1190

Важную роль в защите растений и передаче сигналов играют липоксигеназный каскад и его продукты – оксиплины, окисленные производные полиненасыщенных жирных кислот. Разнообразие оксиплинов обеспечивается липоксигеназами и неклассическими цитохромами P450 семейства CYP74 [Grechkin, 1998; Brash, 2009; Hughes et al., 2009]. Семейство CYP74 включает в себя четыре типа ферментов: две дегидразы – алленоксидсинтазу (АОС) и дивинилэфирсинтазу (ДЭС), а также две изомеразы – гидропероксидлиазу (ГПЛ) и эпоксиалкогольсинтазу (ЭАС). АОС являются членами подсемейств CYP74A и CYP74C, ДЭС являются членами подсемейств CYP74B, CYP74D, CYP74H, CYP74M и CYP74Q, а ГПЛ являются членами подсемейств CYP74B, CYP74C, CYP74E, CYP74F и CYP74G.

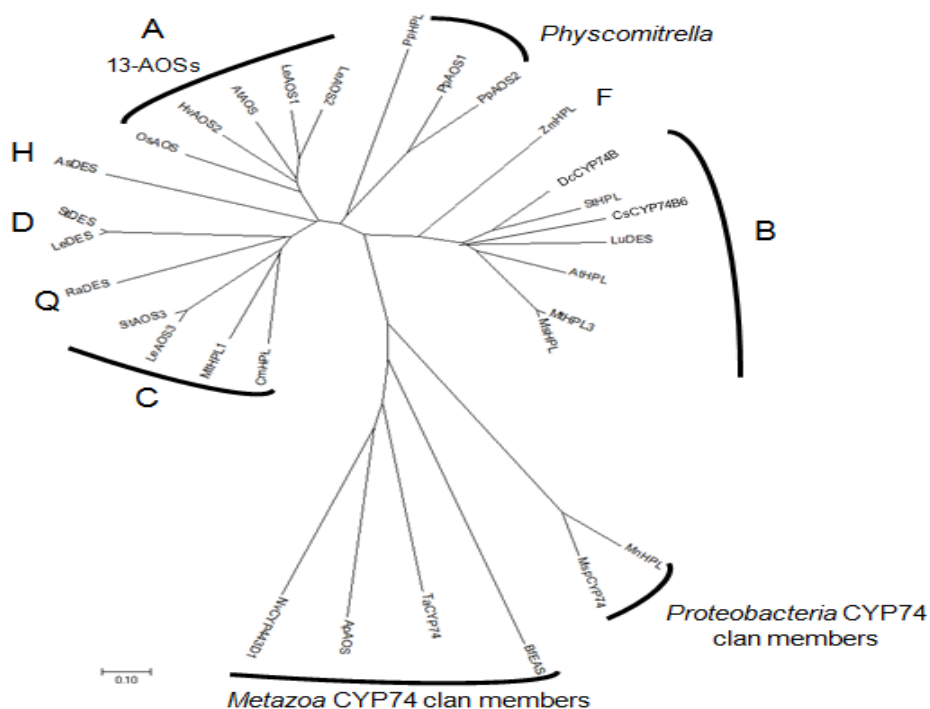


Рис. 1. Один из вариантов филогенетического дерева представителей клана CYP74.

Недавнее обнаружение CYP74-подобных ферментов у некоторых протеобактерий, многоклеточных животных [Lee et al., 2008; Toporkova et al., 2017] и у бурых водорослей [Toporkova et al., 2017] расширило определение CYP74 от семейства до клана. Истинные ЭАС до сих пор были обнаружены только у многоклеточных животных и бурых водорослей (рис.1).

Ферменты CYP74 превращают гидроперекиси жирных кислот в четыре типа продуктов, а именно окиси аллена (продукт АОС), дивиниловые эфиры (продукт ДЭС), полуацетали (продукт ГПЛ) и эпоксигидроксиоктадеценовые кислоты (продукт ЭАС).

Объектами настоящей работы являются рекомбинантные ферменты подсемейства CYP74B: CYP74B3 (*Solanum tuberosum*), CYP74B4v1 (*Medicago sativa*), CYP74B6 (*Cucumis sativus*), CYP74B16 (*Linum usitatissimum*), а также DcCYP74B (*Daucus carota subsp. Sativus*). Подсемейство ферментов CYP74B включает в себя 13-специфичные ГПЛ и ДЭС.

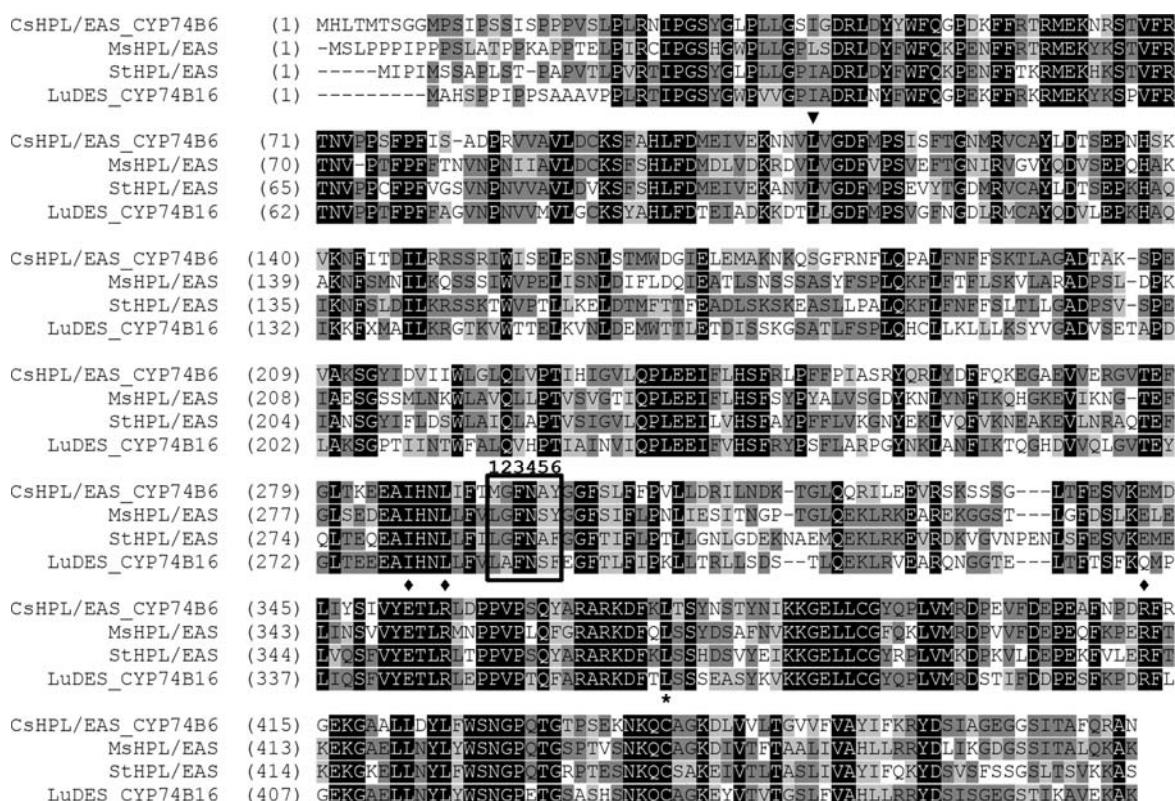


Рис. 2. Полные аминокислотные последовательности целевых ферментов. В рамке выделена последовательность гидропероксид-связывающего домена (домен ГСД).

Рекомбинантные ферменты CYP74B3, CYP74B4v1, CYP74B6, CYP74B16 и DcCYP74B были получены в гетерологичных системах экспрессии с использованием клеток *E. coli*. Полноразмерные открытые рамки считывания были клонированы для получения рекомбинантных белков, которые были экспрессированы в бактериальном продуценте, очищены методом металл-аффинной хроматографии, и методом ГХ-МС анализа были исследованы каталитические свойства. Полные аминокислотные последовательности целевых ферментов представлены на рис. 2. Все цитохромы P450 имеют сходную третичную структуру белковой молекулы в комплексе с гемом и имеют определенные консервативные, каталитически важные домены. В частности, в катализе непосредственно участвует гидропероксид-связывающий домен (домен ГСД), состоящий из 6 аминокислотных остатков.

Предпочтительными субстратами этих ферментов являются 13-гидроперекиси линолевой и альфа-линоленовой кислот (13-ГПОД и 13-ГПОТ, соответственно). 9-гидроперекиси являются неэффективными субстратами для всех ферментов, кроме DcCYP74B.

Фермент CYP74B16 (LuDES) катализирует превращения 13-ГПОД и 13-ГПОТ в (ω 5Z)-этеролевую и (ω 5Z)-этероленовую кислоты, соответственно. Однако превращение 13-ГПОД и 9-ГПОД привело к получению дополнительных соединений эпокиспиртов.

Фермент CYP74B3 (StHPL) приводит к образованию полуацеталей, продуктов ГПЛ, в качестве основных продуктов из 13-ГПОД, а также из 13-ГПОТ. Кроме того, побочными продуктами превращения 13-ГПОД ферментом StHPL являются эпоксигидроксикислоты. Аналогичная ситуация наблюдается в случае фермента CYP74B6. Наибольшая активность фермента CYP74B6 наблюдается в отношении 13-ГПОТ. Фермент CYP74B6 обладает активностью ГПЛ при превращении 13-ГПОТ, основным продуктом был определен как 12-оксо-9-додеценная кислота, продукт 13-ГПЛ. При взаимодействии с 13-ГПОД основным продуктом являются 11-гидрокси-12,13-эпоксиоктадеценная кислота и ее стереоизомеры, продукты ЭАС.

В то же время фермент CYP74B4v1 (MsHPL) обладает другими особенностями. Фермент MsHPL катализирует превращение 13-ГПОД в полуацетали в качестве основного продукта и оксиранил карбинолы - в качестве побочного продукта. В то же время, 13-ГПОТ, а также 9-ГПОТ были неэффективными субстратами для фермента MsHPL.

По выравниванию аминокислотных последовательностей домен ГСД DcCYP74B абсолютно аналогичен домену ГСД типичных ГПЛ. Предпочтительными субстратами для этого фермента являются 9-ГПОД / ОТ. Таким образом, DcCYP74B обладает 9-специфичностью, в отличие от других 13-специфичных членов подсемейства CYP74B. Основными продуктами превращения гидроперекисей при участии этого фермента являются альфа-кетолы, продукты АОС. В качестве минорных продуктов были определены 9-оксононановая кислота, продукт ГПЛ, а также эпокиспирты, продукты ЭАС. Таким образом, фермент моркови является первым представителем подсемейства CYP74B, представляющим собой 9-специфичную АОС.

Работа выполнена при поддержке грантов 18-34-01012-мол_a и МК-5989.2018.4.

Литература

Brash A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes // *Phytochemistry*. – 2009. – V. 70. – P. 1522–1531.

Grechkin A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway // *Prog. Lipid Res.* – 1998. – V. 37. – P. 317–352.

Hughes R.K., De Domenico S., Santino A. Plant cytochrome CYP74 family: biochemical features, endocellular localisation, activation mechanism in plant defence and improvements for industrial applications // *ChemBioChem*. – 2009. – V. 10. – P. 1122–1133.

Lee D.-S., Nioche P., Hamberg M., Raman C.S. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthesis enzymes // *Nature*. – 2008. – V. 455. – P. 363–370.

Toporkova Y.Y., Fatykhova V.S., Gogolev Y.V., Khairutdinov B.I., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Epoxyalcohol synthase of *Ectocarpus siliculosus*. First CYP74-related enzyme of oxylipin biosynthesis in brown algae // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2017. – V. 1862. – P. 167–175.

Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Bessolitsyna E.K., Smirnova E.O., Fatykhova V.S., Brühlmann F., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into

allene oxide synthases by site-directed mutagenesis // BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2018. – V. 1863. – P. 369–378.

Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Mukhitova F.K., Hamberg M., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Identification of CYP443D1 (CYP74 clan) of *Nematostella vectensis* as a first cnidarian epoxyalcohol synthase and insights into its catalytic mechanism // Biochim. Biophys. Acta. – 2017. – V. 1862. – P. 1099–1109.

DOUBLE FUNCTION CYTOCHROMES P450 OF THE CYP74 FAMILY

E.K. Bessolitsyna, S.S. Gorina, Y.Y. Toporkova, L.Sh. Mukhtarova, A.N. Grechkin

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Science Center of the Russian Academy of sciences, Kazan, Russia, Kazan, *bessolicina_elen@mail.ru*

Abstract. The CYP74B subfamily of fatty acid hydroperoxide transforming enzymes includes 13-hydroperoxide specific hydroperoxide lyases (HPLs) and divinyl ether synthases (DESs). The objects of the present work are the recombinant CYP74B3 (*Solanum tuberosum*), CYP74B4v1 (*Medicago sativa*), CYP74B6 (*Cucumis sativus*), and CYP74B16 (*Linum usitatissimum*) enzymes. Along with major products these enzymes produced oxiranyl carbinols. The preferred substrates of these enzymes are 13-hydroperoxides of linoleic and α -linolenic acids.

Keywords: *Oxylipins; Cytochrome P450; CYP74B subfamily enzymes; Epoxyalcohol synthase; Hydroperoxide lyase; Divinyl ether synthase*

ИЗУЧЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПОПУЛЯЦИИ МИТОХОНДРИЙ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Т.А. Болотова, И.Ю. Субота, В.И. Тарасенко, Ю.М. Константинов,
М.В. Кулинченко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *bolotova_t.a@mail.ru*

Аннотация. Показано, что из проростков кукурузы, корнеплодов репы и картофеля можно выделить три отдельные субпопуляции митохондрий. Выявлено, что митохондриальная субпопуляция с наименьшей скоростью седиментации в градиенте плотности сахарозы или перколла наиболее эффективно импортирует ДНК. Мы полагаем, что в составе этой субпопуляции содержатся дополнительные клеточные факторы и/или контактные сайты с мембранами других органелл, способствующие формированию мембранных каналов, осуществляющих транспорт молекул ДНК.

Ключевые слова: *выделение митохондрий, митохондриальная субпопуляция, импорт ДНК, Solanum tuberosum, Brassica rapa, Zea mays*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1191-1194

Многолетние исследования, проведенные для многих организмов, от одноклеточных дрожжей [Nunnari et al., 1997; Okamoto, Shaw, 2005 и др.] до высших многоклеточных организмов, включая растения [Arimura, Tsutsumi, 2002; Logan, 2006 и др.] и млекопитающих [Bereiter-Hahn, 1990; Rizzuto et al., 1998 и др.] показывают, что митохондриальная популяция единичной клетки состоит из смеси митохондрий разнородной морфологии. В отличие от митохондрий дрожжей и млекопитающих, фрагментированные и дискретные митохондрии растений не формируют непрерывную сеть, являются очень динамичными в отношении морфологии и движения внутри клетки [Logan, 2010]. Полагают, что гетерогенность митохондриальной популяции в клетке может быть обусловлена этапами биогенеза этих органелл на разных стадиях развития организма или различием их метаболических функций, выполняемых в разных тканях. Значительные вариации морфологических отличий среди митохондрий в клетках разных тканей могут быть связаны с различными функциональными задачами этих клеток и являться одним из механизмов адаптации к особому метаболическому статусу клетки [Jakobs et al., 2011]. Изучение особенностей импорта ДНК [Konstantinov et al., 2016] в митохондриальные субпопуляции клеток растений позволяет провести не только более углубленное исследование механизма транспорта этих макромолекул в митохондрии, но и выявить взаимосвязь между выполнением отдельными митохондриями или их популяциями внутри клетки специализированных функций, связанных с продуцированием энергии, сигнализацией или индукцией апоптоза и их структурной организацией.

Объектами нашего исследования были митохондрии, изолированные из двух типов растительной ткани: прорастающей (этиолированные 3х-дневные проростки кукурузы *Zea mays*) и запасающей (корнеплоды репы *Brassica rapa* и клубни картофеля *Solanum tuberosum*). Митохондрии получали методом дифференциального центрифугирования с последующим разделением в линейном градиенте плотности сахарозы (0.3-1.2 М) – для кукурузы, или в ступенчатом градиенте плотности перколла (45%-21%-18%, об./об.) – для репы и картофеля. Визуально в обоих типах градиентов можно было выделить 2-3 фракции. Самая верхняя фракция (фракция 1)

локализовалась на уровне 0,3-0,4 М концентрации сахарозы или на границе между 18% и 21% плотности перколла. Основная митохондриальная фракция (фракция 3) для кукурузы находилась на уровне градиента плотности, соответствующем 0,5-0,8 М сахарозы, для репы и картофеля-на границе между 21% и 45% перколла. Фракцию 2 отбирали из слоя градиента сахарозы или перколла, находящегося непосредственно над фракцией 3. Отобранные митохондрии отмывали от избытка сахарозы или перколла и использовали для функциональных исследований.

С помощью электрофореза в ПАА-геле в денатурирующих условиях были обнаружены незначительные отличия в белковых спектрах 1-й фракции в сравнении со спектрами 2-й и 3-й фракций: для этой фракции митохондрий кукурузы и репы можно было отметить увеличение количества белка размером 80 кДа и изменение соотношения количества белков размером 100 и 110 кДа. При проведении Вестерн-анализа с использованием антител к VDAC1 было выявлено, что митохондриальный порин присутствует в составе белков всех трех фракций кукурузы и репы.

Уровень дыхательной активности во всех трех митохондриальных фракциях, полученных из этиолированных проростков кукурузы, был низким, коэффициент дыхательного контроля, показывающий сопряженность дыхания и фосфорилирования митохондрий, варьировал от 2 до 3. Для первой фракции («легких» митохондрий) был характерен более высокий уровень дыхательной активности, однако этот показатель фракции 1 был нестабильным. В корнеплодах репы и клубнях картофеля наиболее высоким показателем дыхательной активности (около 4) обладали митохондрии фракций 2 и 3. Митохондрии фракции 1 характеризовались более низким уровнем дыхательной активности (около 2), или же, в ряде случаев, сопряжение дыхания и фосфорилирования в этой фракции вообще отсутствовало.

Анализ активности дыхательных комплексов с помощью метода BN-PAGE показал, что 1-я митохондриальная фракция во всех трех исследованных растительных видах имела существенные различия в составе и функционировании мембранных комплексов по сравнению с комплексами фракций 2 и 3. У кукурузы и репы в 1-й фракции активность мембранных дыхательных комплексов была снижена (для комплексов I и II) или отсутствовала (для комплекса IV). Для митохондрий 1-й фракции картофеля характерно некоторое повышение активности комплекса I и снижение активности комплекса II в сравнении с двумя другими фракциями.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что популяция митохондрий, выделяемых из этиолированных проростков кукурузы, корнеплодов репы и клубней картофеля характеризуется структурной и функциональной неоднородностью. Фракция 1, по всей видимости, представляет собой незрелые митохондрии, в мембране которых комплексы дыхательной цепи еще только формируются и не функционируют в полной мере.

С целью дальнейшей функциональной характеристики различных митохондриальных субпопуляций в клетке, а также для изучения возможной роли гетерогенности митохондрий в механизме транспорта ДНК было проведено исследование эффективности импорта ДНК в митохондрии трех клеточных субпопуляций этих органелл. Анализ эффективности импорта методом количественной ПЦР показал, что в митохондриях 1-й фракции наблюдается существенно повышенный уровень поглощения ДНК (рис. 1). При этом повышенный уровень импорта ДНК в 1-ю фракцию (более чем в 10 раз по сравнению с импортом во фракцию 3) не зависел ни от длины субстрата, ни от растительного источника митохондрий. Следует отметить, что разница между уровнем импорта ДНК в 1-ю и 3-ю фракции митохондрий репы (в среднем в 43 раза) была существенно выше по сравнению с наблюдаемой для митохондрий кукурузы и картофеля (в 11-13 раз). Интенсивность импорта ДНК малой

и средней длины в митохондрии 2-й фракции также был несколько выше (в 2-3 раза) по сравнению с импортом в митохондрии фракции 3 (для кукурузы и репы) (рис. 1 А, Б, Г.), импорт ДНК большой длины в митохондрии фракций 2 и 3 из картофеля оставался приблизительно на одном уровне (рис. 1 В).

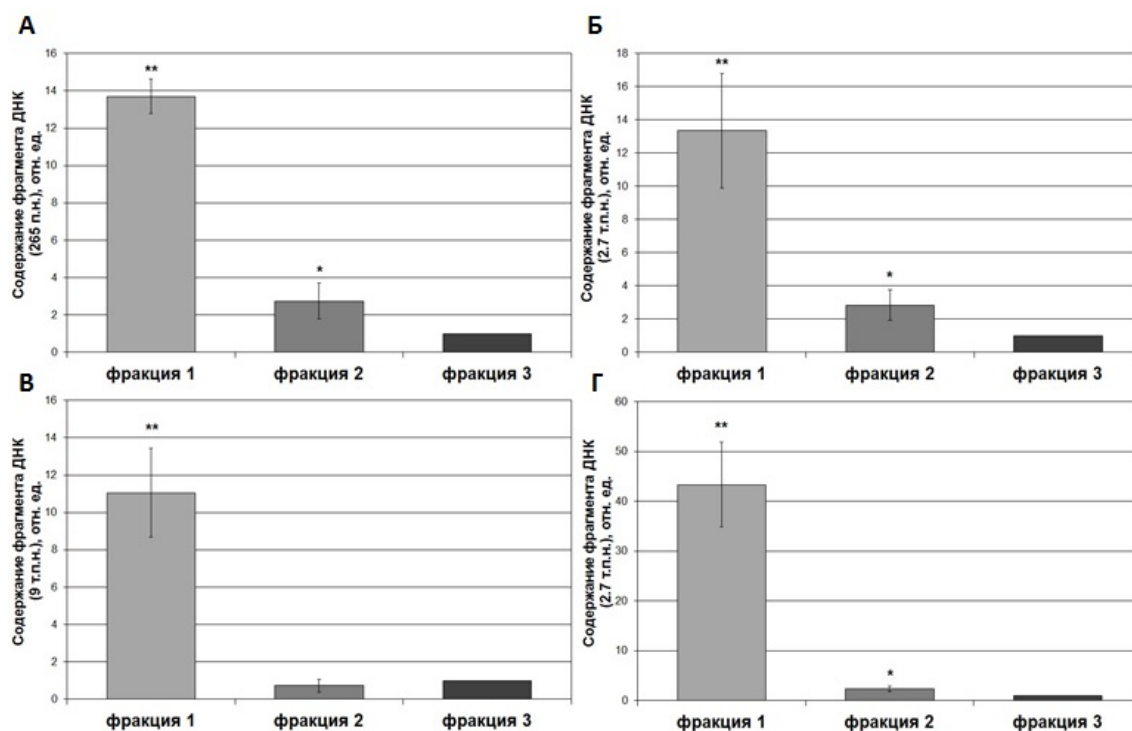


Рис. 1. Анализ эффективности импорта ДНК разной длины в митохондриальные фракции различных видов растений методом количественной ПЦР в реальном времени. На рисунке представлены диаграммы уровней активности импорта ДНК в три фракции митохондрий *Z. mays* (А и Б), *S. tuberosum* (В) и *B. rapa* (Г). Количество импортированной ДНК нормировали к количеству эндогенной ДНК, консервативному митохондриальному гену *NAD4*. Эффективность импорта ДНК в 3-ю митохондриальную фракцию принята за условную единицу. Данные представлены по результатам не менее трех биологических повторностей.

Мы полагаем, что наблюдаемый нами феномен различия в активности импорта ДНК в различные митохондриальные субпопуляции может быть обусловлен тем, что митохондрии 1-й фракции (1) являясь «протомитохондриями», имеют отличающуюся от типичных, зрелых митохондрий структуру мембран с измененным составом и проводимостью транспортных каналов, либо (2) могут содержать дополнительные клеточные факторы и сохранившиеся контактные сайты с мембранами других органелл, например, эндоплазматического ретикулума, способствующими формированию транспортных мембранных путей, осуществляющих транслокацию молекул ДНК.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-00603.

Литература

Arimura S., Tsutsumi N. A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in Arabidopsis mitochondrial division // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – V. 99. – P. 5727–5731.

Bereiter-Hahn J. Behavior of mitochondria in the living cell // Int. Rev. Cytol. – 1990. – V. 122. – P. 1–63.

Jakobs S., Stoldt S., Neumann D. Light microscopic analysis of mitochondria heterogeneity in cell population and within single cells // *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* – 2011. – V. 123. – P. 1–19.

Konstantinov Y.M., Dietrich A., Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Klimenko E.S., Tarasenko V.I., Bolotova T.A., Koulintchenko M.V. DNA import into mitochondria // *Biochemistry (Moscow)*. – 2016. – V. 81. – P. 1044–1056.

Logan D.C. Plant mitochondria dynamics // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1763. – P. 430–441.

Logan D.C. The dynamic plant chondriome // *Seminars in Cell & Developmental Biology.* – 2010. – V. 21. – P. 550–557.

Nunnari J., Marshall W.F., Straight A., Murray A., Sedat J.W., Walter P. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA // *Mol. Biol. Cell.* – 1997. – V. 8. – P. 1233–1242.

Okamoto K., Shaw J.M. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. // *Annu. Rev. Genet.* – 2005. – V. 39. – P. 503–536.

Rizzuto R., Pinton P., Carrington W., Fay F.S., Fogarty K.E., Lifshitz L.M., Tuft R.A., Pozzan T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses // *Science.* – 1998. – V. 280. – P. 1763–1766.

STUDY OF THE HETEROGENEITY OF THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE HIGHER PLANT MITOCHONDRIA

T.A. Bolotova, I.Yu. Subota, V.I. Tarasenko, Y.M. Konstantinov, M.V. Koulintchenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *bolotova_t.a@mail.ru*

Abstract. It was shown that three distinguished mitochondrial subpopulations can be isolated from maize seedlings, turnip and potato root crops. Mitochondrial subpopulation with the slowest sedimentation rate in the gradient of sucrose or percoll density imports DNA most effectively. We suggest that this subpopulation contains additional cellular factors and/or contact sites with membranes of other organelles that contribute to the formation of membrane channels facilitating transport DNA molecules.

Keywords: *mitochondria isolation, mitochondria subpopulations, DNA import, Solanum tuberosum, Brassica rapa, Zea mays*

ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ТАБАКА НА ВОЗДЕЙСТВИЕ БИОТРОФА *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* И НЕКРОТРОФА *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

С.В. Бояркина, Ю.В. Омеличкина, Т.Н. Шафикова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *klyuevskaya@ya.ru*

Аннотация. Инфицирование растений суспензией биотрофного патогена *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* и его экзометаболитами индуцирует развитие системной устойчивости растения к последующему инфицированию некротрофом *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. Устойчивость к некротрофу сохраняется у второго поколения растений, что позволяет полагать о развитии иммунной памяти при инфицировании биотрофом.

Ключевые слова: *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, *Nicotiana tabacum*, *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*, системная приобретенная устойчивость (СПУ)

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1195-1198

Введение. В природных условиях растения подвергаются действию стрессоров различной природы, как биотических, так и абиотических. К биотическим стрессорам относятся патогены с различными жизненными стратегиями – биотрофы и некротрофы. Отличительной чертой действия биотрофов является использование ими ресурсов живых клеток растения, в то время как некротрофы поселяются только на предварительно убитой ими ткани. Растения обладают рядом механизмов, направленных на противодействие инфицированию, обусловленных способностью своевременно распознать патоген и активировать различные сигнальные пути и защитные реакции при заражении фитопатогенами [Дьяков и др., 2001; Тютюрев, 2002].

Устойчивость растений определяется наличием у них R-генов, продукты которых участвуют в восприятии эффекторов патогена (продуктов *avr*-генов) и запуске защитных реакций. Одной из первичных реакций на воздействие патогена является генерация активных форм кислорода (окислительный взрыв) [Torres et al., 2006]. Другой защитной реакцией при действии биотрофа является индукция синтеза салициловой кислоты (SA) – сигнальной молекулы, способствующей активации ряда событий, связанных с защитой растения, что приводит к развитию реакции сверхчувствительности и системной приобретенной устойчивости (СПУ) – устойчивости всего растения к широкому кругу патогенов [Прудникова, 2008; Zhibing Lai, 2013]. При распознавании растением некротрофного патогена происходит индукция синтеза жасмоновой кислоты (JA), результатом чего является запуск системной индуцированной устойчивости (СИУ) [Шафикова, Омеличкина, 2015].

Таким образом, биотрофы и некротрофы активируют в растениях различные сигнальные системы, защитные реакции и иммунные механизмы (SA- или JA-типа), действие которых может иметь как синергический, так и антагонистический эффект в процессе развития системной устойчивости растений (СПУ или СИУ) к последующему заражению патогенами. Также может сопровождаться развитием иммунной памяти, реализуемой с помощью эпигенетической регуляции [Davidsson et al., 2013; Omelichkina et al., 2014]. Формирование системной приобретенной устойчивости приводит к устойчивости второго поколения растений к инфицированию патогенами.

Биотрофный патоген *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) – высоко специализированный возбудитель системного заболевания картофеля (*Solanum*

tuberosum L.), известного как «кольцевая гниль» [Eichenlaub, Gartemann, 2001]. *Cms* у растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) запускает развитие реакций специфического эффектор-активируемого иммунитета: реакции сверхчувствительности (СЧ) и системной приобретенной устойчивости (СПУ) [Шафикова, Омеличкина, 2015]. Ранее было показано, что СЧ-реакция у растений табака развивается не только при действии бактерии *Cms*, но и при действии экзометаболитного комплекса данного патогена и сопровождается развитием СПУ к широкому кругу патогенов, в том числе к нетипичному для растений патогену человека и животных *Escherichia coli* [Омеличкина и др., 2010; Тютюрев, 2002].

Некротроф *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (*Pc*) вызывает заболевание «мягкая гниль» у растений семейства пасленовых, в том числе картофеля, имеет большой набор пектолитических ферментов и токсинов [Поликсенова, 2009; Davidsson et al., 2013]. Ткани растения повреждаются за счет ферментов деградации клеточной стенки (PCWDEs – пектиназы, целлюлазы и протеиназы, выделяемые через системы секреции II типа) и служат в дальнейшем источником питания для патогена, что приводит к гибели растения [Glazebrook, 2005]. К факторам патогенности некротрофного патогена относятся: комплекс энзимов – в основном пектацелиаза; экзополисахариды; липополисахариды; Hrp-система. В дополнении к PCWDEs у *Pectobacterium* обнаружены эффекторный белок DspE транспортируемый в клетки растений посредством системы секреции третьего типа [Кузьмич и др., 2014]. Несмотря на присутствие у некротрофного патогена большого количества факторов вирулентности, растения способны проявлять устойчивость за счет связывания токсинов и их выведения, а также присутствия фенолов, инактивирующих экзоферменты.

Цель работы – сравнительный анализ развития защитных реакций растений табака *Nicotiana tabacum* (L.) при воздействии биотрофного патогена *Cms* и некротрофного патогена *Pcc*, а также их экзометаболитных комплексов.

Обсуждение результатов. Ранее в наших работах было показано, что при инфицировании листьев табака суспензией вирулентного штамма *Cms* происходила СЧ реакция. При инокулировании растений табака *CF Cms* и *DC Cms* наблюдали аналогичную картину развития локального некротического поражения, но по типу СЧ реакции [Омеличкина et al., 2014]. Инфицирование растений табака *in vitro* патогеном *Pcc* вызывало гибель растений в течение 2-х сут. Инокуляция листьев табака *CF Pcc* и *DC Pcc* не приводила к гибели растений, как при внесении суспензии живых бактерий *Pcc*, но происходило развитие ограниченных некрозов в месте инфицирования. *CF Cms* и *CF Pcc* вызывали хлороз и повреждение большего диаметра, предположительно из-за содержания пектолитических ферментов и факторов вирулентности, секретируемых патогенами, большинство из которых инактивируются при термической обработке.

Для изучения развития первичных защитных реакций на действие патогенов на уровне клеток растения определяли образование апопластного пероксида водорода. При действии *Pcc* и его метаболитов первый неспецифический пик образования пероксида водорода в суспензионной культуре клеток наблюдается в точке 3 ч, после чего происходило устойчивое повышение уровня внеклеточного пероксида водорода, что свидетельствовало о развитии неуправляемого обширного некротического процесса.

Различия в интенсивности генерации АФК в культуре клеток табака при воздействии инфекционных агентов *Cms* и *Pcc* согласуется с результатами, полученными на целом растении. В результате действия *DC*, в составе которой предполагается присутствие термостабильных эффекторов и паттернов происходил запуск генерации активных форм и разрушение клеток растений с образованием

некрозов меньшего диаметра. А внесение *CF*, в котором молекулярные микробные паттерны отсутствуют, но присутствуют гидролитические ферменты и токсины, привело к более низкому уровню генерации АФК, а диаметры некрозов в месте инфицирования были значительно больше.

Предварительная инокуляция растений табака *in vitro* экзометаболитами *Sms* и *Pcc* (*CF* и *DC*) приводила к развитию устойчивости растения к последующему инфицированию *Pcc* с КОЕ 1×10^9 – наблюдалось полное или частичное отмирание листа, но растение не погибало и сохраняло жизнеспособность. Инфицирование *Pcc* с КОЕ 2×10^9 , т.е. с высокой инфекционной нагрузкой – приводило к гибели растения, но гибель наступала на 4 сут, что на 2-е сут позже, чем без предварительной обработки, что свидетельствует о повышении жизнеспособности. Таким образом, предварительная обработка растений метаболитами *Sms* и *Pcc* способствовала повышению устойчивости к инфицированию.

Дальнейшие работы показали, что инфицирование растений табака биотрофом *Sms*, сопровождающееся развитием СЧ реакции, защищало растения второго поколения от инфицирования некротрофом *Pcc*. Наблюдалось отмирание листа инфицированного *Pcc*, но целое растение, выращенное из семян инфицированного *Sms* растения, оставалось не только неповрежденным, но происходило образование новых листьев. Растение табака выживало при любом способе первичного инфицирования – путем инъекции, нанесения капли бактериальной суспензии или заражения через корневую систему.

Выводы.

1. Действие экзометаболического комплекса как *Sms*, так и *Pcc* приводит к развитию у растений табака реакций специфического эффектор-активируемого иммунитета, что сопровождается индукцией реакцией сверхчувствительности. Культуральная жидкость, лишенная бактериальных клеток, более активна в отношении индукции СЧ-реакции, чем термически инактивированная бактериальная суспензия, вероятно, за счет содержания гидролитических ферментов и токсинов, выделяющихся бактерией в среду культивирования, которые инактивируются при термической обработке. Первичная элиситация биотрофным патогеном *Sms* активирует иммунитет растения, что приводит к индукции системной приобретенной устойчивости в период одной вегетации, определяющий устойчивость последующего поколения растений. Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу синергизма при взаимодействии SA- и JA-сигнальных путей иммунитета растений в изучаемых нами фитопатосистемах.

2. Детальное изучение состава и структуры экзометаболических некротрофного и биотрофного патогена, которые наиболее эффективны в активации собственных иммунных сил растительного организма, позволит создать экологически безопасные средства защиты растений от широкого круга фитопатогенов, что особенно актуально в условиях ухудшающейся экологической обстановки с повышающейся устойчивостью фитопатогенов к пестицидам.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Биоаналитика» с использованием коллекции ЦКП «Биоресурсный центр» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Литература

Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова Ф.С. Общая и молекулярная фитопатология: учеб. пособие. – М.: Общество фитопатологов, 2001. – 302 с.

Кузьмич С.В., Доменикан А.В., Николайчик Е.А. Идентификация *hgrL*-зависимых генов *Pectobacterium carotovorum*. – Тез. докл. Второй летней школы по биоинформатике (СПб., 27 июля– 1 августа 2014 г.), 2014. – С. 31–34.

Омеличкина Ю.В., Шафикова Т.Н., Алексеенко А.Л., Маркова Ю.А., Еникеев А.Г., Рихванов Е.Г. Ответные реакции растений и культуры клеток табака на заражение *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* // В мире научных открытий. –2010. – № 1-4. – С. 89–94.

Поликсенова В.Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам (на примере томата) // Вестник Белорусского государственного университета. Сер. 2. – 2009. – № 1. – С. 48–60.

Прудникова С.В. Микробиология с основами вирусологии: конспект лекций. – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – 152 с.

Тютюрев С.Л. Научные основы индуцированной болезнестойчивости растений. – СПб.: ВИЗР, 2002. – С. 328.

Шафикова Т.Н., Омеличкина Ю.В. Молекулярно-генетические аспекты иммунитета растений к фитопатогенным бактериям и грибам // Физиология растений. – 2015. – Т. 62, № 5. – С. 611–625.

Davidsson P.R., Kariola T., Niemi O., Palva E.T. Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria // *Frontiers in Plant Science*. – 2013. – V. 4. – P. 264–272.

Eichenlaub R., Gartemann K.H. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2001. – V. 49. – P. 445–464.

Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens // *Annu Rev Phytopathol.* – 2005. – V. 43. – P. 205–227.

Omelichkina Y.V., Boyarkina S.V., Shafikova T.N. Induction of systemic acquired resistance of plants by exometabolites of causal agent of potato ring rot // *In the world of scientific discoveries*. – 2014. – No. 10 (58). – P. 156–167.

Torres M.A., Jones J. D. J., Dangl J. L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141, No. 2. – P. 373–378.

Zhibing Lai T.M. Genetic and cellular mechanisms regulating plant responses to necrotrophic pathogens // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2013. – V. 16, No. 4. – P. 505–512.

RESPONSE REACTIONS OF TOBACCO PLANTS ON THE IMPACT OF BIOTROPHIC *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* AND NECROTHROPHIC *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

S.V. Boyarkina, Yu.V. Omelichkina, T.N. Shafikova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, klyuevskaya@ya.ru

Abstract. Infection of plants with a suspension of the biotrophic pathogen *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* and its exometabolites induces the development of systemic resistance of the plant to subsequent infection with the necrotrophic of *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum*. Resistance to necrotrophic microorganism persists in the second generation of plants. It allows one to consider the development of immune memory when infected with biotrophic microorganism.

Keywords: *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*, *Nicotiana tabacum*, *Pectobacterium carotovorum ssp. sarotovorum*, systemic acquired resistance (RAS)

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НАНОЧАСТИЦ ZnO

А.А. Буренина, Т.П. Астафурова, Е.Н. Сурнина

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия, baa888@mail.ru, garden-tsu@mail.ru, agronomia@mail.tsu.ru

Аннотация. Изучено влияние суспензии наночастиц ZnO на морфометрические и функциональные параметры огурца (*Cucumis sativus* L.). Обнаружено, что обработка субстрата наночастицами ZnO в концентрации 5 мг/кг почвы привела к ускорению роста и развития растений огурца, увеличению площади ассимилирующей поверхности и содержания суммы хлорофиллов в листьях, сухой массы надземной части и корневой системы растений. Общая урожайность огурца в опытном варианте превышала контрольный на 36%.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L., наночастицы ZnO, интенсивность фотосинтеза, хлорофилл, флавоноиды

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1199-1202

Последние десятилетия характеризуются интенсивным использованием наноматериалов в различных сферах народного хозяйства. Повышенный интерес исследователей к наночастицам вызван их необычными физическими и химическими свойствами, а также особенностями биологического действия. Наночастицы металлов обладают пролонгированным действием, что выражается в их продолжительном влиянии на регуляцию минерального питания растений, углеводный обмен, синтез аминокислот, реакции фотосинтеза и дыхание клеток [Чурилов, Амплеева, 2010]. Наночастицы оксида цинка (НЧ ZnO) относятся к числу наиболее распространенных наночастиц, поэтому их влияние на растения в настоящее время интенсивно изучается [Rico et al., 2011].

Целью данной работы являлось выявление воздействия НЧ ZnO на морфологические и физиолого-биохимические показатели растений огурца.

Суспензию НЧ ZnO получали методом лазерной абляции ZnO в дистиллированной воде, средний размер (Δ_{50}) НЧ ZnO составлял 20 нм. Объектом исследования являлся огурец (*Cucumis sativus* L.), сорт Маша. Растения выращивали в теплице учебно-экспериментального хозяйства Сибирского ботанического сада (СибБС) ТГУ (г. Томск). Площадь делянок 1 м², каждый вариант опыта заложен в трех повторностях. Почвогрунт опытных вариантов поливали суспензией наночастиц ZnO в концентрации 5 мг на 1 кг почвы перед посевом семян и через 55 дней после посева. Содержание суммы хлорофиллов и флавоноидов определяли на портативном приборе Dualex 4 (Франция). Для измерения интенсивности фотосинтеза и транспирации использовали портативный инфракрасный газоанализатор Li-6400, LI-COR (USA) с открытой системой. Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета Statistica 8.0. На рисунке представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Достоверными считали различия с вероятностью ошибки p , не превышающей 0,05.

Проведенные исследования показали, что всходы появлялись одновременно во всех вариантах эксперимента на 6-й день после посева. Затем растения в варианте с НЧ ZnO опережали в росте и развитии контрольные. Через месяц выращивания у контрольных растений было сформировано 4 листа, в варианте с НЧ ZnO – 6. Опытные растения раньше вступили в фазу плодоношения (56 дней), а в то время как контрольные еще находились в фазе цветения.

Внесение НЧ ZnO в субстрат для выращивания положительно влияло на высоту растений, в начале вегетации на 50% и более (рис. 1 а). К концу вегетации различия не наблюдались, что связано, по-видимому, с предельными ростовыми параметрами сорта, заложенными генетически.

Суммарная площадь ассимилирующей поверхности листьев на растении в опыте с НЧ ZnO во все сроки исследования была значительно больше, чем у контрольного варианта. Максимальное превышение было у 29-дневных растений – более чем на 100%, а у 56-дневных различий выявлено не было (рис. 1 б).

Более быстрый рост растений в опыте с НЧ ZnO определил увеличение сухой массы как надземной части, так и корневой системы растений в различные сроки выращивания. У 29-дневных растений огурца в варианте с НЧ ZnO сухая масса надземной части превышала контроль в 2,4 раза, а корня в 2,3 раза, у 36-дневных – в 2 и в 1,5 раза соответственно (рис. 1 в, г). В последний срок измерений достоверных отличий весовых параметров между вариантом с НЧ ZnO и контролем обнаружено не было. Полученные результаты согласуются с литературными данными о действии наночастиц ZnO на морфометрические параметры растений. Так, L. Zhao с соавт. [2013] установили, что НЧ ZnO в концентрации 400 и 800 мг/кг почвы не оказали отрицательного влияния на ростовые параметры растений огурца, кроме того, сухая масса корня была увеличена на обеих концентрациях на 10,5% и 63% соответственно. Аналогичный результат получен для сои, где под влиянием НЧ ZnO в концентрации 0,5 г/кг почвы увеличилась сухая биомасса растений [Priester et al., 2012].

Известно, что изменение условий выращивания оказывает влияние на физиолого-биохимические показатели растений, связанные, прежде всего, с фотосинтезом. Показано, что НЧ ZnO вызывают неоднозначное влияние на содержание хлорофилла в листьях растений. Например, Prasad с соавт. [2012] сообщили о повышении содержания хлорофилла в листьях арахиса на 42% при воздействии НЧ ZnO (25 нм) в концентрации 1000 ppm. Zhao с соавт. [2013] выявили тенденцию к увеличению суммы хлорофиллов в листьях огурца при воздействии НЧ ZnO в концентрации 400 и 800 мг/кг почвы. В то же время Mukherjee с соавт. [2014] отметили снижение относительного содержания хлорофилла в листьях гороха после 25 дней культивирования растений при воздействии ZnO NP (10 нм) в концентрации 125, 250 и 500 мг/кг почвы. Dimkra с соавт. [2012] также сообщили об уменьшении содержания хлорофилла в листьях пшеницы на 37% по сравнению с контролем при воздействии НЧ ZnO (<100 нм) в концентрации 500 мг Zn/кг песка. Нами было обнаружено, что почвенное внесение НЧ ZnO практически не оказывало влияния на содержание хлорофилла (данные не представлены) и снижало интенсивность фотосинтеза 19–25% по сравнению с контрольным вариантом в расчете на единицу площади листа (рис. 1 д). Но при пересчете этих параметров на суммарную площадь ассимилирующей поверхности растений содержание хлорофилла и интенсивность фотосинтеза достоверно увеличивались.

В ответ на воздействие тяжелых металлов в растениях обычно происходит накопление вторичных веществ фенольной природы, которые образуют комплексы с тяжелыми металлами, инактивируя их действие. В условиях нашего эксперимента количество флавоноидов во все сроки анализа снижалось в опытных вариантах по сравнению с контролем от 15 до 27% (рис. 1 е). Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что воздействие наночастиц ZnO в концентрации 5 мг/кг почвы не вызывают оксидативный стресс и деструктивные изменения в листьях огурца, а наоборот, способствуют усилению синтетических процессов и накоплению биомассы.

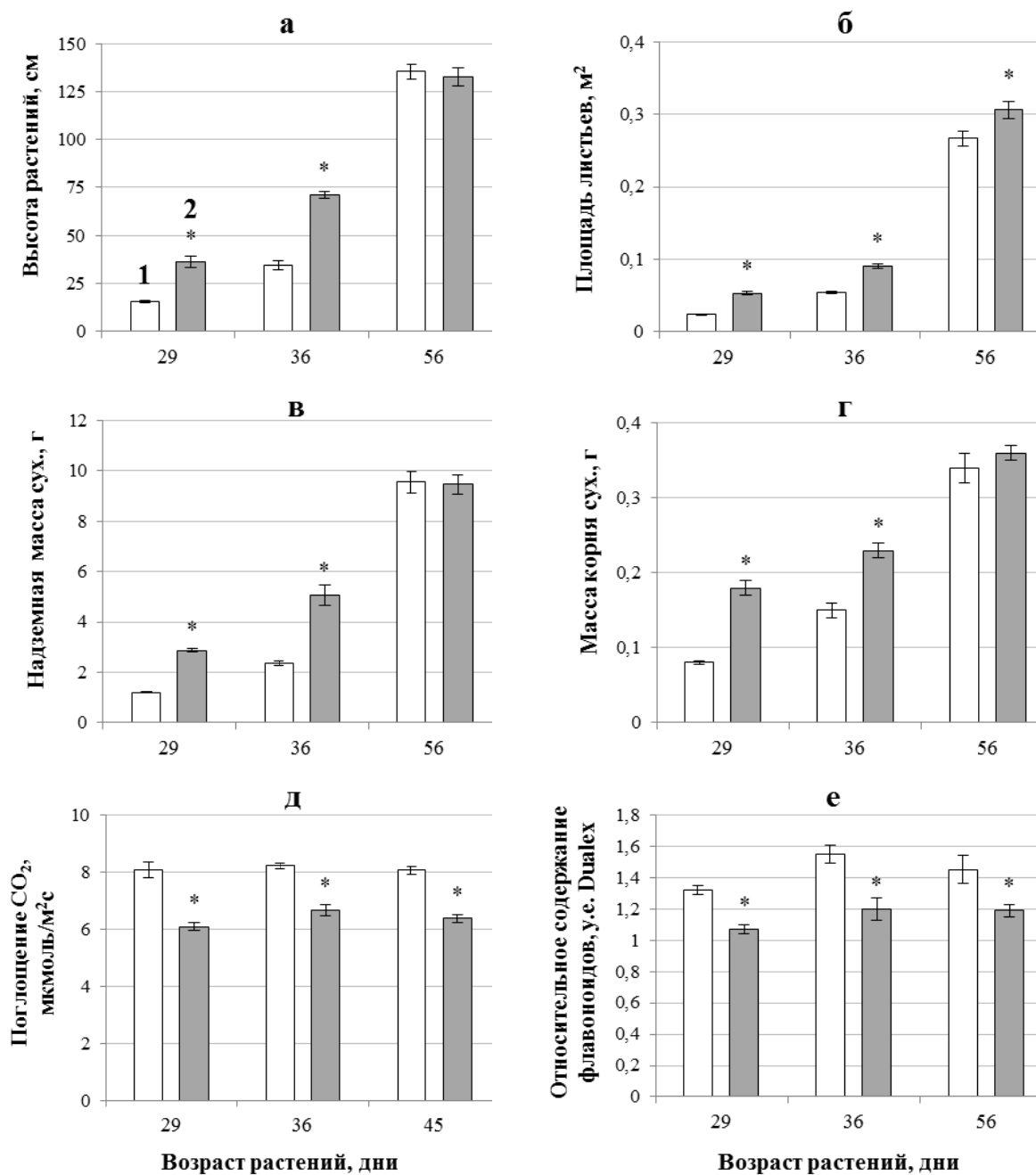


Рис. 1. Влияние наночастиц ZnO на морфометрические и физиологические параметры растений огурца: высоту растений (а), площадь листьев (б), сухая масса надземной части (в), сухая масса корня (г), интенсивность фотосинтеза (д), содержание суммы флавоноидов (е). Обозначения: 1 – контроль; 2 – вариант опыта с внесением наночастиц ZnO в почву; *достоверные отличия между контролем и опытом при $p \leq 0,05$.

Ускоренный рост растений, большая площадь ассимилирующей поверхности и накопление биомассы способствовали тому, что у растений на субстрате, содержащем НЧ ZnO, увеличилась общая урожайность, которая превысила контрольные растения на 36 % [Astafurova et al., 2017].

Таким образом, обработка почвы наночастицами ZnO в концентрации 5 мг/кг почвы привела к увеличению основных структурно-функциональных показателей, ускоряющих рост и развитие растений огурца и способствующих повышению урожайности.

Результаты были получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России, проект № 37.7810.2017/8.9.

Литература

Чурилов Г.И., Амплеева Л.Е. Биологическое действие наноразмерных металлов на различные группы растений. – Рязань: Изд-во РГАТУ, 2010. – 148 с.

Astafurova T.P., Burenina A.A., Suchkova S.A., Zotikova A.P., Kulizhskiy S.P., Morgalev Y.N. Influence of zno and pt nanoparticles on cucumber yielding capacity and fruit quality // Nano Hybrids and Composites. – 2017. – No. 13. – P. 142–148.

Dimkra C.O., Mclean J.E., Latta D.E., Managon E., Britt D.W., Johnson W.P., Boyanov M.I., Anderson A.J. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat // J. Nanopart. Res. – 2012. – No. 14. – P. 1125–1129.

Mukherjee A., Peralta-Videa J.R., Bandyopadhyay S., Rico C.M., Zhaobc L., Gardea-Torresdey J.L. Physiological effects of nanoparticulate ZnO in green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil // Metallomics – 2014. – No. 6. – P. 132–138.

Prasad T.N.V.K.V., Sudhakar P., Sreenivasulu Y., Latha P., Munaswamy, V., Reddy K.R., Sreepasad T.S., Sajanlalb P.R., Pradeep T. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut // J. Plant Nutr. – 2012. – No. 35. – P. 905–927.

Priester J.H., Ge, Y., Mielke R.E., Horst A.M., Moritz S.C., Espinosa K., Gelb J., Walker S.L., Nisbet R.M., An Y., Schimel J.P., Palmer R.G., Hernandez-Viezcac J.A., Zhao L., Gardea-Torresdey J.L., Holden P.A. Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption // PNAS. – 2012. – No. 109. – P. 14734–14735.

Rico C. M., Majumdar S., Duarte-Gardea M.Ю., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J. L. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain // J. Agric. Food Chem, 2011. – No. 59. – P. 3485–3498.

Zhao L., Sun Y., Hernandez-Viezcac J. A., Servin A., Hong J., Niu G., Peralta-Videa J. R., Duarte-Gardea M., Gardea-Torresdey J.L. Influence of CeO₂ and ZnO nanoparticles on cucumber physiological markers and bioaccumulation of Ce and Zn: a life cycle study // J. Agric. Food Chem. – 2013. – No. 61. – P. 11945–11951.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CUCUMBER PLANTS UNDER THE INFLUENCE OF ZnO NANOPARTICLES

A.A. Burenina, T.P. Astafurova, E.N. Surnina

Tomsk State University, Tomsk, Russia, baa888@mail.ru, garden-tsu@mail.ru, agronomia@mail.tsu.ru

Abstract. The influence of a suspension of ZnO nanoparticles on the morphometric and functional parameters of cucumber (*Cucumis sativus* L.) was studied. It was found that the treatment of the substrate with ZnO nanoparticles at a concentration of 5 mg/kg soil led to an acceleration in the growth and development of cucumber plants, an increase in the area of the assimilating surface and the content of chlorophyll in leaves, the dry mass of the aerial part and the root system of plants. The total yield of cucumber in the experimental version exceeded the control by 36%.

Keywords: *Cucumis sativus* L., ZnO nanoparticles, photosynthesis intensity, chlorophyll, flavonoids

ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ФЛАГЕЛЛИНАМИ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ

Г.Л. Бурьгин^{1,2}, К.Ю. Каргаполова², Ю.В. Красова¹, О.В. Ткаченко²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия, burygingl@gmail.com

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия, oktkachenko@yandex.ru

Аннотация. Изучены ответные реакции растений мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская 29 в условиях *in vitro* на действие флагеллинов ризосферных бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. Отмечены изменения биохимических и морфометрических параметров при действии бактериальных флагеллинов. При этом флагеллин штамма *A. brasilense* Sp7 проявлял меньший ингибирующий эффект на рост растений, что мы связываем с гликозилированием этого белка.

Ключевые слова: ответные реакции растений, *Triticum aestivum* L., ризосферные бактерии, флагеллин

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1203-1205

Системы подвижности и хемотаксиса бактерий играют важнейшую роль при формировании растительно-микробного симбиоза [de Weert et al., 2002]. Основным структурным белком бактериальных жгутиков, обеспечивающим направленное движение, является флагеллин. Для представителей более 30 видов бактерий показана возможность посттрансляционной модификации их флагеллинов путем ковалентного присоединения углеводов – гликозилирования [Belyakov et al., 2012]. При этом доказано, что углеводная часть флагеллина оказывает значимое влияние на способность бактерий к колонизации организма-хозяина и развитию патогенеза [Hirai et al., 2011]. Одним из модельных объектов в исследовании растительно-микробного взаимодействия являются бактерии рода *Azospirillum*, большинство видов и штаммов которых изолированы как ассоциативные симбионты многих растений, в том числе и важных сельскохозяйственных культур [Pereg et al., 2016]. Целью данной работы была сравнительная характеристика влияния гликозилированного флагеллина *A. brasilense* Sp7 и негликозилированного флагеллина *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 на рост мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская 29 в условиях *in vitro*.

Анализ результатов измерений 15-дневных растений пшеницы, культивируемых 10 суток в среде, содержащей бактериальные флагеллины штаммов *A. brasilense* Sp7 и *O. cytisi* IPA7.2, выявил достоверное снижение длины 1-го листа пшеницы под действием флагеллина IPA7.2. При этом длина второго листа при действии флагеллина IPA7.2 была на 35% больше, чем у контрольных растений. Влияние флагеллина штамма Sp7 на морфометрические показатели побегов пшеницы выявлено не было. В то же время на длину корней растений оказывали действия оба флагеллина (и штамма Sp7, и штамма IPA7.2). Так, длина корней пшеницы уменьшалась на 18% при действии флагеллина Sp7, и на 43% при действии флагеллина IPA7.2. При этом количество корней у опытных растений не отличалось от этого показателя контрольных растений (рисунок).

Измерение сухой и сырой масс микрорастений также продемонстрировало влияние флагеллина штамма IPA7.2 на микрорастения пшеницы. У опытных растений установлено снижение сырой массы побегов и корней на 24% и 39%, соответственно.

Примерно таким же было и снижение сухой массы растений, культивируемых с флагеллином IPA7.2 – на 24% побегов и на 33% корней. Достоверных различий в сырой и сухой массах при действии флагеллином штамма Sp7 на микрорастения пшеницы выявлено не было.

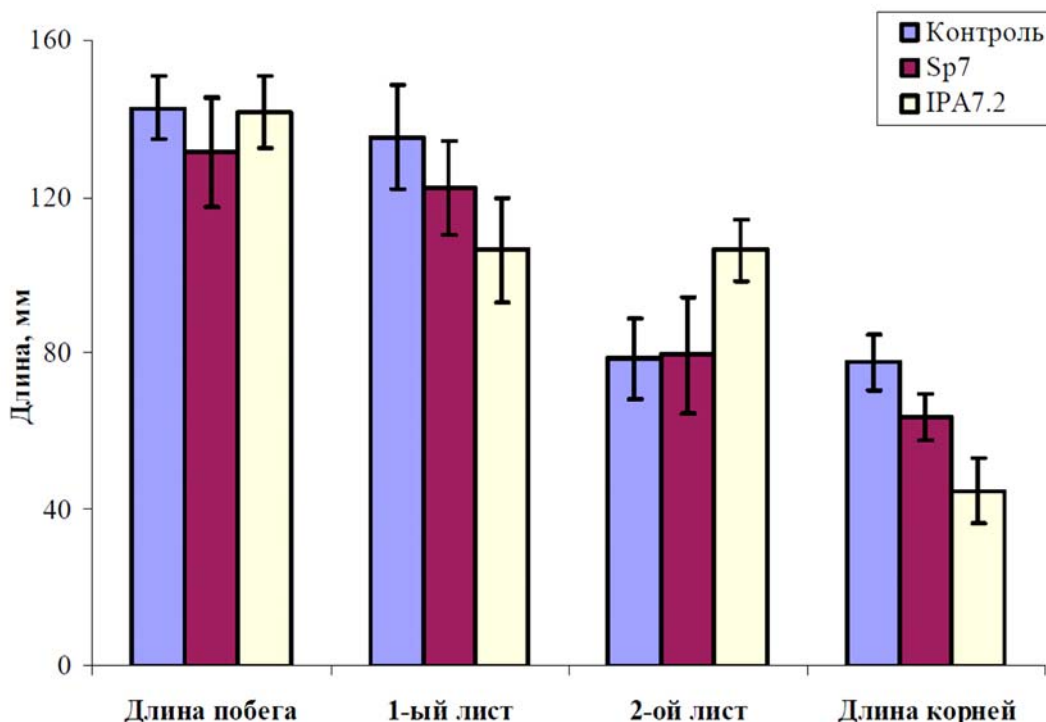


Рисунок. Морфометрические показатели микрорастений пшеницы после семи дней культивирования на жидкой среде Мурасиге-Скуга с флагеллинами *Azospirillum brasilense* Sp7 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. Концентрация флагеллинов в среде составляла 100 нМ. Приведены доверительные интервалы при $p < 0,05$; $n=30$.

Было установлено, что флагелины штаммов *A. brasilense* Sp7 и *O. cytisi* IPA7.2 в исследуемой концентрации стимулировали функциональную активность меристематических клеток корней 6-дневных микрорастений пшеницы через 24 часа после обработки: митотический индекс (МИ) клеток корневых меристем опытных растений пшеницы увеличивался на 61% (для флагеллина IPA7.2) и 89% (для флагеллина Sp7). После 7 суток действия флагеллинов (12-ти суточные растения) стимулирующий эффект выравнивался в отношении меристематических клеток корня пшеницы: МИ клеток увеличивался приблизительно на 45-50% во обоих опытных вариантах по сравнению с МИ необработанных растений. Таким образом, под влиянием бактериальных флагеллинов *A. brasilense* Sp7 и *O. cytisi* IPA7.2 большее число меристематических клеток находится в стадии митоза. Можно предположить, что происходит задержка этих клеток в G1-фазе клеточного цикла, как естественная реакция растительного организма на стресс-воздействие.

По результатам проведённых экспериментов можно констатировать присутствие в клетках *Triticum aestivum* L. рецепторов к бактериальным флагеллинам, запускающих реакции фитоиммунитета, замедляющие рост всего растения. В свою очередь, структура бактериальных флагеллинов также важна для формирования ответных реакций растений. Установлено, что негликозилированный флагеллин штамма *O. cytisi*

IPA7.2 вызывает более сильные изменения в растениях пшеницы, чем гликозилированный флагеллин штамма *A. brasilense* Sp7 [Belyakov et al., 2012]. В связи с чем можно предположить эволюционное значение гликозилирования флагеллинов азоспирилл, способствующего успешной колонизации растений этими бактериями.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №16-04-01444.

Литература

Belyakov A.Y., Burygin G.L., Arbatsky N.P., Shashkov A.S., Selivanov N.Y., Matora L.Y., Knirel Y.A., Shchyogolev S.Y. Identification of an O-linked repetitive glycan chain of the polar flagellum flagellin of *Azospirillum brasilense* Sp7 // Carbohydr. Res. – 2012. – V. 361. – P. 127–132.

de Weert S., Vermeiren H., Mulders I.H., Kuiper I., Hendrickx N., Bloember, G.V., Vanderleyden J., De Mot R., Lugtenberg B.J. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2002. – V. 15 (11). – P. 1173–1180.

Hirai H., Takai R., Iwano M., Nakai M., Kondo M., Takayama S., Isogai A., Che F.S. Glycosylation regulates specific induction of rice immune responses by *Acidovorax avenae* flagellin // J. Biol. Chem. – 2011. – V. 286. – P. 25519–25530.

Pereg L., de-Bashan L.E., Bashan Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants // Plant Soil. – 2016. – V. 399 (1-2). – P. 389–414.

PLANT RESPONSES TO FLAGELLINS OF PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA

G.L. Burygin^{1,2}, K.Yu. Kargapolova², Yu.V. Krasova¹, O.V. Tkachenko²

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia, burygingl@gmail.com

²Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov, Russia, oktkachenko@yandex.ru

Abstract. The wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Saratovskaya 29) responses to flagellins of rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* Sp7 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 have been studied under *in vitro* conditions. Changes in biochemical and morphometric parameters by bacterial flagellin actions are noted. In this case, the *A. brasilense* Sp7 flagellin showed less inhibitory effect on growth of plants that we associate with the glycosylation of this protein.

Keywords: *plant responses, Triticum aestivum* L., *rhizospheric bacteria, flagellin*

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РЯДА АЛКАЛОИДОВ НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ РАЗНЫХ ВИДОВ

В.А. Быбин, А.Л. Турская, Л.А. Максимова, Ю.А. Маркова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, godolin@mail.ru

Аннотация. Исследовано действие биологически-активных соединений: ротенона, бруцина, атропина, кофеина и колхицина на образование биопленок и подвижность по типу сворминга видами бактерий *E. coli*, *P. carotovorum* и *Rhodococcus* sp. Установлено, что колхицин в концентрации 250 мг/мл снижает биопленкообразование бактерий. В то же время данное соединение способствует подвижности *Rhodococcus* sp. по типу сворминга.

Ключевые слова: алкалоиды, микроорганизмы, биопленкообразование, сворминг-подвижность

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1206-1209

Известно, что бактерии существуют во внешней среде, как правило, в виде биопленки [Oliveira et al., 2015]. Микробные биопленки играют ведущую роль в хронизации инфекционных заболеваний, являясь фактором персистирования. В составе биопленок бактерии колонизируют искусственные суставы, линзы, катетеры и другое медицинское оборудование [Olsen, 2015]. Поэтому исследования, направленные на поиск биологически-активных соединений, способных ингибировать образование и способствовать деструкции уже сформированных биопленок, чрезвычайно актуальны.

Нами было проведено изучение действия отдельных биологически-активных соединений: ротенона, бруцина, атропина, кофеина и колхицина на образование биопленок и подвижность по типу сворминга следующими видами бактерий - *E. coli* XL-1 BLUE, *P. carotovorum* ВКМ В-1247, *Rhodococcus* sp.

Установлено, что изофлавоноид ротенон в концентрации 0,0025 мг/л значительно стимулировал прирост культуры *E. coli*. При этом его влияние на биопленкообразование данного вида не выявлено. Алкалоид бруцин в исследуемых концентрациях не оказывал влияния ни на прирост культуры, ни на формирование биопленок. Влияние атропина в концентрации 2,5 мг/мл и 25 мг/мл существенно увеличивало прирост и образование биопленки *E. coli*. Интересно, что этот алкалоид обладал выраженным антимикробным действием, что было установлено с помощью диско-диффузионного метода. Алкалоиды кофеин и колхицин не оказали выраженного влияния на данный микроорганизм (рис. 1).

В связи с тем, что штамм *E. coli* XL-1 BLUE слабо образует биопленку, вышеуказанные соединения изучали по отношению к *P. carotovorum* ВКМ В-1247 и штамму *Rhodococcus* sp., выделенному нами из ризосферы пырея. Установлено, что колхицин в концентрации 250 мг/л оказывает значимый супрессирующий эффект на биопленкообразование исследуемых видов бактерий (рис. 2).

Движение по типу сворминга, как правило, регулируется генами, которые угнетаются при биопленкообразовании. Поэтому часто оно стимулируется соединениями, блокирующими процесс биопленкообразования [Kearns, 2010]. В связи с этим были проведены эксперименты по оценке интенсивности сворминг подвижности бактерий *Rhodococcus* (рис. 3).

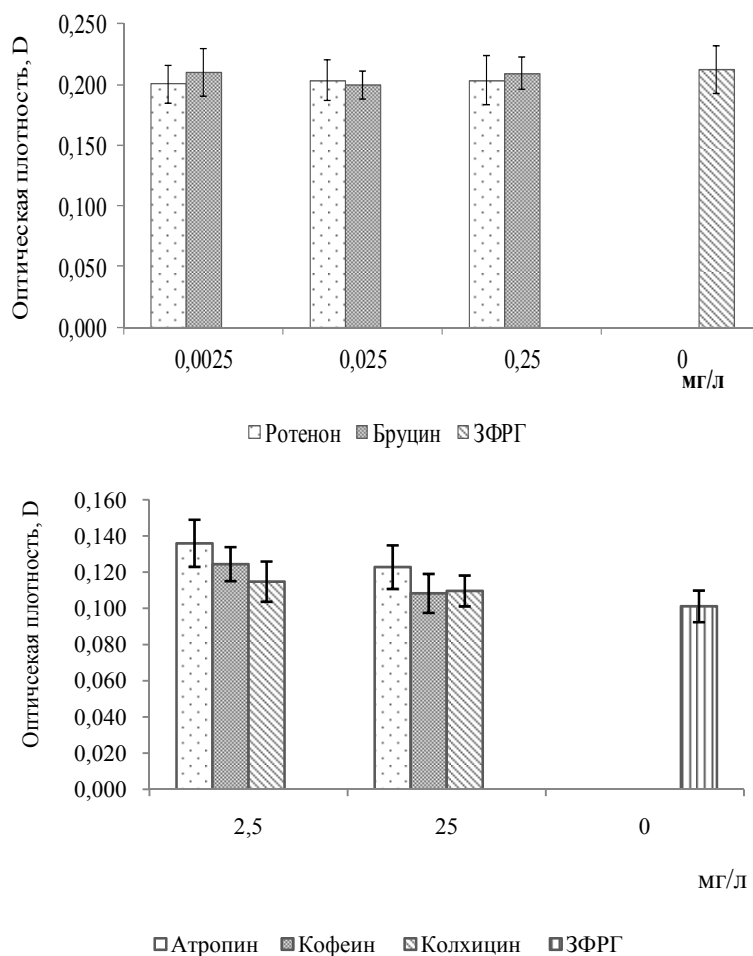
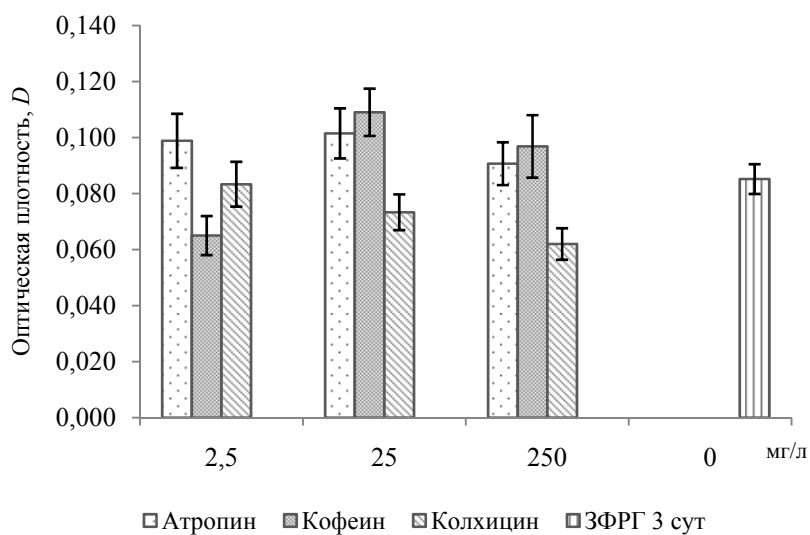


Рис. 1. Влияние алкалоидов и ротенона на биоупленкообразование *E. coli* XL-1 BLUE (3 сут инкубирования) D0 - исходная концентрация бактерий.

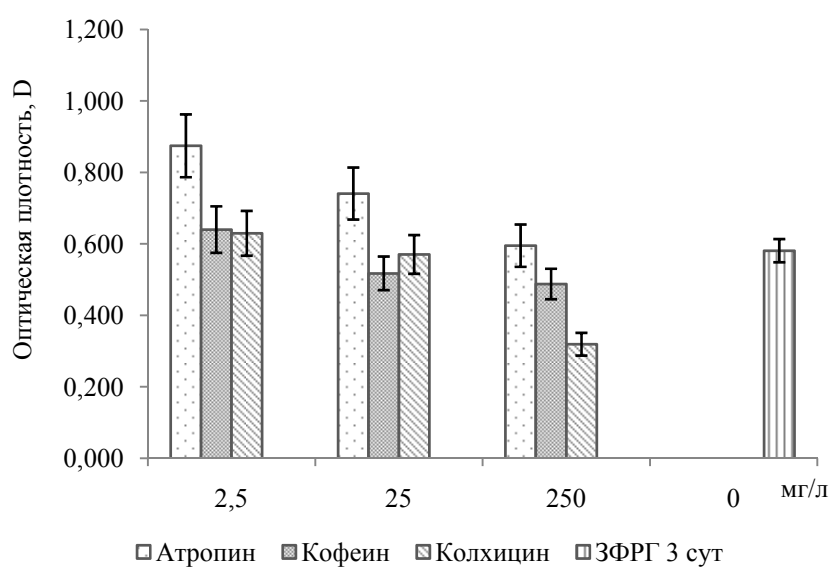
Установлено, что колхицин способствовал данному типу подвижности, о чем указывает размер колонии (рис. 3).

Таким образом, было показано, что колхицин в концентрации 250 мг/мл снижает биоупленкообразование как грамтрицательных (*P. carotovorum*), так и грамположительных (*Rhodococcus* sp.) бактерий. В то же время данное соединение способствует подвижности *Rhodococcus* sp. по типу сворминга. Данный алкалоид обладает антимиотическим действием за счет ингибирования процесса сборки веретена деления. Однако уже более 40 лет известен его эффект при лечении амилоидозов человека [Bhowmik et al., 2013]. В то же время, амилоиды являются важной составной частью матрикса биоупленок многих видов бактерий. Возможно, это свойство колхицина, объясняет его ингибирующее воздействие на процесс биоупленкообразования.

В работе была использована коллекция микроорганизмов «Биоресурсного центра СИФИБР СО РАН». Работа поддержана интеграционной программой «Фундаментальные исследования и прорывные технологии как основа опережающего развития Байкальского региона и его межрегиональных связей».



А



В

Рис. 2. Влияние атропина, кофеина и колхицина на биоленкообразование *P. carotovorum* (А) и *Rhodococcus* sp. (В) (3 сут. инкубирования) D_0 - исходная концентрация бактерий.

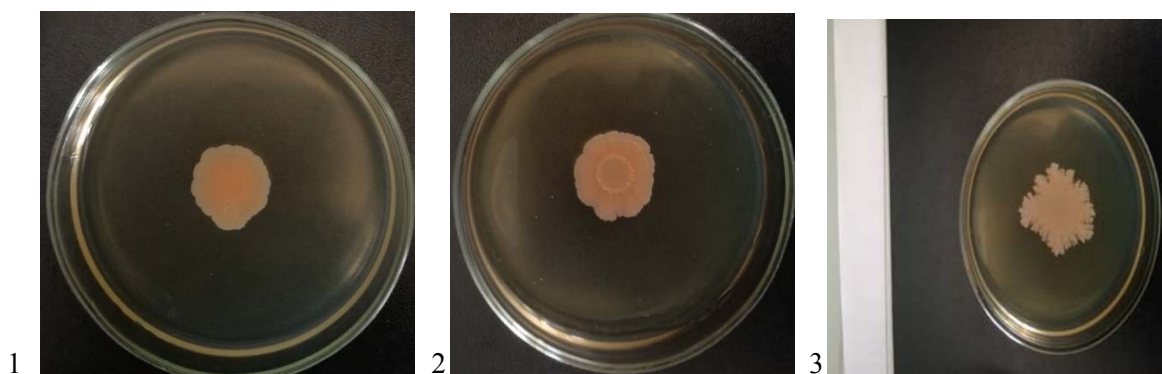


Рис. 3. Влияние атропина (1), кофеина (2) и колхицина (3)(1 г/л) на сворминг-подвижность *Rhodococcus* sp. через 7 сут. культивирования.

Литература

Bhowmik S., Khanna S., Srivastava K., Hasanain M., Sarkar J., Verma S., Batra S. An efficient combinatorial synthesis of allocolchicine analogues via a triple cascade reaction and their evaluation as inhibitors of insulin aggregation // *ChemMedChem*. – 2013. – V. 8, No. 11. – P. 1767–1772.

Kearns D.B. A field guide to bacterial swarming motility // *Nature Rev. Microbiol.* – 2010. – V. 8. – P. 634–644.

Oliveira N.M., Martinez-Garcia E., Xavier J., Durham W.M., Kolter R., Kim W., Foster K.R. Biofilm formation as a response to ecological competition // *PLoS Biol.* – 2015. – V. 13. – P. e1002191.

Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2015. – V. 34. – P. 877–886.

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF THE SERIES OF ALKALOIDS ON BIOFILM FORMATION BY BACTERIA OF DIFFERENT SPECIES

V.A. Bybin, A.L. Turskaya, L.A. Maksimova, Yu.A. Markova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, godolin@mail.ru

Abstract. The effect of biologically active compounds: rotenone, brucine, atropine, caffeine and colchicine on the biofilm formation and motility by the type of swarming by the species of bacteria *E. coli*, *P. carotovorum* and *Rhodococcus* sp. It was found that colchicine at a concentration of 250 mg/ml reduces biofilm formation of bacteria. At the same time, this compound promotes the swarming motility of *Rhodococcus* sp.

Keywords: *alkaloids, microorganisms, biofilm formation, swarming motility*

СОДЕРЖАНИЕ ФИТОГОРМОНОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИМБИОЗА РАСТЕНИЙ ФАСОЛИ РАЗНЫХ СОРТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ КОРНЕВИНА И РИЗОТОФИНА

О.Г. Волобуева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва, Россия, ovolobueva@list.ru

Аннотация. В условиях полевого опыта изучено влияние экзогенной обработки семян растений фасоли разных сортов Корневином и Ризоторфином на содержание, соотношение фитогормонов, эффективность симбиоза. Установлена сортовая реакция растений на обработку Корневином: наибольшей отзывчивостью характеризовался сорт Гелиада. У растений этого сорта происходило изменение гормонального баланса в сторону повышения ЦК/АБК, ГК+ЦК+ИУК/АБК – в листьях и корнях с клубеньками, что сопровождалось увеличением нитрогеназной активности.

Ключевые слова: фитогормоны, Корневин, Ризоторфин, эффективность симбиоза, нитрогеназа

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1210-1214

Важным элементом современных агротехнологий является применение регуляторов роста растений. В последние годы показана возможность повышения бобово-ризобияльного симбиоза путем сочетания обработки семян бобовых культур Ризоторфином и перспективными препаратами: Эпином-экстра, Альбитом и другими [Волобуева, 2011, 2013, 2015 а, б]. Известно, что экзогенные фиторегуляторы воздействуют на растения путем изменения в них уровня и соотношения фитогормонов [Курапов, 1996; Пузина и др., 2003; Якушкина, 2005].

Цель настоящей работы – изучение влияния Корневина и Ризоторфина на содержание и соотношение фитогормонов и листьях, стеблях, корнях с клубеньками и эффективность симбиоза.

Полевые опыты проводили во Всероссийском НИИ зернобобовых культур – ВНИИЗБК (Орловская область). Почва – темно-серая лесная среднесуглинистая, подстилаемая лессовидным суглинком, средней окультуренности (содержание гумуса по Тюрину – 5,4%, легкогидролизуемого азота по Коновой – 125 мг/кг почвы, подвижного фосфора – 195, обменного калия по Кирсанову – 179 мг/кг почвы; рН солевой вытяжки – 6, гидролитическая кислотность – 4,6 мг*экв/100 г почвы). Повторность опытов – 4-кратная, расположение вариантов рендомизированное, площадь делянки – 4-4,5 м².

Объектом исследования были растения зерновой фасоли сортов Гелиада и Шоколадница селекции ВНИИЗБК. Гелиада – сорт раннеспелый, детерминантного типа развития, стебель обычный, расположение боковых ветвей плотное, высокоурожайный, технологичный, характеризуется высокой завязываемостью бобов на растении и их озерненностью, а также низкой травмируемостью семян при обмолоте. Шоколадница – сорт среднеспелый, стебель детерминантный, устойчив к полеганию, характеризуется равномерным созреванием бобов на растении, высокой продуктивностью, компактным расположением боковых ветвей к главному стеблю, высоким прикреплением нижних бобов, быстрой разваримостью семян, устойчивостью к основным заболеваниям фасоли. Семена замачивали в течение 3 ч в растворе Корневина в концентрации 10⁻⁶, затем подсушивали, перед посевом обрабатывали Ризоторфином. Варианты опыта: 1 – контроль, без обработки, 2 – обработка семян Ризоторфином, 3 – обработка семян

Корневином на фоне инокуляции Ризоторфином. Ризоторфин (*R. leguminosarum* *bv.phaseoli*, штамм 700) получен из ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург).

Содержание фитогормонов (ИУК – индолилуксусная кислота, ЦК – цитокинины, АБК – абсцизовая кислота) в листьях, стеблях, корнях с клубеньками определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии по методике, разработанной в лаборатории регуляторов роста и развития сельскохозяйственных растений РГАУ-МСХА им. К.А.Тимирязева [Скоробогатова и др., 1999]; биологическую активность ГК (гибберелловая кислота) – по росту гипокотилей салата сорта Берлинский, их содержание – по калибровочной кривой, для построения которой использовали гибберелловую кислоту (Россия); содержание фитогормонов определяли в фазу цветения – период с наиболее высокой азотфиксирующей активностью у фасоли. Условия хроматографирования для определения фитогормонов изложены ранее [Волобуева и др., 2010]. Активность нитрогеназы в клубеньках определяли на газовом хроматографе «Цвет-106» [Орлов и др., 1984]. При статистической обработке результатов использовали программы Statistica for Microsoft Windows.

Содержание эндогенной ИУК у растений фасоли сорта Шоколадница при обработке Ризоторфином и Корневином на фоне инокуляции Ризоторфином колебалось в пределах 5,3-5,7 нг/г сырой массы в листьях и не менялось (13,2 г/сырой массы) в корнях с клубеньками (табл. 1). У сорта Гелиада при совместной обработке Корневином и Ризоторфином содержание ИУК возрастало в листьях и снижалось в корнях с клубеньками. При анализе ответной реакции на экзогенную обработку регуляторами роста необходимо учитывать, что согласно закону действующих масс, внесение конечного продукта реакции тормозит его образование [Якушкина, 1983; Пузина, 1999]. Возможно, с этим связано уменьшение эндогенной ИУК в корнях с клубеньками при экзогенной обработке Корневином. ИУК играет важную роль в процессе внедрения клубеньковых бактерий в корневые волоски бобового растения в процессе образования клубенька. Цитокинины, синтезируемые ризобиями, играют важную роль в пролиферации клубеньковой ткани [Hwang et al., 2006]. Содержание ЦК у растений фасоли сорта Гелиада при обработке Ризоторфином и Корневином на фоне инокуляции почти не менялось в стеблях (табл. 1). Совместная обработка Корневином и Ризоторфином приводила к значительному повышению содержания ЦК в листьях и корнях с клубеньками. У сорта Шоколадница содержание ЦК в листьях, стеблях и корнях с клубеньками при обработке Корневином на фоне инокуляции снижалось. Содержание ГК у растений фасоли сорта Гелиада при обработке Корневином на фоне инокуляции снижалось в листьях и корнях с клубеньками и повышалось в стеблях, а у сорта Шоколадница снижалось в листьях и значительно возрастало в стеблях и корнях с клубеньками. Обработка Корневином на фоне инокуляции повышала содержание АБК у растений фасоли сорта Гелиада в листьях и снижала в стеблях и корнях с клубеньками, а у сорта Шоколадница – возрастало в листьях, не менялось в стеблях и снижалось в корнях с клубеньками (табл. 1).

Анализируя изменение азотфиксирующей активности в клубеньках фасоли сорта Гелиада, необходимо отметить, что экзогенная обработка Корневином на фоне инокуляции Ризоторфином увеличивала количество и массу клубеньков, активность фермента нитрогеназы (табл. 2). Изменение этих показателей наблюдается на фоне увеличения эндогенной ИУК в листьях и стеблях, ЦК в листьях и корнях с клубеньками; ГК в стеблях; АБК – в листьях и на фоне снижения ИУК, ГК и АБК в корнях с клубеньками. У фасоли сорта Шоколадница экзогенная обработка Корневином снижала массу корней с клубеньками, количество и массу клубеньков, и активность нитрогеназы (табл. 2). Наблюдалась корреляция между количеством и

массой клубеньков и нитрогеназной активностью. В этот срок анализа значительно увеличивалось содержание ГК в стеблях и корнях с клубеньками и АБК в листьях, содержание же других гормонов снижалось или не изменялось.

Таблица 1.

Влияние Корневина и Ризоторфина на содержание фитогормонов в растениях фасоли сортов Гелиада и Шоколадница (нг/г сырой массы)

Вариант	Сорт	Орган растения	Фитогормоны			
			ИУК	ЦК	ГК	АБК
Контроль	Гелиада	1	3,4	56	–	0,3
		2	–	109	3,4	-
		3	6,7	15	–	5,7
	Шоколадница	1	3,7	121	–	0,3
		2	–	179	0,8	0,5
		3	7,2	143	0,3	0,4
Ризоторфин	Гелиада	1	5,3	116	6,9	10,3
		2	–	275	13,2	3,4
		3	13,3	31	21,1	20,6
	Шоколадница	1	5,7	272	4,7	10,3
		2	–	450	4,8	6,9
		3	13,2	217	4,7	10,3
Корневин+ Ризоторфин	Гелиада	1	11,7	527	–	22,1
		2	–	274	15,1	–
		3	5,3	233	–	8,6
	Шоколадница	1	5,3	223	–	13,8
		2	–	388	30,4	6,9
		3	13,2	109	28,8	6,9

Примечание. 1 – листья, 2 – стебли, 3 – корни с клубеньками; Прочерк – содержание гормона ниже уровня чувствительности хроматографа

Таблица 2.

Влияние Корневина и Ризоторфина на азотфиксирующую активность растений фасоли сортов Гелиада и Шоколадница

Вариант	Сорт	Показатель			
		Масса корней с клубеньками, г/раст	Количество клубеньков, шт./раст	Масса клубеньков, мг/раст	Активность нитрогеназы мкг/N/раст
Контроль	Гелиада	1,7±1,5	9,1±1,1	39±1,2	4,8±0,1
	Шоколадница	2,0±0,8	20±1,5	85±1,5	5,0±0,1
Ризоторфин	Гелиада	1,9±1,4	10±1,2	41±1,4	5,1±0,1
	Шоколадница	2,1±2,0	23±1,5	90±2,5	8,0±0,1
Корневин+ Ризоторфин	Гелиада	1,9±1,4	17±4,2	69±8,5	13.0±0,1
	Шоколадница	1,9±1,3	12±3,5	36±6,1	4,5±0,2

Таким образом, экзогенная обработка Корневином на фоне инокуляции Ризоторфином растений фасоли разных сортов привела к изменению уровня фитогормонов что, возможно, оказало влияние на нитрогеназную активность. Так, экзогенная обработка Корневином на фоне инокуляции увеличила нитрогеназную

активность растений фасоли сорта Гелиада на фоне увеличения в листьях – ИУК, ЦК, АБК; в стеблях – ИУК, ГК и корнях с клубеньками – ЦК и снижения в корнях с клубеньками – ИУК, ГК, АБК. У сорта фасоли Шоколадница экзогенная обработка Корневином на фоне инокуляции снижала нитрогеназную активность. Наивысшие показатели азотфиксирующей активности у растений этого сорта отмечены при обработке только Ризоторфином. При этом эндогенный уровень гормонов в растении под влиянием Ризоторфина изменялся следующим образом: увеличивается содержание ИУК в листьях, ЦК – в листьях, стеблях и корнях с клубеньками, ГК в листьях и корнях с клубеньками и АБК в корнях с клубеньками и не изменяется содержание ИУК в корнях с клубеньками; уменьшается ГК – в стеблях и корнях с клубеньками и АБК в листьях.

Литература

Волобуева О.Г. Влияние корневина на бобово-ризобиальный симбиоз // Ученые записки Орловского государственного университета. – 2011. – № 3 (41). – С. 124–129.

Волобуева О.Г. Влияние препарата Эпин-экстра на содержание фитогормонов в растениях сои разных сортов и эффективность симбиоза // Агрехимия. – 2015 а. – № 7. – С. 47–54.

Волобуева О.Г. Влияние препарата Эпин-экстра на содержание фитогормонов в растениях сои разных сортов и эффективность симбиоза // Агрехимия. – 2015 а. – № 7. – С. 47–54.

Волобуева О.Г. Эффективность инокуляции семян гороха различных сортов при обработке агростимулином // Ученые записки Орловского государственного университета. – 2013. – № 3 (53). – С. 153–158.

Волобуева О.Г. Эффективность инокуляции семян фасоли при обработке препаратом Эпин-экстра // Научно-производственный журнал «Зернобобовые и крупяные культуры». – 2015 б. – № 4 (16). – С. 42–47.

Волобуева О.Г., Скоробогатова И.В., Шильникова В.К. Влияние биопрепарата альбит на содержание фитогормонов в растениях фасоли разных сортов и эффективность симбиоза // Известия ТСХА. – 2010. – № 1. – С. 105–113.

Курапов П.Б. Гормональный баланс растений: Автореф. дис. ... докт.биол.наук. М., 1996. – 47 с.

Орлов В.П., Орлова И.Ф., Щербина Е.А., Гурьев Г.П., Васильчиков А.Г. Методика оценки активности симбиотической азотфиксации селекционного материала зернобобовых культур ацетиленовым методом. – Орел, 1984. – 15 с.

Пузина Т.И. Гормональная регуляция как основа целостности и продуктивности растительного организма: Дис. д-ра биол. наук. М., 1999. – 321 с.

Пузина Т.И., Король В.В., Прудников П.С. Особенности физиологического действия микроэлементов и регуляторов роста на элементы продукционного процесса растений картофеля // Рациональные технологии в современном сельскохозяйственном производстве. – Орел, 2003. – С. 21–28.

Скоробогатова И.В., Захарова Е.В., Карсункина Н.П., Курапов П.Б., Соркина Г.Л., Кислин Е.Н. Изменение содержания фитогормонов в проростках ячменя в онтогенезе и при внесении регуляторов, стимулирующих рост // Агрехимия. – 1999. – № 8. – С. 49–53.

Якушкина Н.И. Физиологические особенности гормональной регуляции роста растений на разных этапах онтогенеза в различных условиях среды // Влияние антропогенных факторов на функционирование биоценозов и их отдельные компоненты. – М.: МГОУ, 2005. – С. 5–42.

Якушкина Н.И. Энергетический обмен и рост растений // Особенности гормонального регулирования процессов обмена и темпов роста растений. – М.: Изд-во МОПИ, 1983. – С. 3–11.

Hwang I., Sakakibara H. Cytokinin biosynthesis and perception // *Physiol. Plant.* – 2006. – V. 126. – P. 528–539.

CONTENTS OF PHYTOGORMONES AND EFFICIENCY OF SIMBIOSIS OF PLANTS OF BEANS OF DIFFERENT VARIETIES UNDER INFLUENCE OF KORNEVIN AND RIZOTOFIN

O.G. Volobueva

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Russian Timiryazev State Agrarian University”, Moscow, Russia, *ovolobueva@list.ru*

Abstract. Under the conditions of field experiment, the influence of exogenous seed bean plants treatment of different varieties by Kornevin and Risotorfin on the content, phytohormones ratio, symbiosis efficiency was studied. The varietal reaction of plants to the treatment by Kornevin was established: the highest sensitivity was characterized by the variety of Geliad. In plants of this variety, the hormonal balance changed in the direction of the increase in CC/ABK, HK+CC+IUK/ABK – in leaves and roots with nodules, which was accompanied by an increase in nitrogenase activity.

Keywords: *phytohormones, Kornevin, Rhizotorphine, symbiosis efficiency, nitrogenase*

ИЗМЕНЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КЛУБЕНЬКОВ РАСТЕНИЙ ФАСОЛИ СОРТОВ ГЕЛИАДА И ШОКОЛАДНИЦА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭПИН-ЭКСТРА

О.Г. Волобуева¹, М.П. Мирошникова²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва, Россия, ovolobueva@list.ru

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур», Орёл, Россия

Аннотация. Электронномикроскопически установлено изменение ультраструктуры клубеньков растений фасоли сортов Гелиада и Шоколадница под влиянием Эпин-экстра. У растений фасоли сорта Гелиада наблюдалась наибольшая площадь симбиосом, включений волютина и их количество. У растений фасоли сорта Шоколадница наибольшая площадь, количество бактериодов и включений волютина отмечено в варианте с обработкой только Ризоторфином.

Ключевые слова: ультраструктура клубеньков, симбиосомы, бактериоды, волютин, фасоль

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1215-1218

В настоящее время в связи с ухудшающимися природно-климатическими условиями и экологической обстановкой, все более актуальным становится использование биопрепаратов и регуляторов роста антистрессорного действия [Колмыкова, Лукаткин, 2012]. Одним из таких препаратов является Эпин-экстра. Эпин-экстра – синтетический аналог брассиностероидов, действующее вещество эпибрассинолид (ЭПБ). Фитогормон широкого диапазона действия вызывает большой спектр клеточных ответов, включая рост растений, прорастание семян, фиксацию азота, повышение устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам [Хрипач и др., 1993; Будыкина и др., 2011, 2013; Sasse, 2003; Hasan et al., 2008]. Механизм действия связан с повышением активности ДНК и РНК-полимераз, влиянием на аминокислотный состав белков, а возможно, с влиянием на структурно-функциональные свойства клеточных мембран. Брассины стимулируют АТФ-азную активность, изменяют жирнокислотный состав липидной фракции мембран, активизируют протонный насос. Цель работы – изучение влияния предпосевной обработки семян препаратом Эпин-экстра и Ризоторфином на ультраструктуру клубеньков растений фасоли разных сортов. Полевые опыты проводили в ФГБНУ ВНИИ зернобобовых и крупяных культур (Орловская область).

Условия проведения опыта изложены ранее [Волобуева, 2015]. Для электронномикроскопических исследований фиксацию клубеньков в глютаральдегиде проводили по методу [Sabatini et al., 1963]. Срезы получили на ультрамикротоме «LKB-3» (LKB, Швеция), контрастировали 1%-ным водным раствором уранилацетата и 0,2%-ным цитратом свинца. Их просматривали под электронным микроскопом «TEMSCAN 100CX2» (JEOL, Япония). Морфометрические исследования провели на приборе «MOP-VIDEOPLAN» фирмы (Reichert, Австрия), статистическую обработку результатов – с использованием программы Statistica for Microsoft Windows.

Применив метод электронной микроскопии по изучению ультраструктуры клубеньков, удалось установить следующее. Изучение зрелой бактериодной ткани показало, что в клубеньках всех вариантов бактериодная зона была заполнена сформировавшимися бактериодами и бактериодами с сильно развитым перибактериодным пространством (ПБП). По данным И.Н. Андреевой [Андреева, 1989]

ПБП, как зона между макро- и микросимбионтом, ограниченная перибактероидной (ПБМ) или симбиосомной мембраной (СМ), играет важную роль в регуляции транспорта веществ и метаболизма формирующихся и функционирующих симбиосом. Ризобии в процессе образования клубенька превращаются в бактериоиды, которые вместе с окружающей их симбиосомной мембраной составляют симбиосому. В наших исследованиях ПБП было хорошо развито в варианте с обработкой Эпином-экстра у сорта Гелиада. В зависимости от периода развития симбиосом ПБП претерпевает существенные изменения, что проявляется в увеличении его объема, числа содержащихся в нем бактериоидов, наличии мембранно-фибриллярных структур. В процессе биогенеза СМ активно участвуют диктиосомы аппарата Гольджи и цистерны гранулярно эндоплазматического ретикулама растительной клетки. СМ представляет собой пограничную мембрану между микро- и макросимбионтами, создавая структурную и метаболическую компартментализацию за счет разделения всей симбиотической системы на три основные составляющие: цитоплазма растительной клетки (макросимбионта), ПБП, бактериоиды [Измайлов, 2014]. Помимо обязательных компонентов рибосом и внутриклеточных мембранных структур в клетках бактериоидов имеются непостоянные компоненты – гранулы включений волютина (В), гликогена, липидов, в частности поли- β -оксималяной кислоты (ПОМ). Волютин рассматривается как запасное вещество, подобное крахмалу, гликогену, жиру, как резерв неорганических фосфатов. Основную часть волютиновых гранул составляют полифосфаты. Волютин служит запасным резервуаром фосфата, важного предшественника в синтезе АТФ и ДНК. ПОМ – запасное вещество, эндогенный накопитель энергии и углерода для прокариот. Наличие этого эндогенного резерва определяет большую пластичность метаболизма ризобий в чистых культурах [Романов, 1977]. В.И. Романов [Романов и др., 1987] показали, что существует строгая обратная зависимость между интенсивностью азотфиксации и дыханием, с одной стороны, и содержанием ПОМ в бактериоидах, с другой. Обычно при активной азотфиксации содержание ПОМ в клетках бактерий минимально, поскольку синтез и распад ПОМ при этом наиболее интенсивны. Результаты наших исследований показали, что в вариантах обработки препаратом Эпин-экстра увеличивались площадь и количество бактериоидов, включений волютина и снижалась площадь и количество включений ПОМ у растений фасоли сорта Гелиада. У растений фасоли сорта Шоколадница в варианте с обработкой только Ризоторфином наблюдалось увеличение площади и количества бактериоидов и включений волютина и снижение площади и количества включений ПОМ (таблица). Азотфиксация, осуществляемая ризобиями, достаточно энергозатратный процесс, поэтому наличие гранул волютина можно рассматривать как один из возможных источников энергии этого процесса. Площадь и количество включений волютина было больше в тех вариантах, где наблюдали наибольшую азотфиксирующую активность в клубеньках растений фасоли, а депонирование ПОМ в клетках, обычно свидетельствует о невысоком уровне азотфиксации.

Таким образом, установлена сортовая реакция растений фасоли на обработку препаратом Эпин-экстра: наибольшей отзывчивостью характеризовался сорт фасоли Гелиада. У растений фасоли сорта Шоколадница в большей степени проявилось действие Ризоторфина. В клубеньках растений этого сорта наблюдалось увеличение площади и количества бактериоидов, площади и количества включений волютина. Площадь и количество ПОМ в этом варианте было минимальным. Наиболее активно процессы азотфиксации протекали в вариантах с большим количеством бактериоидов, с большим количеством и большей площадью гранул включений волютина. Содержание в клетках включений волютина и ПОМ может служить для некоторых видов ризобий дополнительной характеристикой активности симбиотической системы.

Таблица.

Изменение ультраструктуры клубеньков фасоли

Вариант	Площадь, мкм ²			Количество, шт		
	бактероиды	ПОМ	воллютин	бактероиды	ПОМ	воллютин
Гелиада, Ризоторфин	0,091±0,003	0,033± 0,002	0,014± 0,0002	4,28±0,14	1,62± 0,080	9,51±0,37
Гелиада, Эпин-экстра	0,47±0,017	0,023± 0,001	0,018± 0,0004	23,56±2,28	0,62± 0,100	10,41± 0,28
Шоколадница, Ризоторфин	0,56±0,028	0,023± 0,001	0,033± 0,0007	24,70±1,93	1,09± 0,056	9,08±0,37
Шоколадница, Эпин-экстра	0,54±0,013	0,031± 0,001	0,026± 0,0007	16,41±1,05	1,69± 0,055	6,10±0,22

Литература

Андреева И.Н. Структурно-функциональная организация взаимоотношений растительной клетки и эндофита в клубеньках бобовых и небобовых (актиноризных) растений /Дис. д-ра б. наук. – М., 1986. – 301 с.

Будыкина Н.П., Алексеева Т.Ф., Хилков Н.И. Действие препарата эпин-экстра на растения огурца в защищенном грунте // *Агрохимия*. – 2011. – № 1. – С. 28–34.

Будыкина Н.П., Шиббаева Т.Г., Титов А.Ф. Эффективность препарата Эпин-экстра при выращивании сладкого перца (*Capsicum annuum* L.) в защищенном грунте в условиях Северо-Запада России // *Агрохимия*. – 2013. – № 11. – С. 38–44.

Волобуева О.Г. Эффективность инокуляции семян фасоли при обработке препаратом Эпин-экстра // *Научно-производственный журнал «Зернобобовые и крупяные культуры»*. – 2015. – № 4 (16). – С. 42–47.

Измайлов С.Ф. Симбиосомная мембрана. – Москва: Наука, 2014. – 110 с.

Колмыкова Т.С., Лукаткин А.С. Эффективность регуляторов роста растений при действии абиотических стрессовых факторов // *Агрохимия*. – 2012. – № 1. – С. 83–94.

Романов В.И. Азотфиксация и метаболизм фотоассимилятов в клубеньках бобовых растений: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М: Ин-т биохимии им. А.Н Баха АН СССР, 1987. – 46 с.

Романов В.И. Физиологическая роль и метаболизм ПОМ у микроорганизмов // *Успехи биол. химии*. – 1977. – Т. 18. – С. 211–230.

Романов В.И., Четкова С.А., Тихонович И.А., Алисова С.М., Кретович В.Л. Азотфиксация у хлорофилльных мутантов гороха // *Доклады АН СССР*. – 1987. – Т. 294. – С. 1277–1280.

Хрипач В.А., Жабинский В.А., Лахвич Ф.А. Перспективы практического применения brassinosteroidов – нового класса фитогормонов // *Сельскохозяйственная биология*. – 1995. – № 1. – С. 3–11.

Hasan S.A., Nayat S., Ali B., Ahmad A. 28-homobrassinolide protects chickpea (*cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants // *Environ Pollut.* – 2008. – V. 151. – P. 60–66.

Sabatini D.D., Bensch R., Barnett R.J. Cytochemistry and electron microscopy the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation // *J. Cell. Biol.* – 1963. – V.1. – No. 1. – P. 16–58.

Sasse J.M. Physiological actions of brassinosteroids: an update // *J. Plant Growth Regul.* – 2003. – V. 22. – P. 276–288.

**CHANGE IN THE ULTRASTRUCTURE OF NODULES IN BEAN PLANTS
VARIETIES GELIADA AND CHOKOLADNITSA,
UNDER THE INFLUENCE OF EPIN-EXTRA**

O.G. Volobueva¹, M.P. Miroshnikova²

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Russian Timiryazev State Agrarian University”, Moscow, Russia, *ovolobueva@list.ru*

²The All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops, Orel, Russia

Abstract. Electron microscopy revealed a change in the ultrastructure of nodule plants of Goliad and Chokoladnitsa bean cultivars under the influence of Epin-extra. The largest area of symbiosis, volutin inclusions and their number were observed in the plants of the Geliad bean plant. In the plants of the bean variety, Chokoladnitsa, the largest area, the number of bacteroides and volutin inclusions was noted in the variant with treatment with only Risotorfin.

Keywords: *ultrastructure of nodules, symbiosomes, bacteroids, volute, beans*

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХРОМОВ P450 ПОДСЕМЕЙСТВА CYP74C

С.С. Горина, Е.О. Смирнова, В.С. Фатыхова, Т.М. Ильина, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия, gsvetlana87@gmail.com

Аннотация. Представлены данные по характеристике бифункциональных ферментов подсемейства CYP74C и их мутантных форм.

Ключевые слова: оксипирины, подсемейство CYP74C, эпоксиалкогольсинтазы, гидропероксидлиазы, сайт-направленный мутагенез

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1219-1221

Окисленные производные жирных кислот – оксипирины – представляют собой важный класс сигнальных молекул, участвующих в ответных реакциях на механическое повреждение, воздействие патогенов и факторов окружающей среды. Помимо этого, оксипирины принимают участие в процессах роста и развития растения, регулируют рост корней и процессы старения. Оксипирины образуются в рамках липоксигеназного каскада, где ключевая роль принадлежит цитохромам P450 семейства CYP74 [Grchkin, 1998; Brash, 2009], на этапе функционирования которых происходит разделение пути на несколько ветвей: алленоксидсинтазную (АОС), гидропероксидлиазную (ГПЛ), дивинилэфирсинтазную (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазную (ЭАС), получивших свое название по ферментам, катализирующим превращение гидроперекисей жирных кислот в соответствующие метаболиты. Показано, что жасмоновая кислота (продукт АОС ветви) участвует в перекрестных взаимодействиях с салициловой и абсцизовой кислотами, обеспечивая индукцию защитных реакций растительного организма. Летучие метаболиты ГПЛ ветви являются сигналами взаимодействия растения с насекомыми, а C12- и ω-оксокислоты участвуют в заживлении ран.

Объектами данного исследования являются шесть предполагаемых 9/13-специфичных ГПЛ подсемейства CYP74C: CYP74C1_CS и CYP74C31 (*Cucumis sativus*) CYP74C4_ST (*Solanum tuberosum*), CYP74C2 (*Cucumis melo*), CYP74C13_GM (*Glycine max*) и CYP74C13_MT (*Medicago truncatula*). Все рекомбинантные ферменты в зависимости от используемого субстрата наряду с продуктами ГПЛ продуцируют продукты ЭАС. Ферменты CYP74C4_ST, CYP74C2, CYP74C31 и CYP74C13_MT в основном участвуют в биосинтезе продуктов ГПЛ из 13-гидроперекиси линолевой кислоты, тогда как CYP74C13_GM производит сопоставимые количества продуктов 13-ГПЛ и 13-ЭАС, а CYP74C1_CS обладает преимущественно активностью 13-ЭАС. Большинство ферментов преобразуют 13-гидроперекись альфа-линоленовой кислоты в продукты 13-ГПЛ. Все ферменты по отношению к 9-гидроперекисямобладают преимущественно 9-ЭАС активностью [Топоркова et al., 2018]. Продукты идентифицированы по данным ГХ-МС и ЯМР. Кроме того, были получены мутантные формы с заменами в каталитически важных доменах (I-спираль, «F/Ltoggle»), которые проявляли частичную или практически полную активность АОС.

Таким образом, результаты настоящей работы демонстрируют, что описанные ранее 9/13-ГПЛ подсемейства CYP74C помимо ГПЛ активности обладают активностью ЭАС. В зависимости от субстрата эти ферменты участвуют в образовании продуктов, которые в основном относятся к продуктам ГПЛ и ЭАС.

Кроме того, в настоящем исследовании впервые проведено превращение бифункциональных ферментов ГПЛ/ЭАС в АОС путем сайт-направленного мутагенеза.

	*		123456▼
CsAOS (145)	KVEK	KDLFTGTYMPVT	(317) RLGTSREEA
GmAOS (131)	KVEK	KDVFTGTFMPST	(303) RLGITRDEA
HbAOS (137)	KVEK	KDLFTGTFMPST	(309) KMGTSREEA
HnAOS (111)	KVEK	KDLFTGTFMPST	(283) KLGTSRDEA
LjAOS (140)	KVDK	TDVFTGTFMPST	(312) RLGVSRDEA
AtAOS (130)	KVEK	KDLFTGTYMPST	(302) KLGTSREEA
LeAOS2 (124)	KVEK	KDLFTGTFVPSV	(296) KLGTSKDEA
CYP74C13_MT (90)	KVEK	RDVLDGTFMPST	(296) KLGTSKDEA
CYP74C13_Gm (86)	KVDK	RDVLDGTFMPST	(262) RVGIKRDEA
CYP74C4_ST (102)	KVEK	KNVLDGTFMPST	(278) KSGIKRDEA
CYP74C1_CS (86)	KVEK	RNLDGTYMPST	(261) KQSIDREKA
CYP74C2 (89)	KVEK	RNLDGTYMPST	(264) KQSIDREKA
CYP74C31 (91)	KVEK	RNLDGTYMPST	(265) KQGINREKA
LeHPL (97)	IVEK	ANLVGDFFMPST	(271) EFQLTREQE
CjHPL (120)	IVEK	ANLVGDFFMPST	(294) EFGLTREQE
NtHPL (115)	IVEK	ANLVGDFFMPST	(289) EFGLTREQE
AtHPL (111)	LVDK	RDVLDGTFRPSL	(286) EFRLTRDEA
PgHPL (112)	IVEK	SNVLDGFFMPST	(286) EFGLTREQE
LuDES (95)	IADK	KDTLLGDFMPST	(270) EYGLTREQE

Рисунок. Множественное выравнивание частичных последовательностей ферментов CYP74. Показаны последовательности CPC-1 и I-спирали. ГСД домен пронумерован 1-6, первый глицин после него отмечен символом ▼, «F/L toggle» отмечен звездочкой. Для выравнивания использовались следующие последовательности ферментов CYP74: At, *A. thaliana*; AtAOS, AED94842.1; AtHPL, AAC69871; Cj, *Citrus jambhiri*; CjHPL, BAC55161.1; Cs, *C. sativus*; CsAOS, NP_001274390; CsHPL/EAS, CYP74C1_CS, NP_001274399; CsHPL/EAS/AOS, CYP74C31, XP_004137005; Cm, *C. melo*; CmHPL/EAS, CYP74C2, NP_001284390.1; Gm, *G. max*; GmAOS, NP_001236445; GmHPL/EAS, CYP74C13_GM, KRH29541.1; Hb, *Hevea brasiliensis*; HbAOS, AAŸ27751; Hn, *Nyoscyamus niger*, HnAOS, ABS50433; Le, *L. esculentum*; LeAOS2, NP_001274707; LeHPL, CAB43022.1; Lj, *Lotus japonicus*; LjAOS, BAJ78216; Mt., *M. truncatula*; MthPL/EAS, CYP74C13_MT, CAC86897; Nt, *Nicotiana tabacum*; NtHPL, AAZ39884; Pg, *P. guajava*; PgHPL, AF239670.1; St, *S. tuberosum*; StHPL/EAS, CYP74C4_ST, XP_006365486.1.

Для этого было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ферментов CYP74 (рисунок). На основе этого были выявлены предполагаемые сайты в каталитически важных доменах, а именно – в первом субстрат-распознающем сайте (CPC) (сайте, называемом «F/L toggle») и гидропероксид-связывающем домене (ГСД), расположенном в CPC-4 [Gotoh O., 1998]. На основе проведенного анализа были получены следующие мутантные формы рекомбинантных ферментов: CYP74C1_CS G283A, CYP74C31 A287G, CYP74C1_CS L93F, CYP74C31 L98F, а также соответствующие двойные мутанты. Все полученные мутантные формы ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 обладают главным образом активностью АОС при использовании с 9-ГПОД и 9-ГПОТ в качестве субстратов. В случае 13-ГПОТ, все мутантные формы обладают преимущественно активностью ГПЛ. Исключением являются мутантные формы CYP74C1_CS L93F и CYP74C1_CS G283A/L93F. Первая из них катализирует конверсию 13-ГПОТ в альфа-кетол (АОС продукт), а вторая производит примерно равные количества продуктов ГПЛ и АОС. Другая ситуация наблюдается в случае 13-ГПОД. Оба рекомбинантных фермента с мутацией в домене ГСД, а также мутантная форма CYP74C31 A287G/L98F обладают в основном активностью ГПЛ [Тороркова et al., 2018]. Анализ продуктов реакции проводили методом ГХ-МС и ЯМР. Полученные данные указывают на тесную связь катализа ферментов CYP74 и то, что тип катализа может быть изменен с помощью сайт-направленного мутагенеза.

Исследования ферментов CYP74C13_MT и CYP74C13_GM проводились при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-10286).

Исследования ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 были поддержаны грантом РФФИ 16-34-60231-мол_а_дк. Исследования фермента CYP74C2 были поддержаны грантом МК-2873.2017.4. Эксперименты по сайт-направленному мутагенезу были поддержаны грантом РФФИ 18-04-00508_а.

Литература

Brash A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes // *Phytochemistry*. – 2009. – V. 70, No.13-14. – P. 1522–1531.

Gotoh O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 Family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. // *The Journal of biological chemistry*. – 1992. – V. 267. – P. 83–90.

Grechkin A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway // *Prog Lipid Res*. – 1998. – V. 37, No. 5. – P. 317–352.

Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Bessolitsyna E.K., Smirnova E.O., Fatykhova V.S., Brühlmann F., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Double function hydroperoxide lyases / epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis. // *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2018. – V. 1863 (4). – P. 369–378.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CYTOCHROMES P450 CYP74B SUBFAMILY

S.S. Gorina, E.K. Bessolitsyna, E.O. Smirnova, V.S. Fatykhova, T.M. Ilyina,
Y.Y. Toporkova, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin

The Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics is a separate structural subdivision of the Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Kazan, gsvetlana87@gmail.com

Abstract. This paper presents data on the characteristics of double function enzymes of the CYP74C subfamily and their mutant forms.

Keywords: *oxylipins, cytochrome P450, CYP74C subfamily enzymes, epoxyalcohol synthase, hydroperoxidelyase, site-directed mutagenesis*

РЕГУЛЯЦИЯ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА МИЦЕЛИЯ *INONOTUS RHEADES* ПОД ДЕЙСТВИЕМ СВЕТА

Т.Г. Горностай¹, Ю.Б. Захаров², Г.Б. Боровский¹, Д.Н. Оленников³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, t.g.gornostay@yandex.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систем энергетики им. Л.А. Мелентьева Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, contain@mail.ru

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Улан-Удэ, Россия, olennikovdn@mail.ru

Аннотация. Выявлена регуляция химического состава с использованием искусственного освещения при культивировании мицелия *Inonotus rheades*. Свет оказывал воздействие на синтез лупановых тритерпенов, стирилпиранов и полисахаридов мицелия *I. rheades*.

Ключевые слова: *Inonotus rheades*, мицелий, регуляция светом, лупановые тритерпены, стирилпираны, полисахариды

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1222-1224

Свет является определяющим фактором в жизнедеятельности нефотосинтезирующих организмов, в частности грибов. Свет оказывает непосредственное воздействие на морфологию, физиологию и биохимию грибов [Tisch, Schmoll, 2010]. Выявлено влияние света на рост и выход биомассы при культивировании мицелия и плодовых тел грибов [Поединок и др., 2007; Poyedinok et al., 2008; Wang et al., 2011; Mei et al., 2013], исследование химического состава показало регуляцию биосинтеза полисахаридов [Poyedinok et al., 2008; Hao et al., 2010; Mei et al., 2013], пигментов [Поединок и др., 2007; Glukhova et al., 2014], отмечено изменение биологической активности [Поединок и др., 2007; Hu et al., 2013].

Однако, несмотря на достаточный объем знаний в этой области, до сих пор не выявлено общих закономерностей ответных реакций грибов на воздействие света, что затрудняет работы по регуляции химического состава и требует осуществления подбора параметров индивидуально для каждого объекта. Таким образом, исследование влияния световых параметров на химический состав перспективных грибных объектов является актуальным. Ранее нами для мицелия и плодовых тел *Inonotus rheades* показано наличие выраженной антиоксидантной, бактериальной [Горностай и др., 2014], гликозидазной [Olennikov et al., 2017] активностей. В связи с этим целью исследования явилось изучение влияния света на химический состав мицелия *I. rheades*.

В работе был использован мицелий *I. rheades* штамм 0186, выращивание которого вели в стерильных камерах на древесных дисках *Betula pendula* при температуре 25 °С и различных условиях освещения (темнота/свет, разные диапазоны длины волн света – красный (625-630 нм), желтый (590-595 нм), зеленый (525-530 нм), синий (465-470 нм). В качестве источника освещения использовали цветные и белые (холодный белый) высокоэффективные трехкристальные светодиоды SMD-5050 (Рубикон, Барнаул, Россия). Мощность светового потока синего, зеленого и белого составляла 12,88 Вт/м², красного, желтого 8,5 Вт/м².

Анализировали химический состав фракций (Iг-01 – гексановой, Iг-03 – этилацетатной и Iг-05 – водной), полученных в ходе дробной экстракции чистой мицелиальной массы *I. rheades*.

Химический анализ проводили с применением УФ-, ИК-, МС-, ЯМР-спектроскопии, а также ВЭЖХ.

Из гексановой фракции Iг-01 было идентифицировано три стерола (инотодиол, ланостерол, эргостерол пероксид) и шесть лупановых тритерпеноидов (бетулин, бетулиновая кислота, бетулон, бетулоновая кислота, бетулоновый альдегид, бетулиновый альдегид). Выявлен светозависимый синтез для мажорных лупановых терпеноидов – бетулина, бетулиновой кислоты и лупеола. Наибольшее количество бетулина в мицелии *I. rheades* накапливается под действием синего света, бетулиновой кислоты при облучении желтым светом, а лупеола при облучении красным светом.

В этилацетатной фракции Iг-03 мицелия *I. rheades* было обнаружено шесть стирилпиронов (транс- и цис-гиспидин, феллинины А1 и А2, транс-биснорянгонин, цис-биснорянгонин) и пять бис(стирилпиронов) (3,14'-бисгиспидинил, гифоломин В, 3-биснорянгонил-14'-гиспидин, 1,1-дистирилпирилэтан и реадинин). Согласно полученным данным доминирующим компонентом в составе был гиспидин, составляющий 2,33 мг/г от массы мицелия. Показан светозависимый синтез стирилпиронов в мицелии *I. rheades*, наибольшее количество которых выявлено в мицелии, культивированном под воздействием синего света. Наблюдалось уменьшение количества стирилпиронов в мицелии при смещении освещения от синей к красной части спектра. Накопление стирилпиронов отсутствовало в темноте.

Водная фракция Iг-05 характеризовалась преимущественным содержанием водорастворимых полисахаридов (ВРПС). Iг-05 содержала 5 мажорных компонентов Iг-05ПС-1 – Iг-05ПС-5. Для мицелия *I. rheades* оказался характерен светозависимый характер биосинтеза полисахаридов, при переходе от красного к синему типу света в ВРПС снижалось содержание фукозы и ксилозы, при этом концентрация маннозы и кислых моносахаридов повышалась.

Таким образом, использование искусственного света при культивировании мицелия *I. rheades* дает возможность регуляции его химического состава для получения биологического материала с заданными свойствами, а также получения целевых веществ.

Работа выполнена с использованием коллекций ЦКП «Биоресурсный Центр» СИФИБР СО РАН и приборов ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

Горноста́й Т.Г., Чхенкели В.А., Пензина Т.А., Полякова М.С., Боровский Г.Б. Изучение антирадикальной и антимикробной активности водно-спиртовых экстрактов плодовых тел и мицелия *Inonotus rheades* (Pers.) Bondartsev & Singer // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2014. – № 5 (99). – С.76–79.

Поединок Н.Л., Ефременкова О.В., Михайлова О.Б., Негрейко А.М. Биосинтетическая активность некоторых высших лекарственных грибов после световых воздействий // Успехи медицинской микологии. – 2007. – Т. 9. – С. 176–178.

Glukhova L.B., Sokolyanskaya L.O., Plotnikov E.V., Gerasimchuk A.L., Karnachuk O.V., Solioz M., Karnachuk R.A. Increased mycelial biomass production by *Lentinula edodes* intermittently illuminated by green light emitting diodes // Biotechnol. Lett. – 2014. – V. 36. – P. 2283–2289.

Hao J. Chen X., Lan J. Effect of light quality on growth and polysaccharides content of *Ganoderma lucidum* // China J. Chinese Mat. Medica. – 2010. – V. 35, I. 17. – P. 2242–2245.

Hu S.H., Wu C.Y., Chen Y.K., Wang J.C., Chang S.J. Effect of light and atmosphere on the cultivation of the golden oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus citrinopileatus* (higher Basidiomycetes) // Int. J. Med. Mushrooms. – 2013. – V. 15, I. 1. – P. 101–111.

Mei X.L., Zhao Z., Chen X.D., Lan J. Light quality regulation of growth and endogenous IAA metabolism of *Ganoderma lucidum* mycelium // China J. Chin. Mater. Med. – 2013. – V.12. – P. 1887–1892.

Olennikov D.N., Gornostay T.G., Penzina T.A., Borovskii G.B. Lupane triterpenoids and sterols from *Inonotus rheades* mycelium and its antiglycosidase activity // Chemistry of Natural Compounds. – 2017. – V. 53, I. 5. – P. 841–842.

Poyedinok N.L., Mykhailova O.B., Shcherba V.V., Buchalo A.S., Negriyko A.M. Light regulation of growth and biosynthetic activity of ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae), in pure culture // Int. J. Med. Mushrooms. – 2008. – V.10, I. 4. – P. 369–377.

Tisch D., Schmoll M. Light regulation of metabolic pathways in fungi // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 85 – P. 1259–1277.

Wang L., Chen X., Wang Q., Hao J., Lan J. Effect of different light of LED light quality on growth and antioxidant enzyme activities of *Ganoderma lucidum* // China J. Chin. Mater. Med. – 2011. – V. 36, I. 18. – P. 2471–2474.

REGULATION OF CHEMICAL COMPOSITION OF MICELIA *INONOTUS RHEADES* UNDER THE ACTION OF LIGHT

T.G. Gornostai¹, Y.B. Zaharov², G.B. Borovskii¹, D.N. Olennikov³

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, t.g.gornostay@yandex.ru

²Energy Systems Institute L.A. Melentyeva SB RAS, Irkutsk, Russia, contain@mail.ru

³Institute of General and Experimental Biology of the Siberian Branch of the RAS, Ulan-Ude, Russia, olennikovdn@mail.ru

Abstract. Using artificial illumination, the regulation of the chemical composition in the cultivation of the mycelium *Inonotus rheades* was revealed. Light influenced the synthesis of lupane triterpenes, styrylpyrones and polysaccharides in mycelium *I. rheades*.

Keywords: *Inonotus rheades*, mycelium, light regulation, lupane triterpenes, styrylpyrones, polysaccharides

АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ

И.А. Граскова¹, А.И. Перфильева¹, И.В. Клименков², Б.Г. Сухов³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, graskova@sifibr.irk.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

Аннотация. Синтезированы нанокomпозиты с содержанием селена и серебра, инкапсулированные в различные биогенные матрицы (арабиногалактан, крахмал, гуминовые кислоты). Изучено влияние этих нанокomпозитов на жизнеспособность бактериального фитопатогена картофеля *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Показано, что исследуемые нанокomпозиты обладают бактерицидным эффектом и отсутствием негативного влияния на растения картофеля.

Ключевые слова: нанокomпозиты, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, картофель
DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1225-1228

Различные заболевания культурных растений, большинство из которых вызываются патогенными грибами и бактериями, широко распространены в современном растениеводстве. Бактерии р. *Clavibacter* поражают широкий круг культурных и сорных растений. Одним из представителей этого рода является *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) – возбудитель кольцевой гнили картофеля, и на сегодняшний день не существует эффективных способов борьбы с ним. Более того, в настоящее время отсутствуют химические и биологические агенты, способные ограничивать распространение бактериальных болезней картофеля. Необходимо разработать эффективные против бактерий и безопасные для растений агенты для оздоровления картофеля от фитопатогенной грамположительной бактерии *Cms* с применением препаратов на основе природных соединений.

Развитие нанотехнологий позволяет внедрять во многие сферы человеческой деятельности – медицину, сельское хозяйство и пищевую промышленность инновационные материалы, но, в целом, в фитопатологии нанокomпозитные материалы практически не применяются.

В настоящей работе продемонстрирован экологически безопасный способ оздоровления картофеля от бактериальных патогенов с помощью разработанных нами нанокomпозитов и выявлено их влияние на жизнеспособность бактерий *Cms* и биометрические показатели картофеля *in vitro*.

Исследования проводили на бактериях *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* штамм Ас-1405, полученного из Всероссийской коллекции микроорганизмов, г. Пущино. Для изучения бактериостатической активности использовали метод измерения оптической плотности бактериальной суспензии.

Синтез нанокomпозита селен/крахмал (НК Se/K) проводили из крахмала с добавлением H_2SeO_3 . Синтез нанокomпозита селен/арабиногалактан проводили из арабиногалактана и SeO_2 . Синтез нанокomпозитов гуминовые вещества/серебро проводили из гуминовых веществ (ГВ), которые выделяли щелочной экстракцией из объектов монгольских месторождений: ГВ-гр – из грязей озера Гурван Нуур, ГВ-уг – из бурых углей Багануур, а также ГВ-уг – из сланцевых месторождений.

Исследования проводили с помощью просвечивающего электронного микроскопа LEO 906E (Carl Zeiss, Германия), электронного сканирующего микроскопа FEI Company Quanta 200. Структурные особенности поверхности бактериальных клеток определяли на сканирующем зондовом микроскопе (СЗМ) «СММ-2000», Зеленоград (Москва). Изображения получены в АСМ-режиме (атомно-силовом режиме) с использованием сверхострых и сверхмягких зондов модели MSNL-10 фирмы Bruker (номинальный радиус закругления зонда 2 нм). Полученные фотографии обрабатывали в программе «Scan master» версии 6.7.02 и «Gwyddion» версии 2.38.

Наноккомпозит арабиногалактан/селен. Наноккомпозит представляет собой красно-оранжевый порошок, хорошо растворимый в воде. Селеновые наночастицы хорошо визуализируются в просвечивающем электронном микроскопе и имеют форму, близкую к сферической, а также достаточно узкое размерное распределение (50-80 нм).

При совместном культивировании бактериального патогена с наноккомпозитом селен/арабиногалактан, а также его предшественников – чистый арабиногалактан и диоксид селена, было показано, что арабиногалактан не влияет на жизнеспособность бактерий. Диоксид селена подавлял рост суспензионных клеток патогена, а при добавлении наноккомпозита наблюдали наиболее выраженное подавление роста бактерий. Спустя 24 часа инкубации, бактериальные клетки изменяли свои размеры (например, длина уменьшалась в 2.5 раза) и слипались. По-видимому, наноккомпозит способен изменять мембранную проницаемость клеток бактерий, в результате чего наблюдается изменение размеров микробных клеток.

Также было изучено влияние наноккомпозита селен/арабиногалактан на растения картофеля *in vitro*. В качестве физиолого-биохимических параметров состояния растений использовали активность гваякол-зависимой пероксидазы и скорость прироста. Пероксидаза является маркером стрессового состояния растений, ее активность и изоферментный состав быстро изменяются при любом воздействии на растение. В контрольных растениях активность пероксидазы не изменялась и отмечался высокий прирост побегов. В варианте с добавлением арабиногалактана наблюдали незначительное повышение активности пероксидазы и постоянный прирост побегов. Добавление диоксида селена снизило активность пероксидазы и сильно подавляло рост побегов. В варианте с наноккомпозитом было отмечено незначительное стимулирование активности пероксидазы, прирост растений был на уровне контроля. Исследования влияния наноккомпозита арабиногалактан/селен демонстрируют наличие у него выраженного бактерицидного эффекта и отсутствие негативного влияния на рост и развитие растения.

Наноккомпозит крахмал/селен. Крахмал является самым распространенным углеводом. Структурные элементы этого полимерного соединения – молекулы глюкозы – могут использоваться многими микроорганизмами в пищевой цепочке. В процессе ассимиляции происходит усвоение питательных веществ и использование их для синтеза клеточных структур. В процессе диссимиляции питательные вещества разлагаются и окисляются, при этом выделяется энергия, необходимая для жизни микробной клетки. Поэтому была синтезирована антисептическая наноккомпозитная субстанция, у которой эффективные антимикробные свойства могут задаваться как наночастицами, так и трофическим для бактерий крахмалом, входящим в состав наноккомпозита.

Были получены наноккомпозиты, состоящие из наночастиц селена, упакованных в матрицу из крахмала (НК Se/K). С использованием просвечивающего электронного микроскопа было выявлено, что наночастицы селена Se(0) хорошо визуализируются и имеют форму, близкую к сферической. Размер наночастиц НК Se/K составлял 20-90 нм, средний размер – 40 нм. О способности наноккомпозита селена подавлять

жизнеспособность фитопатогенной бактерии *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) судили по бактерицидному и бактериостатическому эффектам. Предшественник нанокompозитов селена – БИС характеризовался бактериостатическим эффектом. Крахмал стимулировал рост бактериальной культуры. Нанокompозит снижал жизнеспособность клеток примерно в 2 раза.

При использовании красителя пропидий иодида, окрашивающего мертвые клетки, с применением просвечивающей электронной микроскопии были получены следующие результаты, свидетельствующие о наличии у нанокompозита селена (Se/K) бактерицидного эффекта: в вариантах с нанокompозитами больше мертвых клеток по сравнению с контролем (без нанокompозитов). Высокое количество мертвых клеток (от 33% до 59 % в поле зрения ПЭМ) наблюдалось при инкубации бактерий с нанокompозитом с матрицей крахмала, содержащей селен (12%).

Статистическая обработка полученных результатов выявила, что при инкубации бактерий с нанокompозитом селена длина бактериальных клеток, по сравнению с контролем, значительно уменьшалась, а ширина увеличивалась на 9-22%. Выявленные изменения морфологии клеток свидетельствуют о наличии неблагоприятных условий для бактерии, вероятно, при этом происходит нарушение осмотического статуса клетки, она меняет свою морфологию, превращаясь в менее вытянутую структуру.

Наблюдаемый эффект снижения прироста бактерий и изменение их морфологии после инкубации с нанокompозитами, вероятно, связан с локальными деструктивными изменениями клеточной стенки бактерий. Было показано изменение жирно-кислотного состава бактерий после инкубации с нанокompозитами селена и арабиногалактана, при этом наблюдалось увеличение количества насыщенных жирных кислот. Такое изменение приводит к нарушению жидкостно-кристаллических свойств клеточных мембран бактерий, что, в свою очередь, может менять способность бактериальных клеток к агрегации, изменять их форму и даже приводить к разрушению клеточных мембран и гибели бактерий. Также более подробные исследования с использованием электронной микроскопии позволили нам обнаружить факт прикрепления наночастиц к поверхности бактериальной клетки, что, вероятно, приводит к нарушению ее окислительно-восстановительного потенциала.

В естественных условиях бактерии обычно испытывают недостаток питательных веществ, поэтому возможно применение изученного нанокompозита как носителя с адресной доставкой частиц селена, при использовании которых бактериями в качестве питательного средства впоследствии происходит нарушение их жизнедеятельности и гибель бактериального патогена. Результаты визуализации взаимодействия микробных клеток и НКSe позволяют предположить, что механизм действия нанокompозита на бактериальные клетки связан с изменением их мембранной проницаемости.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии у нанокompозита селена с крахмальной матрицей бактерицидных и бактериостатических свойств в отношении кольцевой гнили картофеля, вызываемой *Cms*. Представленные данные свидетельствуют о возможности использования нанокompозита с наночастицами селена для обработки культурных растений против бактериальных заболеваний.

Гуминовые вещества/серебро. Гуминовые вещества выбраны в качестве матриц для наночастиц серебра, поскольку они представляют собой основной органический почвенный компонент, который также является первичным метаболитом для большинства микробов, находящихся в почве. Гуминовые вещества (ГВ) выделяли щелочной экстракцией из объектов монгольских месторождений: ГВ-гр – из грязей озера Гурван-Нуур, ГВ-уг – из бурых углей Багануур, а также ГВ-уг – из сланцевых месторождений. Серебро и НЧ серебра являются эксклюзивным антимикробным агентом, и мы подтвердили, что AgNO_3 не только значительно подавлял рост бактерий

Sms, но и негативно влиял на биометрические показатели растений. Для устранения этого негативного влияния использовали НК с НЧ серебра в матрицах различных по происхождению ГВ. Полученные результаты позволили выявить, что ГВ-гр способны стимулировать рост бактерий. Установлены максимально эффективные ингибирующие наноконпозиты – это НК ГВ-гр/Ag и НК ГВ-уг/Ag. Введение НЧ серебра в матрицы ГВ (НК ГВ-гр/Ag и НК ГВ-уг/Ag) усиливало их бактериостатический эффект, но в несколько меньшей степени, чем таковой, оказываемый нитратом серебра. Наблюдаемый бактериостатический эффект может быть связан с разрушением клеточной стенки бактерий, происходящим вследствие взаимодействия наночастиц с клеточной стенкой бактерий, которые изменяют окислительно-восстановительный потенциал клетки бактерии.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов с рядом веществ – как наноконпозитов, так и ГВ, были выявлены агенты, обладающие наибольшей бактериостатической активностью и отсутствием негативного влияния на растения картофеля. Полученные результаты свидетельствуют о наличии у некоторых из исследуемых веществ (НК ГВ-гр/Ag, НК ГВ-уг/Ag) бактериостатических свойств и негативного эффекта при образовании биопленок в отношении кольцевой гнили картофеля, вызываемой *Sms*. При этом, положительным влиянием на растения характеризовался ГВ-гр наноконпозит, полученный из них НК ГВ-гр/Ag. Не оказывали выраженного негативного эффекта на картофель другие исследуемые наноконпозиты.

Представленные данные свидетельствуют о возможности использования наноконпозитов с наночастицами серебра для обработки культурных растений против бактериальных заболеваний.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск) и Объединенного Центра ультрамикрoанализа ЛИИ СО РАН (<http://www.lin.irk.ru/copp/rus/>).

ANTIBACTERIAL EFFECTS OF NANOCOMPOSITES

I.A. Graskova¹, A.I. Perfileva¹, I.V. Klimenkov², B.G. Sukhov³

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, graskova@sifibr.irk.ru

²Limnological Institute, Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

³A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

Abstract. Nanocomposites containing selenium and silver, encapsulated in various biogenic matrices (arabinogalactan, starch, humic acids) were synthesized. The effect of these nanocomposites on the viability of the bacterial phytopathogen of potato *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* has been studied. It is shown that the studied nanocomposites have a bactericidal effect and no negative impact on potato plants.

Keywords: *nanocomposites, Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, the potato

БИОСИНТЕЗ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ И СПОСОБЫ ЕГО АКТИВАЦИИ

Е.А. Гумерова¹, А.Н. Акулов^{1,2}, Н.И. Румянцева^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, Россия, gumeri@mail.ru

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Аннотация. Исследовали влияние 10 мкМ МеЖ на физиологические характеристики, содержание и состав фенольных соединений (ФС) суспензионной культуры гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* при внесении в среду на 10-е сут культивирования. Общее содержание ФС на 14-е сут увеличивалось в 2 раза. Однако действие МеЖ было избирательным: он не оказывал влияния на синтез фенольных кислот и флавонолов, но значительно стимулировал синтез проантоцианидинов (в 2 раза).

Ключевые слова: гречиха татарская, морфогенная суспензионная культура, метилжасмонат, фенольные соединения

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1229-1233

Введение. Для гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* характерно высокое содержание фенольных соединений, наиболее представленным из которых является рутин [Horbowicz et al., 2011]. Эта особенность вторичного метаболизма сохраняется при переводе гречихи татарской в культуру *in vitro*. Преимуществами выращивания культур *in vitro* являются контролируемость, воспроизводимость и экологичность процесса, а также возможность направленного изменения синтеза вторичных соединений. Жасмонаты, в том числе МеЖ - сигнальные молекулы растений, которые могут оказывать влияние на регуляцию вторичного метаболизма [Pauwels et al., 2008]. В проведённых нами ранее экспериментах было установлено, что культивирование суспензионной культуры гречихи татарской на среде с 10 мкМ МеЖ в течение всего пассажа (14 сут) активировало синтез и изменяло качественный состав ФС [Гумерова и др., 2015]. Целью настоящей работы было исследовать влияние МеЖ на синтез ФС при кратковременном воздействии на культуру. МеЖ вводили в среду «глотком», на 10-е сут культивирования, когда культура уже набрала достаточную биомассу на выходе из логарифмической фазы роста, имела достаточно высокие ростовые и синтетические характеристики.

Материалы и методы. Использовали морфогенную суспензионную культуру (СК) клеток гречихи татарской. МеЖ вносили в среду культивирования на 10-е сут в конечной концентрации в среде 10 мкМ. Экспериментальные данные (прирост биомассы, митотический индекс, жизнеспособность, получение тканевого экстракта, определение в нём общего содержания ФС, ВЭЖХ анализ) получали на 12-е и 14-е сутки культивирования СК аналогично ранее опубликованной статье [Гумерова и др., 2015]. Содержание гидролизуемых и негидролизуемых проантоцианидинов (ПА) оценивали по методу Kitamura с соавторами [2010].

Результаты и обсуждение. Согласно литературным данным действие МеЖ в значительной степени зависит от используемой дозы и может оказывать как стимулирующий, так и ингибирующий (токсический) эффект [Zhang, Xing, 2008]. Выбор концентрации МеЖ - 10 мкМ, был определён на основании результатов предыдущих опытов [Гумерова и др., 2015] с тем, чтобы исключить использование концентраций, подавляющих рост культуры. Нами было показано, что МеЖ в

концентрации 10 мкМ при длительном воздействии в течение пассажа незначительно стимулировал рост культуры. При использовании 10 мкМ МеЖ «глотком» мы также не наблюдали большой разницы на 12-е и 14-е сут между контролем и опытом (рис. 1).

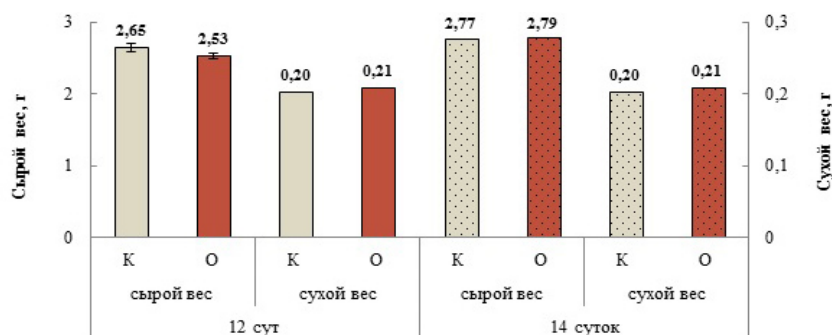


Рис. 1. Биомасса (по сырому и сухому весу) морфогенной суспензионной культуры *F. tataricum* на 12-е и 14-е сут при внесении 10 мкМ МеЖ на 10-е сут.

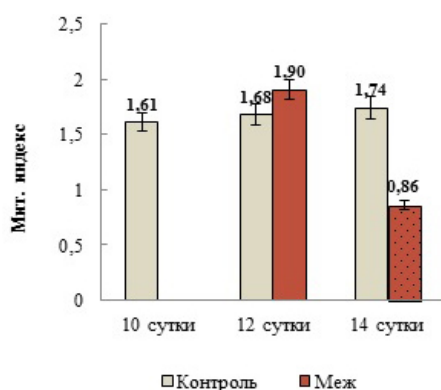


Рис. 2. Митиндекс морфогенной суспензионной культуры *F. tataricum* на 12-е и 14-е сут при внесении 10 мкМ МеЖ на 10-е сут.

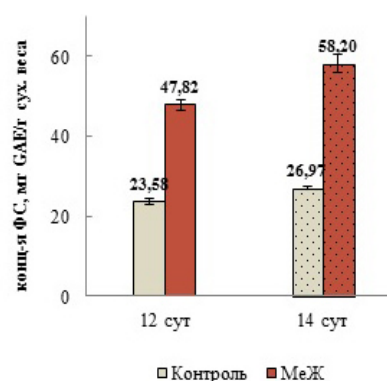


Рис. 3. Содержание ФС в ткани морфогенной суспензионной культуры *F. tataricum* на 12-е и 14-е сут при внесении 10 мкМ МеЖ на 10-е сут.

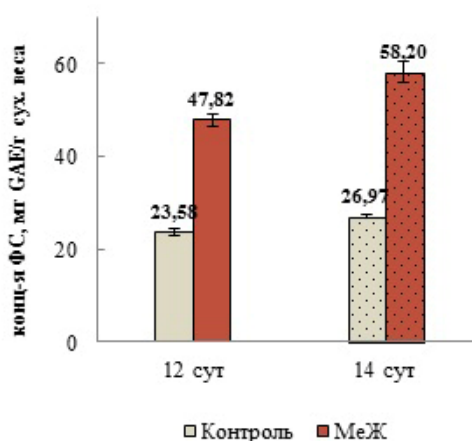


Рис. 4. Содержание рутина в ткани морфогенной суспензионной культуры *F. tataricum* на 12 е и 14-е сут при внесении 10 мкМ МеЖ на 10-е сут.

При действии МеЖ митотический индекс СК почти не изменялся на 12-е сутки (2-е сут воздействия), тогда как на 14-е сут (4-е сут воздействия) происходило его резкое снижение (в 2 раза) по сравнению с контролем и более чем в 2 раза по

сравнению со значением на 12-е сут культивирования (рис. 2). Жасмонаты и, в частности, МеЖ задействованы в регуляции различных биологических процессов. Известно, что МеЖ подавляет экспрессию генов клеточного цикла, но активирует экспрессию генов фенилпропаноидного пути биосинтеза ФС [Pauwels et al., 2008]. МеЖ нарушает переход клеток из фазы G2 в фазу M, подавляя активацию генов, контролирующую M-фазу клеточного цикла, и скоординировано запускает работу генов, ответственных за фенилпропаноидный путь. Оба эти процесса происходят независимо один от другого и могут рассматриваться как прямой эффект воздействия МеЖ.

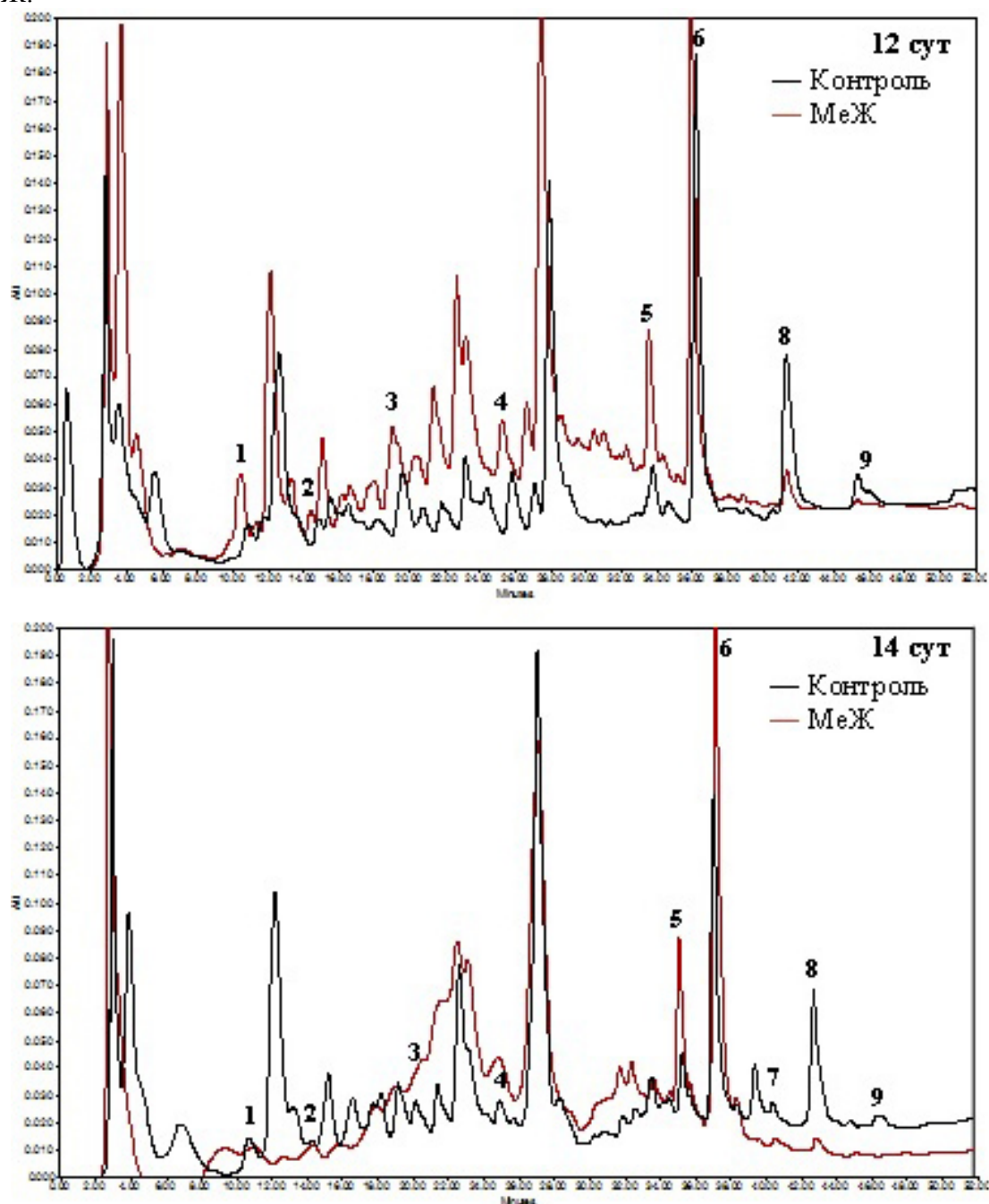


Рис. 5. Хроматограммы ФС морфогенной суспензионной культуры *F. tataricum* на 12-е и 14-е сут при внесении 10 мкМ МеЖ на 10-е сут: 1 – катехин, 2 – гентизиновая кислота, 3 – эпикатехин, 4 – п-кумаровая кислота, 5 – анисовая кислота, 6 – рутин, 7 – кверцитрин, 8 – коричная кислота, 9 – кверцетин.

Анализ ФС в контрольном варианте за период 12-14-е сут показал незначительное увеличение общего содержания ФС (рис. 3). В варианте с МеЖ содержание ФС к 12-м суткам выросло в 2 раза и оставалось приблизительно на том же уровне до 14-х сут. культивирования. При добавлении МеЖ «глотком» содержание ФС на 14 сут было значительно выше, чем в опыте, когда культуру выращивали на среде с МеЖ в течение пассажа [Гумерова и др., 2015]. Однако этот процесс не сопровождался значительным ростом содержания рутина, преобладающего флавоноида гречихи, содержание которого было рассчитана с помощью ВЭЖХ-анализа (рис. 4). ВЭЖХ анализ позволил идентифицировать следующие ФС: гентизиновую, хлорогеновую, кофейную, *n*-кумаровую, анисовую, коричную кислоты, катехин, эпикатехин, рутин, кверцитрин, нарингенин, кверцетин (рис. 5). При анализе хроматограмм мы не обнаружили значимого увеличения ни одного из пиков ФС в опытном варианте ни на 12-е, ни на 14-е сут культивирования.

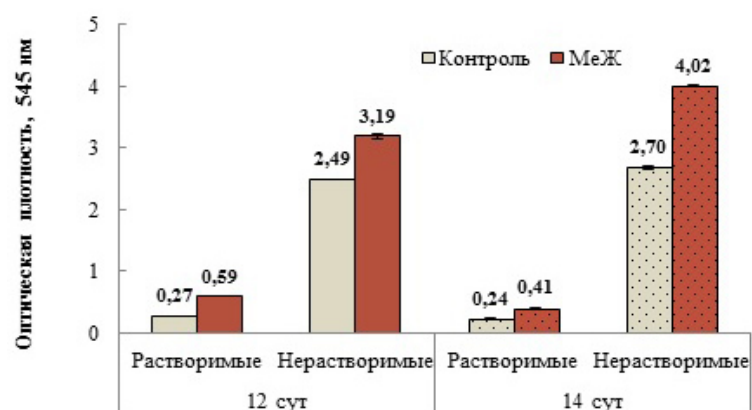


Рис. 6. Содержание гидролизуемых и негидролизуемых проантоцианидинов в ткани морфогенной суспензионной культуры *F. tataricum* на 12-е и 14-е сут при внесении 10 мкМ МеЖ на 10-е сут.

Исходя из того, что содержание ФС при воздействии МеЖ выросло почти в 2 раза, не затронув в значительной мере содержания ни фенольных кислот, ни флавонолов, мы сделали предположение, что увеличение содержания ФС в метанол-экстрагируемой фракции может происходить за счет активации синтеза других ФС. Показано, что в проростках гречихи культурной МеЖ активирует синтез ПА (флаван-3,4-диолов) [Horbowicz et al., 2011]. Проведенный нами спектрофотометрический анализ показал, что на 12-е сут МеЖ более чем в два раза увеличивает содержание растворимых ПА и на 28% нерастворимых ПА, а на 14-е сут нерастворимых ПА - на 49% (рис. 6). Показано, что в суспензионной культуре преобладают нерастворимые ПА, их содержание почти в 10 раз больше, чем растворимых. На основании полученных результатов можно сделать следующее заключение: МеЖ активирует синтез определённых ФС, преимущественно ПА. Вероятно, это обусловлено увеличением экспрессии ферментов, участвующих в синтезе ПА, таких как, лейкоантоцианидинредуктаза и антоцианидинсинтаза.

Литература

Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Румянцева Н.И. Влияние метилжасмоната на ростовые характеристики суспензионной культуры гречихи татарской и накопление в ней фенольных соединений // Физиология растений – 2015. – Т. 62, № 2. – С. 212–221.

Horbowicz M., Wiczowski W., Koczkodaj D., Saniewski M. Effects of methyl jasmonate on accumulation of flavonoids in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) // Acta Biol. Hung. – 2011. – V. 62. – P. 265–278.

Kitamura S., Matsuda F., Tohge T., Yonekura-Sakakibara K., Yamazaki M., Saito K., Narumi I. Metabolic profiling and cytological analysis of proanthocyanidins in immature seeds of *Arabidopsis thaliana* flavonoid accumulation mutants // Plant J. – 2010. – V. 62. – P. 549–559.

Pauwels L., Morreel K., De Witte E., Lammertyn F., Van Montagu M., Boerjan W., Inzé D., Goossens A. Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells // PNAS. – 2008. – V. 105. – P. 1380–1385.

Zhang L., Xing D. Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death // Plant Cell Physiol. – 2008. – V. 49. – P. 1092–111.

THE BIOSYNTHESIS OF PHENOLIC COMPOUNDS IN SUSPENSION CULTURE OF TARTARY BUCKWHEAT AND APPROACHES FOR ITS ACTIVATION

E.A. Gumerova¹, A.N. Akulov^{1,2}, N.I. Rumyantseva^{1,2}

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia, gumeri@mail.ru

²Kazan University, Kazan, Russia

Abstract. The effect of 10 µM methyl jasmonate (MeJA) on physiological characteristics, phenolic content and phenolic composition of suspension culture of tartary buckwheat *Fagopyrum tataricum* was studied after addition to the culture on day 10. The total phenolic content was increased in two times at 14th day. However the MeJA action was selective, it did not influenced the synthesis of phenolic acids and flavonols, but greatly enhanced proanthocyanidin synthesis (two fold).

Keywords: tartary buckwheat, morphogenic suspension culture, methyl jasmonate, phenolic compounds

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ФЕРМЕРСТВО: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

Е.В. Дейнеко

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, *deineko@bionet.nsc.ru*

Аннотация. Рассматриваются современные достижения в области создания растительных систем экспрессии для наработки рекомбинантных белков медицинского назначения. Сделан акцент на преимущества растений в качестве альтернативных экспрессионных платформ. В качестве перспективной системы экспрессии рассматриваются суспензионные клеточные культуры растений, для которых применение подхода геномного редактирования может существенно повысить выход синтезируемых рекомбинантных белков.

Ключевые слова: *рекомбинантные белки, растительные системы экспрессии, культуры клеток*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1234-1235

За последние два десятилетия доля биофармацевтических продуктов, таких как антитела, вакцины и ферменты, существенно возросла в общем объеме фармацевтических препаратов. Только компаниями США в настоящий момент времени разрабатывается около тысячи наименований различных биологических субстанций, годовой оборот этого сектора составляет около 400 миллиардов долларов США [Pharmaceutical Industry Profile..., 2014]. Среди рекомбинантных субстанций, представленных на мировом рынке, доминирует производство антител, многие из которых предназначены для лечения онкологий [Scott et al., 2012]. Растущее разнообразие биологических субстанций, обусловленное успешным применением рекомбинантных вакцин, ростом заместительной ферментативной терапии и т.д. настоятельно диктует развитие альтернативных стратегий получения рекомбинантных продуктов.

В качестве альтернативных экспрессионных платформ для синтеза рекомбинантных фармацевтически ценных белков в настоящее время весьма привлекательны и интенсивно разрабатываются растительные системы экспрессии [Fischer et al., 2013]. Этот вид деятельности получил специальный термин – «молекулярное фермерство» и включает производство в растениях не только фармацевтически ценных белков, но и промышленных ферментов. Преимущество растений для производства рекомбинантных белков по сравнению с другими системами экспрессии включает масштабируемость, относительно низкую стоимость культивирования, способность синтезировать сложные белки (например, антитела с дисульфидными связями и гликозилированием), а также отсутствие патогенов. Отсутствие риска заражения клеточных культур растений вирусами и прионами животного происхождения представляется чрезвычайно важным для крупномасштабного производства рекомбинантного продукта. Так, например, именно по этой причине фирма «Genzyme» (США) была вынуждена приостановить производство церезима, используемого в заместительной терапии болезни Гоше, что послужило толчком для «Protalix Biotherapeutics» (Израиль) к созданию и выведению на рынок собственного продукта «Elelyso», который представлял собой фермент церезим растительного происхождения, синтезированный клетками моркови [Загорская, Дейнеко, 2017].

К настоящему времени разработаны технологии получения генетически

модифицированных растений, в геном которых перенесены гены, кодирующие различные белки для медицинских целей, в том числе и белки человека. Получены десятки видов трансгенных растений с генами антигенов различных возбудителей инфекционных заболеваний, разнообразных терапевтических белков и антител. Однако относительно невысокий уровень накопления целевых белков (менее 1% от общего растворимого белка – ОРБ) в тканях генетически модифицированных растений послужил отправной точкой для разработки новых систем экспрессии.

Перспективными для этих целей являются культуры клеток высших растений, характеризующиеся низкой стоимостью производства, способностью синтезировать сложные белки, а также отсутствием патогенов человека и животных [Загорская, Дейнеко, 2017]. Несмотря на успешность использования суспензионных клеточных культур растений для коммерческого получения фармбелков, в этом направлении все еще остается достаточно много нерешенных проблем, наиболее важной среди которых является недостаточно высокий выход рекомбинантного белка. В целом, решение проблемы повышения выхода рекомбинантного белка в растительных клетках решается за счет оптимизации генетических конструкций, включающих целевой ген, оптимизации условий культивирования растительных клеток, а также отбора наиболее «благоприятных» событий интеграций трансгена в растительный геном при его случайном характере распределения по геному. Как один из возможных путей увеличения биосинтеза рекомбинантных белков в культурах клеток высших растений рассматривается поиск в растительном геноме районов, в которых экспрессия собственных генов растения наиболее активна и постоянна. С применением технологии геномного редактирования такие районы могут послужить мишенями для адресной доставки в них целевого гена.

Исследования выполняются при поддержке проекта РНФ:17-14-01099.

Литература

Загорская А.А., Дейнеко Е.В. Суспензионные культуры клеток растений как платформа для получения рекомбинантных белков (Обзор) // Физиология растений. – 2017. – Т. 64, № 6. – С. 403–417.

Fischer, R., Schillberg, S., Buyel, J.F., Twyman, R.M. Commercial aspects of pharmaceutical protein production in plants // Curr. Pharm. Des. – 2013. – V. 19, No. 31. – P. 5471–5477.

Pharmaceutical industry profile – PhRMA annual membership survey: pharmaceutical research and manufacturers of America. – Washington, USA. – 2014. – P. 1–84.

Scott, A.M., Wolchok, J.D., Old, L.J. Antibody therapy of cancer // Nat. Rev. Cancer. – 2012. – V. 12, No. 4. – P. 278–287.

PLANT MOLECULAR CLONING: MODERN STATE OF STUDIES

E.V. Deineko

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, deineko@bionet.nsc.ru

Abstract. Modern achievements in the field of creation of plant expression systems for the production of recombinant proteins for medical purposes are considered. The emphasis is on the advantages of plants as alternative expression platforms. As a promising expression system, suspension cell cultures of plants are considered, for which application of the genomic editing approach can substantially increase the yield of synthesized recombinant proteins.

Keywords: recombinant proteins, plant expression systems, cell cultures

ПРОСТРАНСТВЕННО ЗАТРУДНЕННЫЕ ФЕНОЛЫ ПОВЫШАЮТ УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

И.В. Жигачева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, zhigacheva@mail.ru

Аннотация. Исследована биологическая активность 1-(карбокситетрагидрокси)-1-(N-ацетиламино)-2-(3',5'-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил) - пропионата натрия (натрий анфена) и 3,5-ди-трет-бутил-4-гидрокси-фенил пропионата калия (калий фенозан). Показано, что в условиях дефицита воды 10^{-6} М калий фенозан и 10^{-13} М натрий анфен предотвращали активацию ПОЛ в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха и предупреждали торможение роста проростков, что, возможно, обусловлено антиоксидантной активностью препаратов.

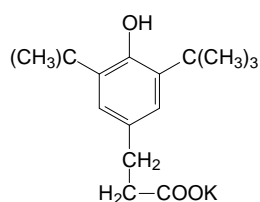
Ключевые слова: антиоксиданты, митохондрии, дефицит воды, ПОЛ

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1236-1240

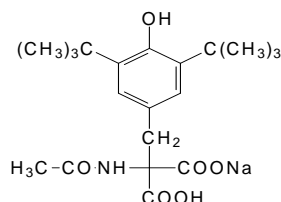
Активные формы кислорода (АФК) непрерывно образуются в результате различных обменных процессов в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах. Обладая сигнальной функцией, они регулируют экспрессию генов и активность стресс-протекторных систем [Колупаев, Карпец, 2010]. Благодаря работе антиоксидантной системы, стационарный уровень этих интермедиатов в клетках растений достаточно низкий (около 10^{-10} М). Смещение антиоксидантно-прооксидантного равновесия, приводящее к увеличению содержания АФК в клетках, происходит при действии сильных стрессоров или при длительном воздействии стрессовых факторов. Их накопление может являться причиной повреждения различных структур, проявляющееся в окислении -SH-групп белков, фрагментации пептидных цепей, повышении чувствительности белков к действию протеаз. Они вызывают повреждение азотистых оснований ДНК, модификация которых становится причиной разрывов водородных связей между цепями ДНК и повреждения хромосом [Максимов, Черепанова, 2006]. Мы предположили, что антиоксиданты, снижая содержание АФК в клетке, будут увеличивать устойчивость растений к действию стрессовых факторов. Для этих целей можно использовать антиоксиданты из группы пространственно-затрудненных фенолов (ПЗФ).

Доказано, что антиоксидантные свойства молекул ПЗФ обусловлены наличием в их структуре ОН-групп, которые образуют сопряженную систему со связями ароматического кольца. Особенности строения этой группы антиоксидантов определяют их способность легко взаимодействовать с различными свободными радикалами, нейтрализуя их и образуя при этом фенокси-радикалы, являющиеся мало реакционноспособными по отношению к другим радикалам и молекулам [Ершов и др., Володькин, 1972]. Отметим, что в низких дозах ПЗФ проявляют антиоксидантную активность, а в высоких - выступают в роли прооксидантов, что может усугубить пероксидацию.

Исходя из этого, объектом исследования были выбраны антиоксиданты из класса ПЗФ – калий фенозан (3,5-ди-трет-бутил-4-гидрокси-фенил пропионат калия) и натрий анфен (1-(карбокситетрагидрокси)-1-(N-ацетиламино) -2-(3',5'-ди-трет-бутил-4'-гидроксифенил) – пропионат натрия):



Калий фенозан



Натрий анфен

Целью исследования было изучение влияния этих препаратов на энергетику митохондрий проростков гороха (*Pisum sativum* L), сорт Альфа, в условиях дефицита воды.

Материалы и методы. Работу проводили на митохондриях 5 дневных проростков гороха (*Pisum sativum* L), сорт Альфа. Семена гороха промывали водой с мылом и 0.01% раствором KMnO_4 . Контрольную группу семян в течение 39 мин. замачивали в воде, а опытную группу – в растворе исследуемых ПЗФ (соответствующей концентрации). Затем семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение суток. Спустя сутки половину семян контрольной группы (ДВ) и семена, обработанные ПЗФ, на 2 суток переносили на сухую фильтровальную бумагу. Затем семена группы ДВ переносили на влажную фильтровальную бумагу, а семена опытной группы – на фильтровальную бумагу, увлажненную исследуемыми ПЗФ, где семена обеих групп находились в течение последующих 2 суток. Семена контрольной группы оставались на влажной фильтровальной бумаге в течение 5 суток. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

Выделение митохондрий из эпикотилей этиолированных проростков гороха проводили методом дифференциального центрифугирования (при 25000 g в течение 5 мин и при 3000 g в течение 3 мин) [Попов и др., 2003]. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 g. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл среды, содержащей: 0,4 М сахарозу, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7,4), 0,1% БСА (свободный от жирных кислот) и вновь осаждали митохондрии при 11000 g в течение 10 мин.

Скорости дыхания митохондрий проростков гороха регистрировали электродом типа Кларка, используя полярограф LP-7 (Чехия). Среда инкубации митохондрий печени содержала: 0,4 М сахарозу, 20 мМ HEPES-Tris-буфер (pH 7,2), 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ MgCl_2 , и 0,1% БСА.

Перекисное окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [Fletcher et al., 1973]. Липиды экстрагировали смесью хлороформ: метанол=2:1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3-5 мг белка. Соотношение митохондрии: смесь хлороформ-метанол=1:10. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-NoribaYvonGmbH (Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0,3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм.

Для активации ПОЛ митохондрии этиолированных 5 дневных проростков гороха на 15 мин помещали в 0,5 мл среды, содержащей 0,2 М сахарозу, 10 мМ HEPES и 1 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4 («старение» митохондрий). Результаты выражали в условных единицах флуоресценции пересчитанных на мг белка.

В эксперименте использовали реактивы фирм: сахароза, Трис, ЭДТА, FCCP, малат, глутамат (“Sigma Aldrich,” США); БСА, (свободный от ЖК) (“Sigma Aldrich,” США); HEPES (“MP Biomedicals”, Германия).

Результаты и обсуждение. Инкубация митохондрий в гипотоническом растворе сахарозы вызывала слабое набухание митохондрий и рост генерации АФК, что нашло

отражение в увеличении интенсивности флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в 3-4 раза (рис. 1).

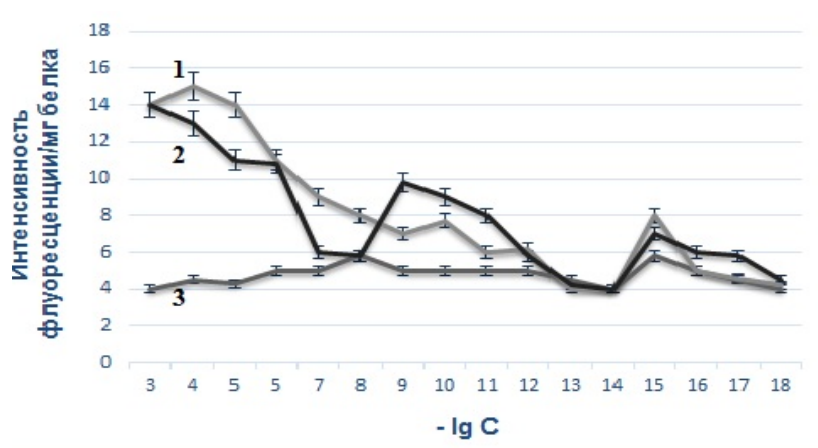


Рис. 1. Влияние различных концентраций натрий анфена, калий фенозана и «старения» на интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ. 1 – «старение» митохондрий+натрия анфен (АНФ); 2 – «старение» митохондрий+калия фенозан (ФЕН); 3 – контроль.

Введение исследуемых ПЗФ в среду инкубации митохондрий снижало интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ и носило дозозависимую зависимость. Калий фенозан в концентрации 10^{-7} - 10^{-8} М и 10^{-12} - 10^{-14} М уменьшал интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха почти до контрольных значений. Натрий анфен эффективно снижал интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ в концентрациях 10^{-11} - 10^{-14} М и 10^{-16} - 10^{-18} М, что, возможно, указывало на наличие антистрессовых свойств у исследуемых ПЗФ.

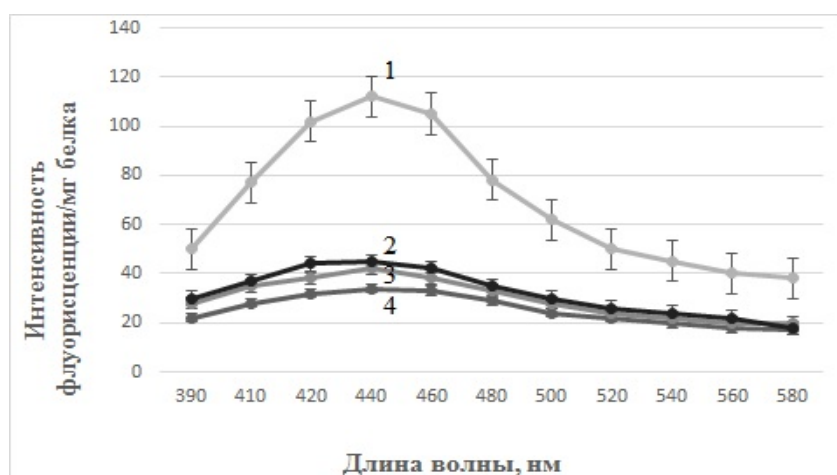


Рис. 2. Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий 5-дневных этиолированных проростков гороха в условиях дефицита воды (ДВ) и обработки семян натрий анфеном (АНФ) или калий фенозаном (ФЕН). 1 – ДВ; 2 – ДВ+АНФ; 3 – ДВ+ФЕН; 4 – контроль.

Наличие этих свойств у исследуемых ПЗФ мы проверили на модели дефицита воды. При этом использовали калий фенозан в концентрации 10^{-8} М и натрий анфен в

концентрации 10^{-13} М, т.е. использовали ПЗФ в концентрациях, предотвращающих активацию ПОЛ. Дефицит воды приводил к активации свободно радикального окисления в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха, о чем свидетельствует 3-кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Отметим, что обработка семян гороха ПЗФ вызывала снижение интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ (рис. 2). При этом изменялись и физиологические показатели: дефицит воды тормозил рост проростков. Обработка семян гороха 10^{-13} М натрий анфеном или 10^{-6} М калий фенозаном предотвращала торможение роста корней и побегов в этих условиях. В этом случае корни саженцев, обработанных калий фенозаном, были более длинными на 45%, чем в контрольных образцах, а обработанные натрий анфеном – на 31%, что имеет большое адаптивное значение в условиях дефицита воды.

Основываясь на полученных результатах, можно прийти к заключению, что адаптогенные свойства исследованных ПЗФ могут быть обусловлены их антиоксидантной и антирадикальной активностью. По данным [Перевозкина, 2003] эффективный коэффициент взаимодействия калий фенозана с пероксильными радикалами при окислении метилолеата (60°) k_7 равен $2,2 \times 10^4$ (Мс) $^{-1}$. Близкие значения k_7 отмечены и для натрий анфена. Однако, защитный эффект препаратов за счет антирадикальных свойств, вероятно, мог проявиться лишь в концентрации 10^{-6} М. В данной концентрации препараты, возможно, встраивались в биологические мембраны и взаимодействовали с окружающими фосфолипидами [Бурлакова, 2006].

Литература

Бурлакова Е.Б. Блеск и нищета антиоксидантов // Наука и жизнь. – 2006. – № 2. – С. 18–20

Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. Пространственно-затрудненные фенолы. – М: Химия, 1972. – 352 с.

Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессов. – Киев: Основа, 2010. – 352 с.

Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126. – С. 250–261.

Перевозкина М.Г. Кинетика и механизм ингибирующего действия производных фенозана, салициловой кислоты и их синтетических смесей с α -токоферолом и фосфолипидами. – Автореферат к.х.н. – Тюмень, 2003. – 24 с.

Попов В.Н., Руге Э.К., Старков А.А. Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха // Биохимия. 2003. – Т. 68, № 7. – С. 910–916.

Шугаева Н.А., Выскребенцева Э.И., Орехова С.О., Шугаев А.Г. Влияние водного дефицита на дыхание проводящих пучков листового черешка сахарной свеклы // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 3. – С. 373–380.

Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues // Anal. Biochem. – 1973. – V. 52. – P. 1–9.

THE SPATIAL HINDERED PHENOLS INCREASE THE STABILITY OF PEA SEEDLING TO STRESS IMPACTS

I.V. Zhigacheva

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, *zhigacheva@mail.ru*

Abstract. The biological activity of 1-(carboxy)-1-(N-acetylamino)-2-(3', 5'-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-propionate sodium (sodium anphen) and 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl potassium propionate (potassium phenosan) was studied. It was shown that in conditions of water deficiency 10^{-6} M potassium phenosan and 10^{-13} M sodium anphen prevented the activation of LPO in mitochondrial membranes of etiolated pea seedlings and prevented inhibition of seedling growth, which may be due to antioxidant activity of the preparations.

Keywords: *antioxidants, mitochondria, water deficiency, LPO*

**ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С ПОДЗЕМНЫМИ ОРГАНАМИ
DACTYLORHIZA INCARNATA (L.) SOO (ORCHIDACEAE)**

Ю.В. Зайцева, А.В. Сидоров, А.А. Бычкова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова», Ярославль, Россия, zjv9@mail.ru

Аннотация. Из ризосферы *Dactylorchiza incarnata* (L.) Soo (Orchidaceae) выделено 304 штамма ассоциативных бактерий, из которых 78 обладали фосфатмобилизирующей активностью, наиболее выраженной у бактерий рода *Pseudomonas*. Активная мобилизация нерастворимого фосфата кальция происходит на фоне активного роста бактериальных культур и сопровождается понижением рН культуральной жидкости, вероятно, вследствие накопления в ней бактериальных органических кислот.

Ключевые слова: фосфатмобилизирующая активность, ассоциативные бактерии, ризосфера, *Dactylorchiza incarnata*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1241-1243

Способность определенных групп ассоциативных бактерий переводить малодоступные для растений формы фосфатов из органических и неорганических источников в подвижные и легкоусвояемые определяет условия минерального питания растений и, как следствие, их рост, развитие и устойчивость [Sharma et al., 2013]. Среди почвенных бактерий такой способностью, согласно разным источникам литературы, обладают до 50% штаммов ризосферных бактерий [Chen et al., 2006]. Фосфатмобилизирующая активность обнаружена у бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Xanthomonas* и др. [Sharma et al., 2013]. На сегодняшний день наиболее изученными являются ассоциативные фосфатмобилизирующие бактерии сельскохозяйственных растений. В ряде работ показано, что инокуляция растений фосфатмобилизирующими штаммами приводит к увеличению их темпов роста и урожайности [Arcand, Schneider, 2006; Chen et al., 2006; Sharma et al., 2013].

Однако для редких и находящихся под угрозой исчезновения видов семейства Орхидных, произрастающих на территории Центрально-европейской России, данных об ассоциативных бактериях и их роли в процессах роста и развития растений крайне мало. Известно, что в природных условиях их онтогенез может протекать только в тесной взаимосвязи с ассоциативной микробиотой, свойства которой определяют эффективность прорастания семян, рост, развитие и устойчивость растений данной группы [Коломейцева и др., 2012]. Изучение фосфатмобилизирующей активности ризосферных бактерий имеет важное значение для установления путей и характера взаимодействий внутри микробно-растительных ассоциаций [Sharma et al., 2013].

В связи с этим целью работы являлось изучение фосфатмобилизирующей активности бактерий, ассоциированных с подземными органами пальчатокоренника мясокрасного (*Dactylorchiza incarnata* (L.) Soo).

D. incarnata – многолетнее травянистое растение семейства Орхидных, включенное в Европейский список краснокнижных сосудистых растений, II Приложение к конвенции CITES, а также региональные Красные книги [Маракаев, 2015].

Бактерии были выделены из ризосферы генеративных растений *D. incarnata*, произрастающих в осоково-разнотравном сообществе на территории Национального

парка «Плещеево озеро» в Переславском районе Ярославской области. Выделение ассоциативного бактериального сообщества проводили методом последовательных разведений с последующим посевом на плотные питательные среды. Для идентификации штаммов использовали молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК.

Способность исследуемых штаммов к фосфатмобилизации оценивали методом, основанным на образовании зоны просветления на минимальной агаризованной среде с добавлением фосфата кальция (ТКФ) [Jimtha et al., 2014]. Для количественного определения фосфатмобилизирующей активности исследуемых штаммов в колбы вместимостью 750 мл вносили 100 мл стерильной минеральной среды следующего состава (г/л): NH_4Cl – 0,16; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 5,0; глюкоза – 10. В среду вносили 300 мкл ночной культуры бактерий и культивировали в орбитальном шейкер-инкубаторе Biosan ES-20 при 180 об/мин при 28 °С. Для определения количества фосфата, перешедшего в раствор, использовали одностадийный метод, основанный на измерении интенсивности окраски его молибденового комплекса с Твином 80 [Пупышев, 1991] на спектрофотометре UNICO 2802S UV/VIS при 350 нм. Измерения проводили в трех повторностях ежедневно на протяжении 10 дней. Одновременно с содержанием фосфора, измеряли уровень рН раствора (рН-метр АНИОН 4100), а также количество живых клеток бактерий. Оценку фитопатогенных свойств исследуемых штаммов проводили по их способности мацерировать растительную ткань в экспериментах *in vitro* [Желдакова, Мямин, 2006].

В результате проведенных исследований из ризосферы *D. incarnata* было выделено 304 изолята ассоциативных бактерий, принадлежащих к разным систематическим группам. При качественном анализе фосфатмобилизирующей активности было выявлено 78 штаммов (26% от общего числа), образующих зоны просветления (диаметром от 0,5 до 4,5 см) на агаре, содержащем нерастворимый ТКФ. При проверке отобранных штаммов на фитопатогенность было установлено, что менее 5% из них были способны к мацерации растительной ткани *in vitro*.

По результатам количественной оценки накопления фосфора в культуральной жидкости под действием исследуемых штаммов установлено, что наиболее активными фосфатмобилизирующими свойствами обладают бактерии, принадлежащие к роду *Pseudomonas* – *P. chlororaphis* GPR225, *P. brassicacearum* GTR221 и *P. yamanorum* GOTE18. Концентрация фосфора в культуральной жидкости исследуемых штаммов увеличивалась на протяжении всего времени культивирования. Однако наиболее активное накопление свободного фосфора в среде происходило в течение первых шести суток. При сопоставлении динамики накопления в культуральной жидкости свободного фосфора с изменением рН среды и количеством жизнеспособных клеток бактерий установлено, что наиболее активное растворение ТКФ происходит на фоне активного роста бактериальных культур и сопровождается понижением уровня рН. Снижение уровня рН культуральной жидкости может быть обусловлено образованием бактериями органических кислот в результате прямого окисления глюкозы, которое, в свою очередь, зависит от количества жизнеспособных бактериальных клеток в среде.

Дальнейшие исследования в этом направлении будут способствовать установлению характера взаимодействий редких видов семейства Орхидных с ассоциативной микробиотой, а также поиску перспективных штаммов с выраженными фосфатмобилизирующими свойствами, способных составить основу новых эффективных биопрепаратов для оптимизации минерального питания и регуляции роста растений.

Литература

Желдакова Р.А., Мямин В.Е. Фитопатогенные микроорганизмы: Учеб.- метод. комплекс для студентов биол. фак. – Минск: БГУ, 2006. – 116 с.

Коломейцева Г.Л., Антипина В.А., Широков А.И., Хомутовский М.И., Бабоша А.В., Рябченко А.С. Семена орхидей: развитие, структура, прорастание. – Москва: Геос, 2012. – 352 с.

Маракаев О.А. Семейство Орхидные – Orchidaceae // Красная книга Ярославской области. – 2015. – С. 114–138.

Пупышев А.Б. Стабильный реактив для одностадийного определения неорганического фосфата // Лабораторное дело. – 1991. – Т. 3, № 9. – С.12–16.

Arcand M.M., Schneider K.D. Plant-and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review // An. Acad. Bras. Cienc. – 2006. – V. 78. – P. 791–807.

Chen Y.P., Rekha P.D., Arun A.B., Shen F.T., Lai W.A., Young C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities // Appl. Soil. Ecol. – 2006. – V. 34, No. 33. – P. 41.

Jimtha J.C., Smitha P.V., Anisha C., Deepthi T., Meekha G., Radhakrishnan E.K., Gayatri G.P., Remakanthan A. Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties // Plant. Cell Tiss. Organ. Cult. – 2014. – V. 118 (1). – P. 57–66.

Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils // Springerplus. – 2013. – V. 2. – P. 587.

PHOSPHATE-MOBILIZING ACTIVITY OF BACTERIA ASSOCIATED WITH UNDERGROUND ORGANS OF *DACTYLORHIZA INCARNATA* (L.) SOO (ORCHIDACEAE)

Yu.V. Zaytseva, A.V. Sidorov, A.A. Bychkova

P.G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia, zjv9@mail.ru

Abstract. 304 strains of associative bacteria were isolated from the rhizosphere of *Dactylorchiza incarnata* (L.) Soo (Orchidaceae). 78 of them has phosphate-mobilizing activity which were mostly expressed at *Pseudomonas*. Active mobilization of undissolved calcium phosphate was observed during active growth of bacterial culture and was followed by lowering the pH of cultural media due to putative accumulation of bacterial organic acids.

Keywords: phosphate-mobilizing activity, associative bacteria, rhizosphere, *Dactylorchiza incarnata*

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ТОПОЛЯ БЕРЛИНСКОГО ГЕНОМ ДЕГИДРИНА *WCS120* ИЗ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ

Е.Д. Золотовская^{1,2}, М.В. Протопопова¹, А.Д. Коновалов^{1,2}, В.В. Павличенко¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, vpavlichenko@gmail.com, marina.v.protopopova@gmail.com

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия, zolotovskayaelenad@gmail.com, konovalov.alexey.d@gmail.com

Аннотация. Работа посвящена созданию генетически модифицированных растений тополя берлинского по гену дегидрина *WCS120* из пшеницы мягкой сорта Иркутская. В результате селективного отбора регенерантов были получены 40 регенерантов тополя берлинского. Найден новый нуклеотидный вариант гена дегидрина *WCS120* у пшеницы мягкой сорта Иркутская.

Ключевые слова: генетическая трансформация, тополь берлинский, холодоустойчивость, дегидрины, пшеница мягкая сорт Иркутская

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1244-1247

С момента внедрения методов генетической инженерии одной из ее задач было придание новых полезных свойств растениям, используемых в сельском хозяйстве. К таким ценным свойствам можно отнести устойчивость культурных растений к ряду абиотических стрессовых факторов, включая холод, засуху и засоление. Данные факторы приводят к потере внутриклеточной воды и, как следствие, к истощению или гибели целого организма. В процессе эволюции растения выработали механизм защиты клеток от подобных повреждений. В основе данного механизма лежит функционирование специальных белков дегидринов, которые активно синтезируются в растительных клетках в результате воздействия низких положительных температур и способствуют защите от обезвоживания, а также выполняют криопротекторные функции, защищая клетку от образования внутриклеточного льда.

Гены, кодирующие некоторые дегидрины, активно используются для генетической трансформации сельскохозяйственных растений с целью повышения их морозо- и/или холодоустойчивости. Донорами ДНК для подобной генетической трансформации в основном являются модельные виды растений, обладающие ярко выраженной морозо- и/или холодоустойчивостью.

Одним из наиболее часто используемых модельных генов для придания растениям морозо- и/или холодоустойчивости является ген дегидрина *WCS120* из пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.). Существует множество сортов пшеницы мягкой, отличающихся друг от друга по степени устойчивости к низким положительным температурам, заморозкам и зимостойкости. Одним из наиболее морозоустойчивых сортов пшеницы мягкой является сорт Иркутская (*Triticum aestivum* L., разновидность *albidum*). Сорт морозоустойчив, хорошо переносит зимовку на полях со снежным покровом не менее 20 см.

Несмотря на то, что ген, кодирующий дегидрин *TaWCS120*, и его холодоиндуцируемый промотор активно изучаются [Limin et al., 1995; Sarhan et al., 1997; Mészáros et al., 2015; Éva et al., 2018], эффект трансформации древесных растений этим геном до настоящего момента не исследован. Изучение эффектов генетической трансформации древесных растений подразумевает использование модельных видов растений. К настоящему моменту известен лишь ограниченный набор модельных

древесных растений, способных к эффективному микрклональному размножению и агробактериальной генетической трансформации. В то же время, генетическая трансформация древесных растений позволит адаптировать ряд ценных культур к условиям, в которых их эффективное произрастание и плодоношение ранее было невозможно.

Среди древесных растений в качестве модельных часто используют представителей рода *Populus*. Представители данного рода обладают высокой способностью к регенерации и трансформации, а также имеют небольшой размер генома. В качестве объекта для генетической трансформации в данной работе был выбран тополь берлинский (*Populus ×berolinensis* Dipp.). Тополь берлинский относится к семейству Ивовые (Salicaceae) и является гибридом тополя лавролистного и тополя черного сорта Италика (*P. laurifolia* Ledeb. × *P. nigra* L. “*Italica*”). Тополь берлинский является модельным объектом для изучения процессов роста и развития древесных растений, а также для постановки методики микрклонального размножения и генетической трансформации.

Таким образом, целью работы была генетическая трансформация тополя берлинского геном дегидрина *TaWCS120* из пшеницы мягкой сорта Иркутская.

Из этиолированных проростков пшеницы мягкой выделяли суммарную РНК. О качестве выделенной РНК судили по наличию классических фракций рибосомальной РНК, визуализированных после их электрофоретического разделения в 1% агарозном геле. На основе РНК, очищенной от геномной ДНК, синтезировали кДНК. Для амплификации целевого гена дегидрина *TaWCS120* осуществляли подбор рабочих праймеров с использованием известной последовательности гена *WCS120*, представленной в базе данных GeneBank (№ M93342.2). Подбор праймеров проводили к участкам гена, включающим в себя открытую рамку считывания (от «Старт» до «Стоп» кодона), а также 5' и 3'-некодирующие области гена. В участки праймеров, комплементарные к 5' и 3'-некодирующим областям гена вносили изменения таким образом, чтобы полученные ампликоны содержали на противоположных концах сайты рестрикции *Bam*HI (5'-GGATCC-3') и *Sac*I (5'-GAGCTC-3'). Сайты рестрикции необходимы для переноса ампликона в плазмидные векторные конструкции для проведения дальнейшей агробактериальной трансформации. Основные характеристики праймеров представлены в таблице. Жирным подчеркнутым шрифтом выделены сайты рестрикции.

Таблица.

Праймеры для амплификации гена *TaWCS120*

Название	Последовательность (от 5' к 3')	Ta, °C	Длина праймера, п.о.	Длина продукта, п.о.
WCS120_F	GTGAG <u>GGATCC</u> CAGCGCAAGATGGAG	63,2	25	1222
WCS120_R	GGCAG <u>GAGCTC</u> GCTCAGTGCTG	62,9	21	

Амплификацию гена *TaWCS120* проводили с использованием трёх различных полимераз: GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, США), Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech, США) и iProof High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad, США). Полученный ПЦР продукт очищали от димеров праймеров и компонентов ПЦР реакции методом горизонтального электрофореза в агарозном геле и лигировали в промежуточный вектор pTZ57R/T. Полученной векторной конструкцией трансформировали компетентные клетки *E. coli*. Из отобранных с помощью бело-голубого скрининга

колоний выделяли плазмидную ДНК, несущую целевой ген, и проводили ее секвенирование по методу Сенгера на автоматическом капиллярном секвенаторе серии 3500 (Applied Biosystems) с использованием праймеров M13. Для каждого ПЦР продукта, полученного с помощью различных полимераз, проверяли по 8 различных клонов.

При анализе результатов секвенирования целевого продукта с использованием трех различных полимераз было обнаружено, что полимеразы GoTaq Flexi DNA Polymerase и Advantage 2 Polymerase Mix дают большое количество замен (ошибок) в нуклеотидной последовательности целевого гена по сравнению с последовательностью из GeneBank, что может быть связано с низкой точностью работы исследованных полимераз. Наиболее точной оказалась iProof High-Fidelity DNA Polymerase. Однако во всех трех случаях наблюдали повторяющиеся устойчивые замены в последовательности целевого гена (1176 пар оснований в открытой рамке считывания) в позициях № 115 и 481 по сравнению с нуклеотидной последовательностью, представленной в базе данных GenBank. В случае использования высокоточной iProof High-Fidelity DNA Polymerase наблюдали только эти замены.

Нуклеотидную последовательность, полученную с помощью iProof High-Fidelity DNA Polymerase и заключенную в промежуточный вектор pTZ57R/T, рестрицировали по сайтам BamHI и SacI и лигировали в предварительно линеаризированный по тем же сайтам вектор pRI 101-AN, используемый для агробактериальной генетической трансформации. Перенос полученной векторной конструкции в клетки *A. tumefaciens* осуществляли с помощью прямой трансформации методом замораживания-оттаивания [Holsters et al., 1978] с авторскими дополнениями.

Для агробактериальной генетической трансформации тополя берлинского использовали суспензию клеток полученного штамма *A. tumefaciens*, содержащих плазмиды с геном дегидрина *TaWCS120*. В качестве эксплантов растительной ткани для генетической трансформации использовали отрезки стеблей без пазушных почек.

Для трансформации и микроклонального размножения использовали питательную среду на основе 1/2 MS 5524 [Murashige et al., 1962] производства Sigma-Aldrich с добавлением хелата железа и микроэлементов до полной нормы от среды MS, тиамин (1 мг/л), пиридоксин (0,5 мг/л), никотиновой кислоты (0,5 мг/л), аденин сульфата (40 мг/л) и мезоинозита (50 мг/л), сахарозы (2%) и агара производства Биотехновация, Россия (7 г/л). Кислотность среды доводили до значения pH 5,7. Экспланты с нанесенной на них суспензией агробактерии экспонировали на твердой питательной среде в течение суток в темноте при 24 °С. После коэкспонирования экспланты переносили на твердую питательную среду с добавлением кинетина (0,5 мг/л) и индолил масляной кислоты (0,1 мг/л) для индукции органогенеза. Помимо регуляторов роста в питательную среду добавляли селективные и подавляющие рост агробактерии антибиотики (канамицин (15 мг/л) и цефотаксим (200 мг/л)). В течение 20 дней проводили экспонирование отрезков в световой комнате с фотопериодом 16/8 (день/ночь) при температуре 24 °С. Через 20 дней наблюдали появление первых регенерантов. Селективно отобранные регенеранты переносили на твердую питательную среду для дальнейшего размножения. В результате селективного отбора было получено 40 линий регенерантов.

Таким образом, в результате проведенных исследований был найден новый нуклеотидный вариант гена *TaWCS120*. Наличие устойчивых нуклеотидных замен может быть связано с полиморфизмом генов дегидринов, что привело к образованию собственной нуклеотидного варианта гена *WCS120* у пшеницы мягкой сорта Иркутская. Была создана генетическая векторная конструкция на основе плазмиды pRI 101-AN со встроенным геном *TaWSC120*, получен штамм *A. tumefaciens* со встроенной

конструкцией. Проведена агробактериальная генетическая трансформация эксплантов *Populus × berolinensis* геном *TaWCS120* в результате которой было селективно отобрано 40 клонов растений. Дальнейшая работа будет направлена на подтверждение трансформации с помощью ПЦР анализа и на оценку уровня экспрессии гена *TaWCS120* в геноме полученных трансгенных линий тополя берлинского.

Авторы благодарят ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН за предоставленный доступ к аналитическому оборудованию.

Литература

Éva C., Téglás F., Zelenyánszka H., Tamásb C., Juhász A., Mészárosb K., Tamás L. Cold inducible promoter driven Cre-lox system proved to be highly efficient for marker gene excision in transgenic barley // *Journal of biotechnology*. – 2018. – V. 265. – P. 15–24.

Holsters M., de Waele D, Depicker A, Messens E., van Montagu M., Schell J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* // *Molecular and general genetics*. – 1978. – V. 163 (2). – P. 181–187.

Limin A.E., Houde M., Chauvin L.P., Fowler D.B., Sarhan F. Expression of the cold-induced wheat gene *Wcs120* and its homologs in related species and interspecific combinations // *Genome*. – 1995. – V. 38 (5). – P. 1023–1031.

Mészáros K., Éva C., Kiss T., Bányai J., Kiss E., Téglás F., Láng L., Karsai I., Tamás L. Generating marker-free transgenic wheat using minimal gene cassette and cold-inducible Cre/Lox System // *Plant molecular biology reporter*. – 2015. – V. 33 (5). – P. 1221–1231.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – V. 15. – P. 473–497.

Sarhan F., Ouellet F., Vazquez-Tello A. The wheat *wcs120* gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals // *Physiologia Plantarum*. – 1997. – V. 101 (2). – P. 439–445.

GENETIC TRANSFORMATION OF *POPULUS BEROLINENSIS* BY *WCS120* DEHYDRIN GENE FROM SOFT WHEAT

E.D. Zolotovskaya^{1,2}, M.V. Protopopova¹, A.D. Konovalov^{1,2}, V.V. Pavlichenko¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, marina.v.protopopova@gmail.com, vpavlichenko@gmail.com

²Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, zolotovskayaelenad@gmail.com, konovalov.alexey.d@gmail.com

Abstract. The present study is devoted to creation of genetically modified berlin poplar transformed by dehydrin *TaWCS120* gene from soft wheat (Irkutsk variety). As a result of regenerants selection, 40 clones of the berlin poplar were obtained. A new nucleotide variant of the dehydrin *WCS120* gene from soft wheat (Irkutsk variety) was found.

Keywords: genetic transformation, berlin poplar, cold resistance, dehydrins, soft wheat Irkutsk variety

КУЛЬТУРА СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК *SORGHUM BICOLOUR L. IN VITRO*

К.М. Искакова¹, Б.Б. Анапияев¹, Е.Б. Бейсенбек¹, А.Ш. Омарова²,
Ш.Р. Тузелбаева¹

¹Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный исследовательский технический университет имени К.И. Сатпаева», Институт химических и биологических технологий, Алматы, Казахстан, bak_anapiyayev@mail.ru

²Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, Алмалыбак, Казахстан

Аннотация. В работе приведены результаты исследований по культивированию соматических клеток сахарного сорго (*Sorghum bicolor* L.), выращенных в условиях Юго-Востока Казахстана. Соматические клетки сахарного сорго были культивированы в модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга (2 мг/л 2,4-Д, 20 г/л сахароза, 100 мг/л мезоинозит, рН 5,7) при 27 °С. Были выделены генотипы сахарного сорго, способные максимально образовывать морфогенные каллусы в культуре соматических клеток *in vitro*.

Ключевые слова: сахарное сорго, *Sorghum bicolor* L., культура соматических клеток, *in vitro*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1248-1252

Сорго – пятая по важности зерновая культура после пшеницы, кукурузы, риса и ячменя. Пищевое сорго используется в качестве продукта питания в 30 странах для более, чем 500 миллионов человек, проживающих в тропической Африке и Южной Азии. Кормовое сорго является основным ингредиентом для приготовления корма для крупного рогатого скота, птицы и свиней. Сахарное сорго выращивается в промышленных масштабах для производства сиропа, солода, крахмала и белка [Cifuentes et al., 2014]. Также сахарное сорго является перспективным сырьем для производства биоэтанола [Almodares, Hadi, 2009]. Учитывая огромный потенциал, сахарное сорго является очень перспективной культурой многоцелевого использования [Сарсенбаев, 2014].

В последнее время интенсивно исследуются биотехнологические методы культивирования соматических и репродуктивных клеток сахарного сорго [Zegada-Lizarazu, Monti, 2012]. Также сорго является прекрасным объектом для генетической трансформации [Elkonin et al., 2016]. Биотехнологические методы культивирования клеток сорго *in vitro* является источником изменчивости и может успешно использоваться в мутационной селекции [Elkonin, 2005]. Для ускорения селекционного процесса и увеличения эффективности отбора успешно используются методы молекулярного маркирования сортов и гибридов сахарного сорго [Lekgari, Dweikat, 2014]. Интенсивно развиваются и совершенствуются методы и методологии биотехнологии сахарного сорго. Проводятся фундаментальные и прикладные исследования по культивированию соматических и репродуктивных клеток сорго *in vitro* [Maqbool et al., 2001].

Вместе с тем, имеется много нерешенных вопросов и проблем для широкого использования биотехнологических методов в практической селекции сахарного сорго. В связи с этим, нами были проведены исследования по изучению факторов, влияющих на частоту формирования морфогенных каллусов в культуре соматических клеток сахарного сорго, выращенных в условиях Юго-Востока Казахстана.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили сорта и гибриды сахарного сорго: SABB-1, SAB-2, SAB-3, SAB-10, SAB-11, Hybrid-1 и Hybrid-2. Донорные растения выращивали в темно-каштановой почве в аридных условиях

Юго-Востока Казахстана. Для выделения соматических клеток донорные растения выращивались до фазы молочной спелости. В стерильных условиях незрелые зародыши были выделены и помещены в питательные среды Мурасиге-Скуга с нашими модификациями, которые содержали 20 г/л сахара, 5 мг/л Fe-хелат, 100 мг/л мезоинозит, 2 мг/л 2,4-Д, рН-5,7. Культивирование соматических клеток сахарного сорго осуществляли в темноте при 27 °С. Статистический анализ полученных результатов проводили по общепринятой методике.

Результаты и их обсуждение. При культивировании соматических клеток сахарного сорго было отмечено, что на частоту формирования каллусных клеток и их морфологию значительное влияние оказывали исходный генотип донорного растения (табл. 1). По частоте образования каллусных тканей высокие показатели были обнаружены у гибрида Hybrid-2 (69,11 %), генотипов SAB-3 (43,83 %), SABB-1 (42,31%) и SAB-10 (40,32%).

Средние показатели по частоте образования каллусных тканей были обнаружены у генотипов SAB-11 и Hybrid-1, где частота образования каллусных клеток составила 36,70%) и 25,33%, соответственно. Низкий показатель образования каллусных тканей был обнаружен у генотипа SAB-2, где частота каллусогенеза составила 4,47%.

Таблица 1.

Каллусогенез в культуре соматических клеток сахарного сорго (*Sorghum bicolor* L.) *in vitro*

№	Генотип	Количество изолированных зародышей	Количество полученных каллусов	% каллусогенеза
1	SABB-1	52	22	42,31
2	SAB-2	67	3	4,47
3	SAB-3	73	32	43,83
4	SAB-10	62	25	40,32
5	SAB-11	79	29	36,70
6	Hybrid-1	75	19	25,33
7	Hybrid-2	68	47	69,11

Полученные каллусы из соматических клеток сахарного сорго отличались по морфологии и морфогенетическому потенциалу. Большинство полученных каллусов были неморфогенными, состояли, в основном, из рыхлых паренхимных клеток (рис. 1).

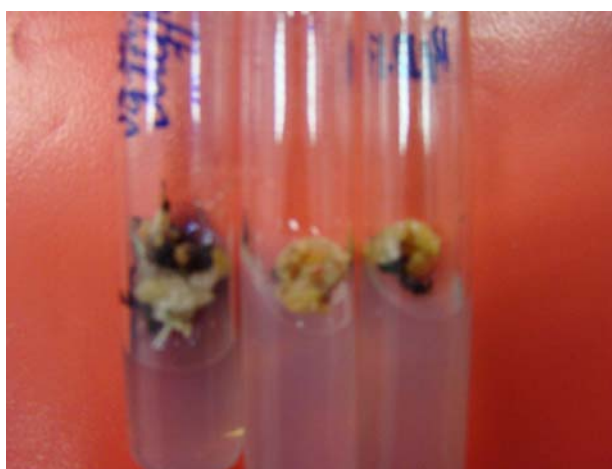


Рис. 1. Рыхлые неморфогенные каллусы, полученные в культуре соматических клеток *in vitro* сахарного сорго (*Sorghum bicolor* L.).

При культивировании соматических клеток сахарного сорго основной проблемой для большинства генотипов являются фенольные соединения, которые выделяются соматическими клетками на седьмой-десятый день культивирования *in vitro*. Фенольные соединения – вещества ароматической природы, содержащие одну или несколько гидроксильных групп ароматического кольца [Harborne, Williams, 1992]. Их классифицируют в зависимости от числа ароматических колец и количества присоединенных к ним атомов углерода и разделяют на три большие подгруппы: с одним и двумя ароматическими кольцами, а также полимерные фенольные соединения. Иногда в особую группу выделяют димерные фенольные соединения. Фенольные соединения проявляют сильное действие на рост растений, тормозя прорастание семян, удлинение стеблей и корней. В то же время они обладают фитонцидными свойствами и обеспечивают иммунитет растений к грибной и, особенно, бактериальной инфекции. Для ингибирования образования фенольных соединений часто в питательные среды добавляют активированный уголь, аскорбиновую кислоту и диоксид кремния [Сторожик и др., 2015]. Фенолы являются основной причиной некроза клеток и препятствуют росту каллусных клеток сахарного сорго *in vitro*. Поэтому нами были отдельно изучены генотипы, которые были способны формировать морфогенные каллусы, состоящие из плотных тканей с интенсивно делящимися меристематическими клетками (рис. 2).

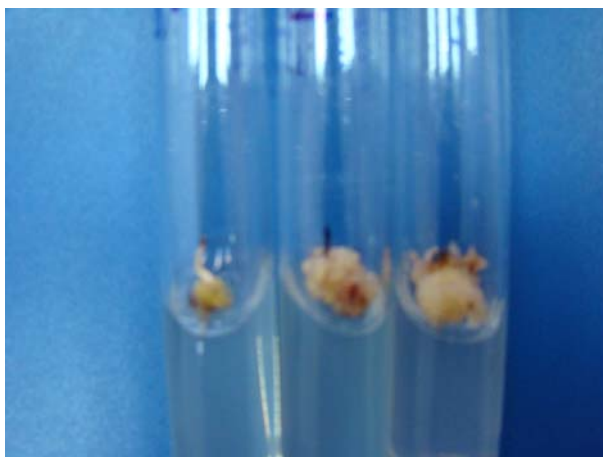


Рис. 2. Морфогенные каллусы, полученные в культуре соматических клеток *in vitro* сахарного сорго (*Sorghum bicolor* L.).

Плотные морфогенные каллусы имели белый цвет и были способны к интенсивному делению и размножению при пассировании на новые питательные среды. При изучении частоты образования морфогенных каллусов в культуре соматических клеток сахарного сорго были выделены следующие генотипы: Hybrid-2 и SAB-3, где частота образования морфогенных каллусов составил 27,94% и 23,28%, соответственно (табл. 2).

Средние показатели частоты образования морфогенных каллусов при культивировании соматических клеток сахарного сорго были обнаружены у генотипов Hybrid-1 и SAB-10, где частота образования морфогенных каллусов составили 16,0% и 12,90%, соответственно. Низкие показатели образования морфогенных каллусов при культивировании соматических клеток на питательной среде Мурасиге-Скуга (2 мг/л 2,4-Д) сахарного сорго были обнаружены у генотипов SAB-11 и SAB-1, где частота образования морфогенных каллусов составила 7,59% и 2,99%, соответственно. В наших экспериментах у генотипа SAB-2 не было обнаружено образования морфогенных каллусов при культивировании соматических клеток *in vitro*.

Таблица 2.

Частота образования морфогенных каллусов в культуре соматических клеток *in vitro* сахарного сорго *Sorghum bicolor* L.

№	Генотип	Количество изолированных зародышей	Количество полученных морфогенных каллусов	% образования морфогенных каллусов
1	SABB-1	52	9	2,99
2	SAB-2	67	0	0
3	SAB-3	73	17	23,28
4	SAB-10	62	8	12,90
5	SAB-11	79	6	7,59
6	Hybrid-1	75	12	16,0
7	Hybrid-2	68	19	27,94

Таким образом, нами было обнаружено, что частота образования каллусов при культивировании соматических клеток сахарного сорго *in vitro*, выращенных в условиях Юго-Востока Казахстана, зависит от исходного генотипа. Также были обнаружены генотипы сахарного сорго, способные образовывать морфогенные каллусы, которые можно использовать в клеточной селекции на устойчивость к биотическим и абиотическим стрессовым факторам окружающей среды.

Литература

Сарсенбаев Б.А. Сорго сахарное перспективная культура многоцелевого использования // Известия НАН РК. Сер. биологическая и медицинская. – 2014. – № 3. – С. 3–9.

Сторожик Л.И., Войтковская В.И., Недяк Т.Н. Ингибирование фенольных соединений сорго сахарного *in vitro* // <http://sci-article.ru/stat.php>, SCI-ARTICLE.RU. – 2015. – № 21. – С. 17–26.

Almodares A., Hadi M.R. Production of bioethanol from sweet sorghum: A review // A. J. of Agricultural Research. – 2009. – V. 4 (9). – P. 772–780.

Cifuentes R., Dressani R., Rols C. The potential of sweet sorghum as a source of ethanol and protein // Energy for Sustainable Development. – 2014. – V. 21. – P. 13–19.

Elkonin L.A. Dominant male sterility in sorghum: effect of nuclear background on inheritance of tissue-culture-induced mutation // Theor. Appl. Genet. – 2005. – V. 111. – P. 1377–1384.

Elkonin L.A., Italienskaya J.V., Domanina L.V. et al. Transgenic sorghum with improved digestibility of storage proteins obtained by Agrobacterium-mediated transformation // R. J. of Plant Physiology. – 2016. – V. 63, No. 5. – P. 678–689.

Harborne J. B., Williams C.A. Advances in flavonoid research since 1992 // Phytochemistry. – 2000. – V. 55. – P. 481–504.

Lekgari A., Dweikat I. Assessment of genetic variability of 142 sweet sorghum germplasm of diverse origin with molecular and morphological markers // O.J. of Ecology. – 2014. – No. 4. – P. 372–393.

Maqbool S.B., Devi P., Sticklen M.B. Biotechnology: Genetic improvement of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2001. – V. 37. – P. 504–515.

CULTURE OF SOMATIC CELLS OF *SORGHUM BICOLOUR L. IN VITRO*

K.M. Iskakova¹, B.B. Anapiyayev¹, Y.B. Beisenbek¹, A.S. Omarova², S.R. Tuzelbayeva¹

¹The Kazakh National Research Technical University after K.I. Satpaev, Institute of Chemical and Biological Technologies, Almaty, Kazakhstan, bak_anapiyayev@mail.ru

²Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Growing, Almalybak, Kazakhstan

Abstract The results of researches on cultivation of somatic cells of sugar sorghum (*Sorghum bicolor* L.) grown in the conditions of the Southeast of Kazakhstan are given. Somatic cells of sugar sorghum were cultured in a modified Murashige-Skoga medium (2 mg /l 2,4-D, 20 g/l sucrose, 100 mg/l meso-inositol, pH 5.7) at 27 °C. Were found the genotypes of sugar sorghum, which were able to form morphogenic calluses in the culture of somatic cells *in vitro*.

Keywords: *sugar sorghum, Sorghum bicolor L., somatic cell culture, in vitro*

АНАЛИЗ МОТИВОВ 5'-НТО *A. thaliana*

К.В. Кабардаева^{1,2}, А.А. Тюрин¹, О.А. Гра¹, В.С. Фадеев¹, О. Мустафаев²,
И.В. Голденкова-Павлова¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, kabardaewa@yandex.ru

²Бакинский государственный университет, Баку, Азербайджан, orkhan@bioset.org

Аннотация. Результаты биоинформатического анализа позволили выявить следующую закономерность: средний размер 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) для большинства генов *A. thaliana* с высоким уровнем экспрессии варьирует от 80 до 120 п.н. со средним содержанием GC – 36,5%. На основании результатов выравнивания определена консенсусная 5'-НТО как новый регуляторный элемент, который потенциально может обеспечить высокоэффективную экспрессию и синтез целевого продукта в растениях. Эта последовательность имеет размер 87 п.н. и GC содержание – 35,6%. Продemonстрировано, что консенсусная 5'-НТО обеспечивает увеличение накопления бирепортерного белка более, чем на 25%, тем самым выступает в качестве потенциального позитивного регуляторного элемента в эффективности трансляции.

Ключевые слова: растения, 5'-нетранслируемая область, трансляция, экспрессия генов

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1253-1254

Применение растений для наработки целевых белков позволяет частично или полностью решить ряд проблем, возникающих при экспрессии гетерологичных генов в других организмах. Но, наряду с этим, существует потребность контролировать экспрессию целевых генов в растительных системах более точно, по возможности, имея достаточный уровень рекомбинантного белка, при этом, не меняя в значительной степени биохимический профиль клеток-продуцентов, и обеспечивая стабильность целевых белков и их доступность для выделения. Следует отметить, что 5'-НТО представляется весьма важным регуляторным элементом, способным оказать разнообразное влияние на обеспечение стабильности мРНК и эффективность ее трансляции. Поэтому, на наш взгляд, при разработке кассет для экспрессии трансгенов в растениях важно учитывать состав области, предшествующей стартовому кодону. Поиску консенсусной 5'-НТО для генов растений, на примере *A. thaliana*, и оценки ее влияния на эффективность трансляции гетерологичного гена в растительных клетках и посвящена данная работа. Для того, чтобы выяснить есть ли взаимосвязь между уровнем экспрессии гена (на этапе трансляции) и наличием или отсутствием у него 5'-НТО, мы провели теоретические и экспериментальные исследования. Результаты биоинформатического анализа позволили выявить следующую закономерность: средний размер 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) для большинства генов *A. thaliana* с высоким уровнем экспрессии варьирует от 80 до 120 п.н. со средним содержанием GC – 36,5%. На основании результатов выравнивания определена консенсусная 5'-НТО как новый регуляторный элемент, который потенциально может обеспечить высокоэффективную экспрессию и синтез целевого продукта в растениях. Эта последовательность имеет размер 87 п.н. и GC содержание – 35,6%. Продemonстрировано, что консенсусная 5'-НТО обеспечивает увеличение накопления бирепортерного белка более, чем на 25%, тем самым выступает в качестве потенциального позитивного регуляторного элемента в эффективности трансляции.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда №18-04-00026.

MOTIVES ANALYSIS OF *A. thaliana* 5'-UTR

K.V. Kabardaeva¹, A.A. Turin¹, O.A. Gra¹, V.S. Fadeev¹, O. Mustafae²,
I.V. Goldenkova-Pavlova¹

¹K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia,
irengold58@gmail.com

²Baku State University, Baku, Azerbaijan, *orkhan@bioset.org*

Abstract. The results of bioinformatic analysis revealed the following regularity: the average size of the 5'-untranslated region (5'-UTR) for most *A. thaliana* genes with a high level of expression varies from 80 to 120 bp. with an average GC content of 36.5%. Based on the alignment results, a consensus 5'-UTR is defined as a new regulatory element that can potentially provide highly efficient expression and synthesis of the desired product in plants. This sequence is 87 bp in size. and GC content of 35.6%. It has been demonstrated that the consensus 5'-UTR provides an increase in the accumulation of bireporter protein by more than 25%, thereby acting as a potential positive regulatory element in the translation efficiency.

Keywords: *plants, 5'-untranslated region, translation, expression of genes*

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА ГРИБЫ РОДА *FUSARIUM* L.

Е.А. Калашникова, Р.Н. Киракосян

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва, Россия, *kalash0407@mail.ru*

Аннотация. Приводятся результаты по влиянию экстрактов, полученных из растений-регенерантов и каллусной ткани *Origanum vulgare* L., *Astragalus* L., *Mentha longifolia* L., *Hedysarum grandiflorum* L., *Xanthium strumarium* L., на рост грибов рода *Fusarium* L. Экстракты, полученные из каллусной ткани, обладали меньшей антифунгицидной активностью, по сравнению с растениями-регенерантами. Экстракты из *Astragalus* L. обладали наибольшей антифунгицидной активностью, а из *Mentha longifolia* L. – наименьшей.

Ключевые слова: растительные экстракты, *Fusarium*, *in vitro*, лекарственные растения

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1255-1257

Лекарственные растения являются одним из важных ресурсов нашей страны. Они с давних времен применяются в лечебных и профилактических целях в медицине и ветеринарии. Использование растений в качестве лекарств пришло в наш век из древности и до сих пор играет значительную роль в арсенале лекарственных средств современной медицины. С конца XX в. значение растительных лекарственных препаратов стало возрастать. Лекарственные растительные препараты из них обладают мягким действием, дают стойкий эффект, редко вызывают побочные реакции, легко выводятся из организма [Бахтенко, Курапов, 2008].

Особые группы препаратов, изготавливаемых из лекарственных растений на химико-фармацевтических заводах, составляют продукты первичной переработки растений (жирные и эфирные масла, смолы и прочие), чистые (без примеси балластных веществ) суммы действующих веществ, индивидуальные химические соединения и их комбинации. Действующие вещества распределены в лекарственных растениях неравномерно. Обычно используются лишь те части растения, где накапливается максимальное количество действующих веществ. Состав и количество действующих веществ в лекарственных растениях изменяется в течение года, с возрастом растения и в зависимости от условий его местообитания, температуры, освещенности, влажности воздуха, почвенных условий и др. [Тайкова, Теплицкая, 2010].

40% всех лекарственных средств, которые применяются в отечественной медицине, – это препараты растительного происхождения [Бахтенко, Курапов, 2008]. В связи с тем, что растения имеют тенденцию постепенно исчезать, то в нашей стране намечены определенные мероприятия по их сохранению: 1) проводить увеличение видового состава фармацевтических растений, представляющих интерес для медицины; 2) проводить сбор растительного сырья в максимальные сроки синтеза веществ вторичного метаболизма; 3) при необходимости заменить листовое сырье на всю вегетирующую массу при сборе и переработке лекарственных растений; 4) использовать наиболее эффективные растворители и способы разделения экстрактов на фракции для более полного использования перерабатываемого сырья.

В связи с тем, что в последнее время наметилась тенденция уменьшения растительных ресурсов, обладающих медицинскими и фармакологическими свойствами, из-за не контролируемого осуществления сбора растительного сырья, все это привело к применению новых подходов получения такого сырья [Бутенко, 1986]. Одним из перспективных методов является культивирование клеток и тканей на искусственных питательных средах *in vitro*.

Продуктивность лекарственных растений рассчитывается по двум параметрам: товарная масса (корни, цветы, зеленые части) и содержание действующих веществ. Учитывать эти показатели эффективнее в контролируемых условиях, а не в естественных ареалах произрастания. Кроме того, культивирование в условиях *in vitro* позволяет оптимизировать процессы, которые будут направлены на увеличение биосинтеза интересующего продукта [Молканова, 2009].

В настоящее время является актуальным поиск новых биологически активных соединений, обладающих антимикробными, противовирусными, антигрибковыми свойствами и получаемых из растительного сырья.

Объектом исследования служили растительные экстракты, полученные из растений-регенерантов или каллусной ткани некоторых лекарственных растений (душица обыкновенная (*Origanum vulgare* L.), 8 видов растений рода *Astragalus* L., мята длиннолистная (*Mentha longifolia* L.), копеечник крупноцветковый (*Hedysarum grandiflorum* L.), дурнишник обыкновенный (*Xanthium strumarium* L.)), которые выращивали на питательных средах разного гормонального состава. За основу была взята питательная среда, в которую включены минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга, а также сахара 3% и агар 0,8%.

Растительные экстракты получали из сухой биомассы, которую тщательно растирали в ступке, после чего гомогенизированную массу экстрагировали 98%-ным спиртом в течение 1 часа. Полученный экстракт затем дважды пропускали через фильтровальную бумагу с целью разделения ее на жидкую и твердую фракции. Полученную жидкую фракцию высушивали и определяли вес сухого вещества, который в дальнейшем использовали в работах на чистой культуре грибов рода *Fusarium* L. Сухой остаток растворяли в DMSO.

Определение фунгицидной активности растительных экстрактов проводили на чистой культуре грибов *Fusarium culmorum* (штамм М-10-1, выделенный из растений пшеницы, 2009 г., Московская область) и *Fusarium sporotrichioides* Sherd (штамм ОР-14-1, выделенный из растений, пшеницы, 2014, Орловская область). Данные штаммы были выделены и идентифицированы сотрудниками лаборатории микологии Института фитопатологии РАН. Концентрация экстракта составила 30, 60, 100 мг/л. Контролем служила среда без экстракта, а также чистый растворитель (DMSO). Фунгицидную активность растительных экстрактов определяли по росту мицелий гриба.

Исследования показали, что изучаемые экстракты обладают в той или иной степени антифунгицидной активностью, которая зависит от источника получения экстракта, его концентрации, вида растений, а также от исследуемого штамма фитопатогена. Так, было установлено, что исследуемые экстракты оказали различное токсическое действие на рост мицелия гриба *Fusarium culmorum* и *Fusarium sporotrichioides* Sherd. Причем это действие явно проявлялось на грибах *Fusarium sporotrichioides* Sherd и практически отсутствовало на грибах *Fusarium culmorum*.

Следует отметить, что экстракты, полученные из каллусной ткани, обладали меньшей антифунгицидной активностью по сравнению с экстрактами, полученными из растений-регенерантов. Причем данная ответная реакция изучаемых фитопатогенов (*Fusarium sporotrichioides* Sherd, *Fusarium culmorum*) на действие двух различных экстрактов была одинаковой.

Из всех растительных экстрактов наибольшей антифунгицидной активностью обладали экстракты, полученные из растений-регенерантов рода *Astragalus* L., а наименьшей – мята длиннолистная (*Mentha longifolia* L.), копеечник крупноцветковый (*Hedysarum grandiflorum* L.), дурнишник обыкновенный (*Xanthium strumarium* L.), ашваганда занимала промежуточное положение.

Таким образом, использование растений-регенерантов как источник вторичных метаболитов имеет, несомненно, прикладное значение для создания новых биологических препаратов в борьбе с опасными фитопатогенами. Все это позволит в дальнейшем снизить пестицидную нагрузку на растения, почву и окружающую среду. Однако для промышленного использования необходимо разрабатывать технологии, обеспечивающие культивирование дедифференцированных клеток, обладающих высоким биосинтетическим потенциалом синтеза вторичных метаболитов.

Литература

Бахтенко Е.Ю., Курапов П.Б. Многообразие вторичных метаболитов высших растений: учебное пособие. – Вологда, 2008. – 266 с.

Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – 280 с.

Молканова О.И. Генетические банки растений в ботанических садах России // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. Ялта, – 2009. – Т. 131. – С. 22–27.

Тайкова В.П., Теплицкая Л.М. Влияние света на ростовые характеристики *Astragalus dasyanthus* Pall. // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2010. – Т. 23 (62), № 2. – С. 157–162.

THE EFFECT OF DIFFERENT PLANT EXTRACTS ON THE FUNGI OF THE GENUS *FUSARIUM* LINK

E.A. Kalashnikova, R.N. Kirakosyan

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Russian Timiryazev State Agrarian University”, Moscow, Russia, kalash0407@mail.ru

Abstract. The results on the effect of extracts obtained from regenerated plants and callus tissue *Origanum vulgare* L., *Astragalus* L., *Mentha longifolia* L., *Hedysarum grandiflorum* L., *Xanthium strumarium* L., on the growth of fungi of the genus *Fusarium* L. Extracts obtained from callus tissue had less antifungal activity than regenerative plants are presented. Extracts from *Astragalus* L. had the highest antifungal activity, and from *Mentha longifolia* L. – the smallest.

Keywords: plant extracts, *Fusarium*, *in vitro*, medicinal plants

РЕГУЛЯЦИЯ НЕКОТОРЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ГЕНОТИПОВ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO* В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ

С.Ф. Караев¹, З.С. Киёмова¹, Н.Н. Назарова², К.А. Алиев²

¹Таджикский национальный университет, Душанбе, Республика Таджикистан, *Venera_2002@mail.ru*

²Институт ботаники, физиологии и генетики растений Академии наук Республики Таджикистан, Душанбе, Республика Таджикистан, *Lab.gen@mail.ru*

Аннотация. Экспериментально показано, что добавление в культурную среду выращивания картофеля в условиях *in vitro* регулятора роста паклубутарозола (ПБ) способствовало повышению солеустойчивости. На фоне повышенной концентрации NaCl под действием ПБ сырая масса побегов и корней увеличивалась.

Ключевые слова: картофель, стресс, засоление, регулятор роста

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1258-1263

В последние годы регуляторы роста растений находят все большее применение для повышения урожайности в условиях экологических стрессов, таких как водный дефицит, засуха и засоление [Кузнецов, Дмитриева, 2006].

Солевой стресс оказывает влияние на урожайность большинства сельскохозяйственных культур. По данным ООН около 20% сельскохозяйственных и 50% пахотных земель мира подвергаются засолению. Таджикистан в этом отношении не является исключением, большие площади пахотных земель подвержены засолению в связи с нарушением мелиоративных систем и воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды [Алиев, 2012].

Соль ингибирует продукционный процесс и рост растений из-за нарушения водной гомеостазы, токсичности ионов и ионного дисбаланса [Алиев, 2012]. Показано, что у растений в разной степени снижается поглощение необходимых питательных веществ из-за засоленного почвенного субстрата и, следовательно, ингибируется активность эндогенных ростовых гормонов [Романов, 2009]. Более того, накопление солей в почвенном субстрате резко снижает осмотический потенциал почвы, главным образом из-за водного дефицита, что приводит к водному стрессу. В связи с этим определенный интерес представляет изыскание ростовых регуляторов, ослабляющих действие солевого стресса на растение. Нами ранее было показано, что паклубутразол (ПБ) – синтетический регулятор роста, ингибируя ростовые процессы пробирочных растений, резко стимулировал образование микроклубней *in vitro* [Шукурова и др., 2007; Назарова и др., 2011]. Другие исследователи показали, что ПБ ослаблял действие солевого стресса на растения гуавы, виноградной лозы [Mehomachi et al., 1996; Хайихадеми и др., 2009] и пшеницы, на стадии опыления [Хайихадеми и др., 2009]. ПБ также используют в качестве регулятора роста в садоводстве и цветоводстве для снижения размера растений, придавая им компактность [Хайихадеми и др., 2009].

В связи с этим определенный интерес представляет изыскания ростовых регуляторов, ослабляющих действие солевого стресса на растение.

Объектом исследования служили широкораспространенный в Таджикистане сорт «Пикассо» (не устойчивый к NaCl) и гибрид картофеля (397077.16), полученный из Международного Центра Картофеля (Перу, Лима) и отобранный нами путем скрининга на устойчивость к хлористому натрию. Впоследствии клон-гибрид (Сip 397077.16), устойчивый к NaCl, получил название сорт «Файзабад» и клон-гибрид сорт «Таджикистан».

Солевой стресс ингибировал высоту побегов пробирочных растений у обоих генотипов картофеля. Высота побегов зависела от концентрации NaCl в культуральной среде выращивания растений. У сорта «Файзабад» ингибирование побегов наблюдалось при всех, использованных в эксперименте концентрациях NaCl (1%; 1,5%; 2%).

Действие регулятора роста на параметры роста растений картофеля, культивируемых при разной степени засоления, можно было наблюдать при 2% концентрации NaCl. При 1% концентрации NaCl снижение роста составляло примерно 50% от контроля. Снижение роста побегов пробирочных растений наблюдалось также и у солечувствительного сорта «Пикассо». Ингибирование роста у этого сорта плавно возрастало при повышении концентрации соли в культуральной среде. Но, сорт «Пикассо» оказался более чувствительным к высокому содержанию соли в культуральной среде. Уже при концентрации 1% NaCl ростовые процессы у сорта «Пикассо» прекратились и составили примерно 10-12% от контроля, а при концентрации 1,5% NaCl практически прекратилось образование побегов.

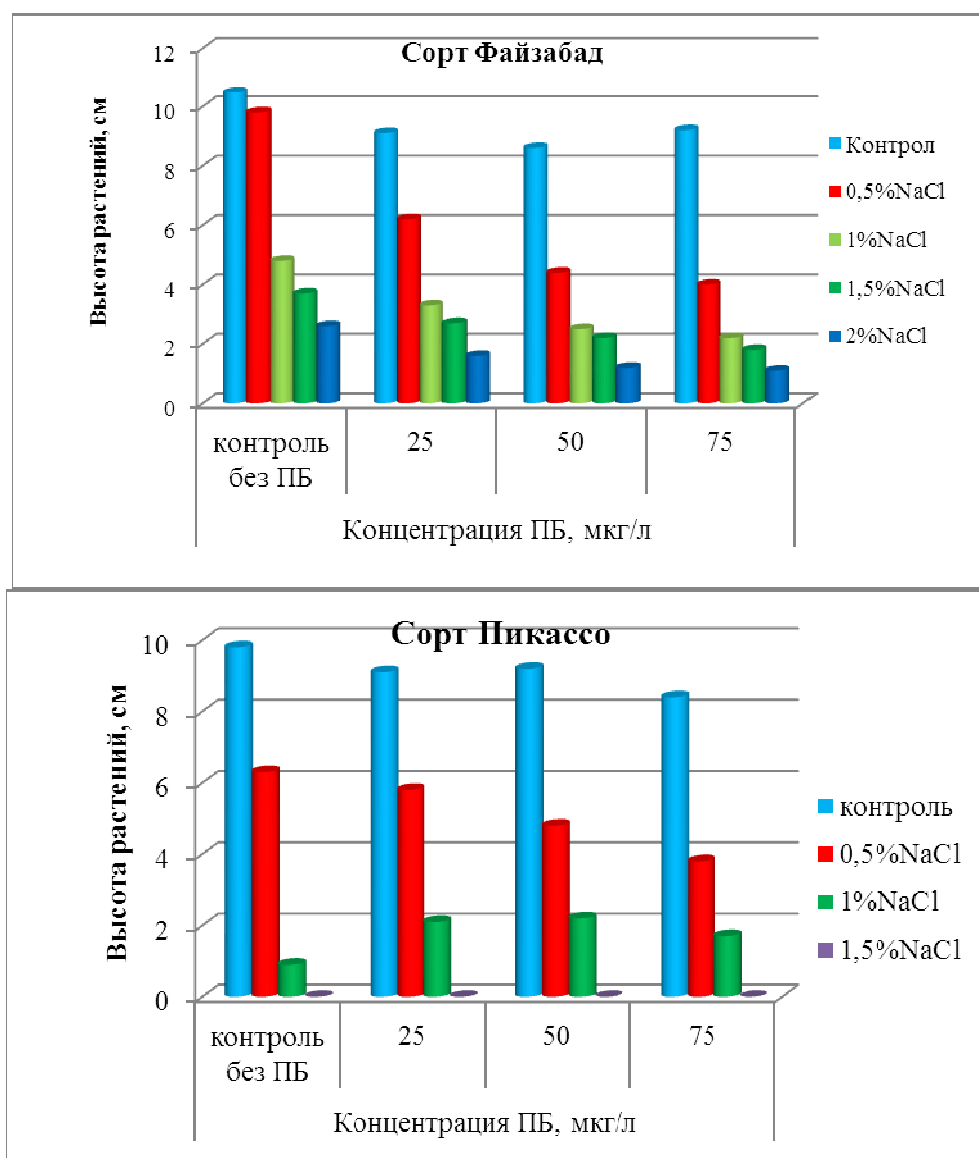


Рис. 1. Действие регулятора роста на высоту побегов разночувствительных сортов картофеля в условиях засоления.

Таким образом, полученные результаты, свидетельствуют о том, что высота побегов ингибировалась в зависимости от повышения концентрации NaCl в культуральной среде, а степень изменения параметров роста растений имела генотипический характер. Ростовые процессы солеустойчивого сорта «Файзабад» ингибировались при низких концентрациях соли, а у солеустойчивого сорта «Файзабад» - при повышенной концентрации соли.

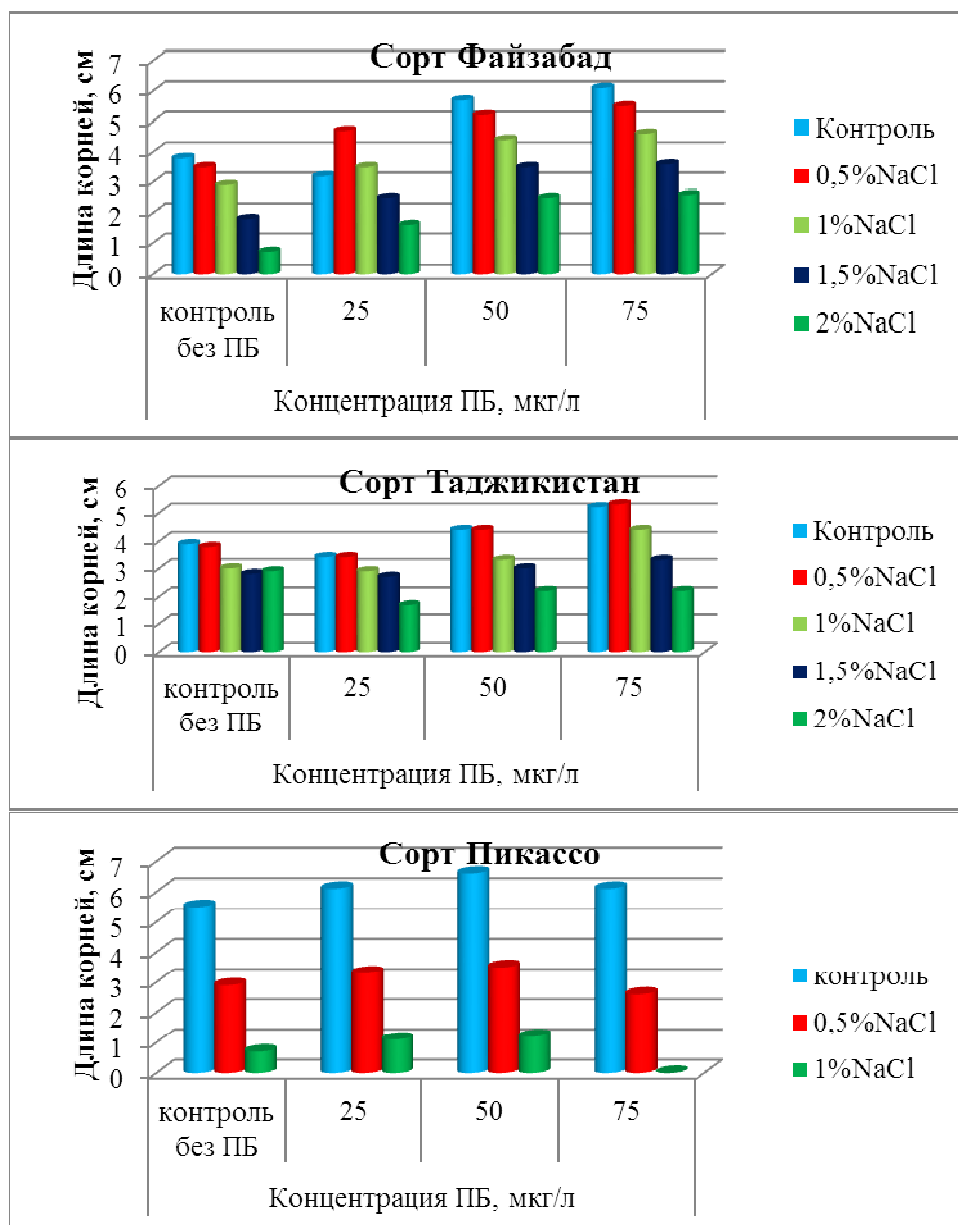


Рис. 2. Действие регулятора роста на длину корней разных сортов картофеля в условиях засолении.

Добавление в культуральную среду ПБ на фоне NaCl также приводило к снижению роста побега пробирочных растений у изученных сортов картофеля. Следует отметить, что введение в культуральную среду ПБ несколько усиливало корнеобразование у солеустойчивого сорта «Файзабад» и «Таджикистан», а также у солеустойчивого сорта «Пикассо». ПБ на фоне низкой концентрации NaCl несколько усиливал длину корней, и этот процесс зависел от его концентрации в

культуральной среде. Представленные результаты (рис. 2), показывают, что солеустойчивый сорт «Файзабад» и «Таджикистан» сильнее реагировали на увеличение концентрации ПБ, чем солечувствительный сорт «Пикассо».

Различие было связано с тем, что солеустойчивый сорт «Файзабад» и «Таджикистан» был способен к корнеобразованию при высокой концентрации NaCl на фоне действия ПБ, а у солечувствительного сорта «Пикассо» при низких концентрациях соли, полностью ингибировался и рост, и корнеобразование.

Оптимальная концентрация ПБ для корнеобразования и роста составляла 50 мкг/л, повышение его концентрации до 75 мкг/л не оказывало влияния на длину корней растений. Размер междоузлий оказался более чувствителен к действию ПБ. У исследуемых сортов размер междоузлий уменьшался при повышении концентрации ПБ в культуральной среде выращивания растений в условиях *in vitro*.

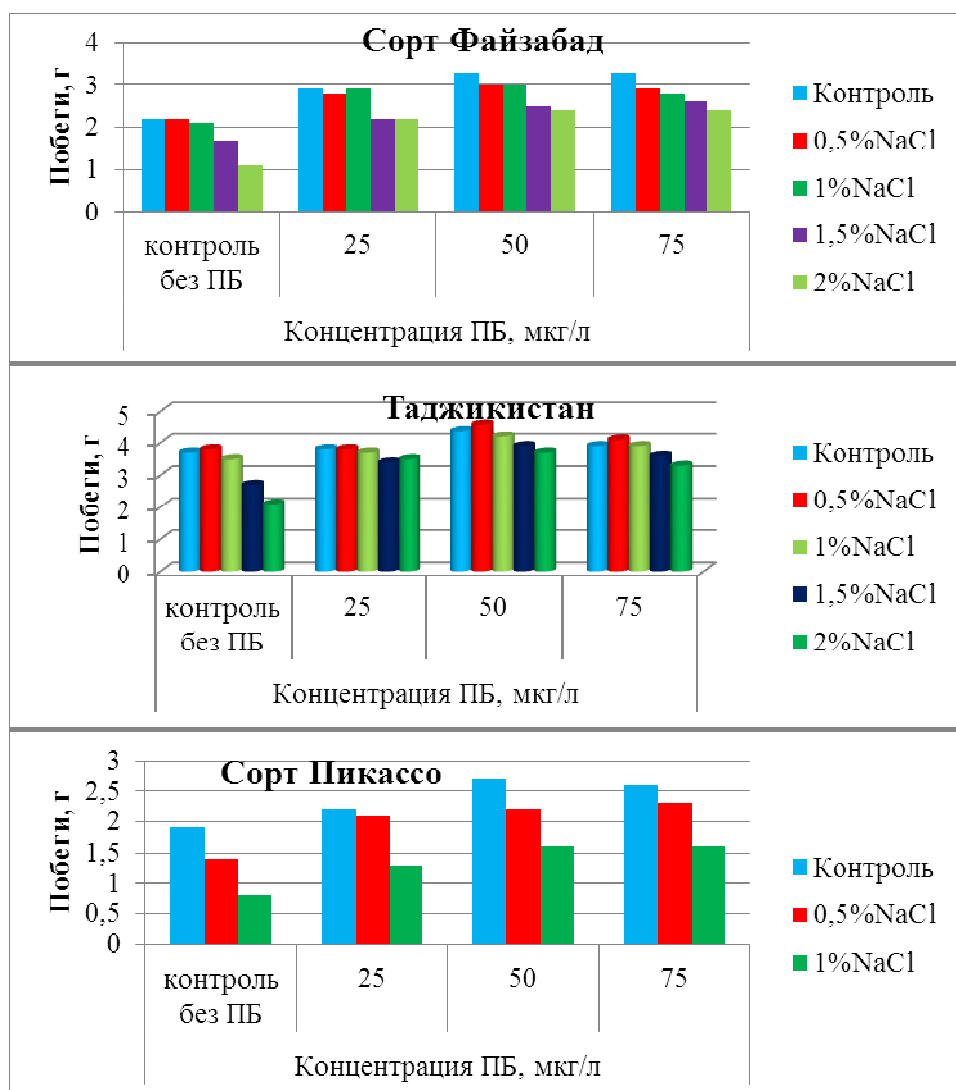


Рис. 3. Сырой вес побегов у генотипов картофеля, г.

Культивирование растений на фоне ПБ (контрольный вариант) несколько увеличило сырую массу побегов у исследованных генотипов картофеля, независимо от степени устойчивости к засолению. Действие ПБ на фоне NaCl также увеличило сырую массу побегов и у солеустойчивых сортов «Файзабад» и «Таджикистан», а также у солечувствительного сорта «Пикассо». Добавление в культуральную среду

выращивания ПБ в концентрации 50 мкг/л повышало сырую массу побегов и корней до максимального уровня, а увеличение его концентрации до 75 мкг/л не оказывало влияния (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что добавление ПБ в культуральную среду выращивания *in vitro* значительно влияет на ростовые процессы у растений картофеля. Повышение концентрации NaCl от 0,5 до 2,0% приводило к более значительному ингибированию роста, но этот процесс сильно зависил от степени устойчивости генотипа к солевому стрессу. Так, солеустойчивый генотип (сорт «Файзабад») стабильно сохранял способность к корнеобразованию даже при 1,5% NaCl в среде культивирования, в то же время сорт «Пикассо» был более подвержен солевому стрессу. У этого сорта повышение концентрации соли в среде культивирования до 1,0% приводило к более сильному торможению роста побега и корней.

Таким образом, торможение ростовых процессов при солевом стрессе имеет генотипическую специфику, что дает возможность на уровне пробирочных растений, в условиях *in vitro*, более точно оценивать устойчивость генотипов к солевому стрессу и другим экстремальным факторам. Такие же результаты были получены ранее и другими исследователями [Хайихамеми и др., 2009].

Наши эксперименты показали, что ПБ более заметно влияет на высоту растений, длину корней и междоузлий, чем солевой стресс. Такое изменение ростовых параметров возможно связано с изменением ауксино-цитокининового баланса под действием ПБ. По данным [Шукурова и др., 2010] снижение ростовых процессов растений происходит в результате триазол-индуцированного ингибирования биосинтеза гиббереллина, который приводит к подавлению высоты растений посредством торможения растяжения междоузлий. Полученные нами результаты также показали, что использование ПБ привело к укорачиванию междоузлий растений картофеля. Очевидно, и на уровне пробирочных растений в условиях *in vitro*, ПБ регулирует биосинтез ростовых веществ и гормонов.

В то же время необходимо констатировать факт, что добавление ПБ в культуральную среду смягчает отрицательное воздействие соли (NaCl) на значение сырой массы корней и побега пробирочных растений. Побеги таких растений (обработанных ПБ) были укороченными, а листья более мелкими, чем у необработанных растений. Снижение этих параметров зависило от увеличения концентрации ПБ в среде культивирования. Следует особо отметить, что влияние ПБ на ростовые процессы имело генотипический характер. У солеустойчивого генотипа (сорта «Файзабад» и Таджикистан) под влиянием ПБ, в условиях солевого стресса, изменения параметров роста, проявились более четко, чем у солевопримчивого сорта «Пикассо».

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о морфофизиологических изменениях, вызванных ПБ, который приводит к повышению солеустойчивости растений. Изменения в росте растений при росте массы побега, корней и микроклубнеобразований в условиях *in vitro*, в условиях солевого стресса, показывают, что разные генотипы растений по-разному реагируют на стресс и требуют разработки системы микроклубнеобразования у разных генотипов, а также индивидуальный подход к каждому клону/сорту.

Литература

Алиев К. Таджикистан: бедность в контексте изменения климата // Национальный отчет о развитии. – 2012. – С. 54–57.

Кузнецов Вл.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. – Москва: Изд-во Академия, 2006. – 742 с.

Назарова Н.Н., Давлятназарова З.Б., Шукурова М.Х., Алиев К.А. Влияние регулятора роста паклбутразола на морфофизиологические параметры у разных генотипов картофеля *in vitro* // Известия АНРТ. – 2011. – № (176). – С. 37–47.

Романов Г.А. Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. – 2009. – Т. 56. – С. 294–311.

Шукурова М., Назарова Н.Н., Давлятназарова З.Б., Салимов А.Ф., Алиев К. Микрорубнеобразование столоновых растений картофеля *in vitro* в зависимости от условия культивирования // Известия АН РТ. – 2007. – №3. – С. 39–44.

Шукурова М.Х., Назарова Н.Н., Давлятназарова З.Б., Азимов М.А., Карло К., Алиев К. Активность антиоксидантных ферментов растений картофеля в условиях солевого стресса в зависимости от формы азота в среде *in vitro* // Известия АН РТ. – 2010. – №2. – С. 37–48.

Хайихамеми Ш., Кайростами Х., Энтемери Ш., Сабора А. Действие паклбутразола на солеустойчивость пшеницы на стадии опыления // Физиология растений. – 2009. – Т. 56. – С. 278–284.

Mehomachi J., Tadeo F.R., Zaragoza S., Promo-Mollo E., Talon M. Effect of gibberellic acid and paclobutrazol on growth and carbohydrate accumulation in shoots and roots of citrus rootstock seedlings // J. Hortic. Sci. – 1996. – V. 71. – P. 747–754.

REGULATION OF SOME MORPHOLOGICAL CHARACTERS OF POTATO GENOTYPES *IN VITRO* IN CONDITIONS OF CONSERVATION

S.F. Karaev¹, Z.S. Qiymova¹, N.N. Nazarova², K. Aliev²

¹Tajik National University, Dushanbe, *Venera_2002@mail.ru*

²Institute of botany, plant physiology and genetics of Academy Science of the Republic of Tajikistan, Dushanbe, *Lab.gen@mail.ru*

Abstract. It was experimentally shown that the addition of a growth regulator of paclobutrazole (PB) to the culture medium of potato growing under *in vitro* conditions was promoted by an increase in salt tolerance. It was increased the raw mass of shoots and roots on the background of increased concentration of NaCl under the action of PB.

Keywords: *potato, stress, salinity, growth regulator*

ДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРА РОСТА НА АНТИОКСИДАНТУЮ СИСТЕМУ У ГЕНОТИПОВ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ

З.С. Киёмова¹, С.Ф. Караев¹, Н.Н. Назарова², Н. Норкулов², К.А. Алиев²

¹Таджикский национальный университет, Душанбе, Республика Таджикистан, *Venera_2002@mail.ru*

²Институт ботаники, физиологии и генетики растений Академии наук Республики Таджикистан, Душанбе, Республика Таджикистан, *Lab.gen@mail.ru*

Аннотация. Определение активности фермента супероксиддисмутазы (СОД) показало, что у разных по солеустойчивости сортов на фоне 0,5% и 1% NaCl при добавлении ПБ (50 мкг/л) в условиях *in vitro* усиливал пропорционально от концентрации соли. Разработана новая среда для микроклубнеобразования сорта «Таджикистан» культивирования *in vitro*, который не сформировал клубни в стандартных условиях.

Ключевые слова: картофель, стресс, засоление, регулятор роста, антиоксиданты, микроклубни *in vitro*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1264-1267

Паклобутразол ((2RS, 3RS)-1-(4-хлорфенил)-4,4-диметил-(1, 2, 4-триазол)-пентан-3-ол) (ПБ) является триазольным регулятором роста растений. Показано, что триазол, катализируя в растениях микросомальные окислительные реакции, ингибирует биосинтез гиббереллиновой кислоты (ГК) и катаболизм абсцизовой кислоты (АБК) [Abou et al., 1997]. ПБ, блокируя биосинтез ГК, ингибирует рост растений [Шукурова и др., 2010; Fletcher et al., 2000]. Вместе с тем, несмотря на мультипротекторные свойства, ПБ, следовательно, имеет способность контролировать абиотические стрессы. Экспериментальные данные о влиянии ПБ на физиолого-биохимические процессы у картофеля в системе *in vitro* не многочисленны. Целью данной работы являлось изучение реакции разнотолерантных растений картофеля на засоление и возможности повышения их устойчивости путем добавления ПБ в культуральную среду в условиях *in vitro*, а также разработка условий микроклубнеобразования новых сортов картофеля.

Объектом исследования служили широко распространенный в Таджикистане сорт «Пикассо» (не устойчивый к NaCl) и гибрид картофеля (397077.16), полученный из Международного Центра Картофеля (Перу, Лима) и отобранный нами путем скрининга на устойчивость к хлористому натрию. Впоследствии клон-гибрид (Cip 397077.16), устойчивый к NaCl, получил название сорт «Файзабад» и клон-гибрид сорт «Таджикистан».

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по методу [Guannopolitis, Ries, 1977] с модификацией, с использованием индикаторной ловушки нитросиний тетразолием (НТС), который переходит в свою восстановленную форму – формазан, имеющий интенсивное сине-фиолетовое окрашивание.

Растения обоих вариантов размножали клонированием *in vitro* на среде Мурасиге и Скуга (МС) [Murashige, Skoog, 1962], содержащей витамины, агар, сахарозу [Методические рек. ..., 1985]. Растения культивировали при +20...+22 °С и 16-часовом освещении люминесцентными лампами белого цвета (4000 люкс).

В эксперименте использовали одноузловые черенки с одним листом, которые высаживали на среду МС, содержащую 2% сахарозу и разные концентрации ПБ (25; 50; 75 мкг/л) в зависимости от задач опыта, с добавлением различной концентрации кинетина и 1-нафтилуксусной кислоты (НУК). Для сорта «Таджикистан» дополнительно использовали новую культивирующую среду с повышением концентрации цитокинина, абсизивую кислоту и 7% сахарозы. Растения

культивировали в течение 28 дней, в обычном режиме культивирования *in vitro*. После этого часть растений переносили в режим клубнеобразования (культивировали в течение 70 дней при температуре +18-22 °С, при 10-часовом освещении).

Нами были проведены эксперименты по действию ПБ на фермент окислительного стресса – супероксиддисмутазу (СОД). Как видно из табл. 1, активность СОД у солеустойчивого сорта «Файзабад» была примерно в 1,5 раза, а у сорта «Таджикистан» в 2,0 раза выше, чем у солечувствительного сорта «Пикассо». Активность СОД у всех сортов на фоне 0,5% и 1% NaCl и при добавлении ПБ (50 мкг/л) в культуральную среду выращивания увеличивалась у всех исследованных сортов, активность СОД на фоне NaCl в культивируемой среде была несколько ниже, чем при концентрации ПБ – 50 мкг/л.

Таблица 1.

**Действие ингибиторов роста на активность супероксиддисмутазы
(ед. активности /г сырой массы)**

Сорт Файзабад		
	активность	% от контроля
контроль (без NaCl и без ПБ)	6,45±2,20	100
контроль (0,5% NaCl без ПБ)	8,04±2,17	125
контроль 1% NaCl без ПБ	9,12±2,34	141
Опыт 0,5% NaCl+ПБ (50 мкг/л)	10,56±2,44	164
Опыт 1% NaCl+ПБ (50 мкг/л)	11,12±2,56	173
Сорт Пикассо		
контроль (без NaCl и без ПБ)	4,52±1,11	100
контроль 0,5% NaCl без ПБ	6,02±1,32	133
контроль 1% NaCl без ПБ	7,12±1,69	157
Опыт 0,5% NaCl+ПБ (50 мкг/л)	8,08±2,46	178
Опыт 1% NaCl+ПБ (50 мкг/л)	9,17±2,52	203
Сорт Таджикистан		
контроль (без NaCl и без ПБ)	8,80±2,72	100
контроль 0,5% NaCl без ПБ	10,11±2,74	115
контроль 1% NaCl без ПБ	11,75±2,88	134
Опыт 0,5% NaCl+ПБ (50 мкг/л)	13,46±2,76	153
Опыт 1% NaCl+ПБ (50 мкг/л)	14,78±2,91	168

Уровень активности СОД у солеустойчивых сортов «Файзабад», «Таджикистан» был гораздо выше, чем у солечувствительного сорта «Пикассо». Но относительное увеличение активности СОД на фоне ПБ у всех генотипов составляло от 125 до 300%. На фоне засолении ПБ усиливал общую активность СОД, наиболее у сорта «Таджикистан», чем у сорта «Пикассо». Эти данные свидетельствуют о наличии факторов повышения солеустойчивости, которые были выявлены при действии ПБ, возможно, связаны с усилением активности СОД, как протекторной системы окислительного стресса. Но в процентном отношении солечувствительный сорт «Пикассо» на фоне засолении и ПБ имел наивысшее усиления, чем устойчивые сорта.

Как видно из табл. 2, использование регулятора ростовых процессов – ПБ привело к возрастанию средней массы микроклубней примерно в 2,5 раза по сравнению с контрольным вариантом, солевосприимчивым сортом «Пикассо». Следует отметить, что ПБ практически не влиял на образование общего количества микроклубней и количество клубней на растение, небольшая разница статистически не достоверна. Такие же результаты были получены с солеустойчивым сортом «Файзабад». У этого сорта масса одного микроклубня при добавлении в среду культивирования ПБ

доходила до 740 мг против контроля (без ПБ) – 410 мг. Особо необходимо отметить, что сорт «Таджикистан» в стандартных условиях клубнеобразования (1,0 мг/л кинетин, 5% сахарозы) практически не сформировал клубни *in vitro*. Но при изменении соотношения кинетина и сахарозы в культивируемой среде был получен достаточно достоверный результат. В этих условиях и на среде, содержащий 1,5 мг/г кинетина, 7% сахарозы и 0,2 мг/г АБК, сорт «Таджикистан» сформировал в среднем 1,7 шт. клубней на растение. Если при стандартных условиях масса одного клубня составляет 78 мг, то при увеличении концентрации кинетина – 1,5 мг/л, 0,2 мг/л АБК и сахарозы 7%, –масса одного клубня была значительно выше (264 мг), т.е. в три раза. Таким образом, нам удалось разработать новую среду для клубнеобразований сорта «Таджикистан» в условиях *in vitro*.

Итак, ПБ оказывает стимулирующее влияние на укрупнение образующихся в культуре *in vitro* микроклубней. Это может быть связано с ингибированием биосинтеза гиббереллина и метаболизации АБК и других гормонов (цитокинины), посредством добавления в среду культивирования ПБ. Более того, ПБ не только стимулирует нарастание массы микроклубней *in vitro*, но и повышает устойчивость растений к солевому стрессу. Но разные генотипы картофеля по-разному реагируют на солевой стресс, что, по-видимому, зависит от функционирования антиоксидантных систем растений.

Таблица 2.

Действие регулятора роста на микроклубнеобразование картофеля *in vitro*

Варианты	Количество пробирочных растений, шт.	Общее количество микроклубней, шт.	Общая масса клубней, г	Средняя масса 1 клубня, г	Количество клубней/растений, шт.
Сорт Пикассо					
Контроль (МС без ПБ)	76	92	17,03	370±0,4	1,2±0,1
Опыт (МС+ПБ (50 мкг/л))	62	103	32,3	801±0,7	1,6±0,2
Опыт (МС+ПБ (75 мкг/л))	72	93	21,5	0,365±0,4	1,3±0,1
Сорт Файзабад					
Контроль (МС без ПБ)	84	112	18,25	410±5	1,3±0,2
Опыт (МС+50 мкг/л ПБ)	92	108	38,47	740±8	1,4±0,2
Опыт (МС+75 мкг/л ПБ)	84	108	23,3	403±4	2,8±0,2
Сорт Таджикистан					
Контроль (стандартная среда МС без ПБ) + 1,0 мл/л кинетин + 5% сахароза	50	0	0	0	0
Опыт (50 мкг/л ПБ+1 мг/л кинетин+ 5,0% сахароза)	50	0	0	0	0
Опыт (50 мкг/л ПБ+1,5 мг/л кинетин + 0,2 мг/л АБК +7% сахароза)	50	87	23,4	269±5	1,74±0,2

Механизмы устойчивости могут быть связаны с функционированием ферментов антиоксидантных систем растений, а также накоплением свободного пролина [Шукурова и др., 2010]. На самом деле ПБ повышает активность СОД у всех генотипов, но у устойчивого сорта она была больше, чем у солевоприимчивого генотипа картофеля. В условиях солевого стресса у изученных генотипов активность СОД

усиливается по разному, а добавление регулятора роста усиливает активности фермента у сорта «Файзабад» и «Таджикистан» на 170%, а у солеустойчивого сорта «Пикассо» на 200%.

Механизм повышения солеустойчивости, вызванный ПБ, может быть подобен механизмам физиологических систем солеустойчивости растений. ПБ способен повысить солеустойчивость даже у солевоприимчивых генотипов картофеля, но в меньшей степени, чем повреждения, вызванные солевым стрессом. Во всех вариантах на фоне соли ПБ усиливал активность СОД.

Концентрация ПБ в 50 мкг/л является оптимальной для удвоенного повышения массы микроклубней в условиях *in vitro*, что имеет практическое значение для получения оздоровленного первичного семенного материала. Возможно, его использование в полевых условиях повысит устойчивость растений к стрессовым воздействиям и урожайность. Выявление особенностей функционирования антиоксидантной системы у разных по устойчивости растений в условиях стрессовых воздействий требует проведение дальнейших исследований.

Литература

Шукурова М.Х., Назарова Н.Н., Давлятназарова З.Б., Азимов М.А., Карло К., Алиев К. Активность антиоксидантных ферментов растений картофеля в условиях солевого стресса в зависимости от формы азота в среде *in vitro* // Известия АН РТ. – 2010. – № 2. – С. 37–48.

Abou E.L., Khashab A.M., EL-Sammak A.F., Elaidy A.A., Saloma M.J. Paclobutrazol reduces some negative effect of stress in peach // J. Am. Soc. Hortic. Sci. – 1997. – V. 122. – P. 43–46.

Fletcher R., Jilley A., Davis T.D., Sanklna N. Triazoles as plants growth regulators and stress hrotectants // Hortic. Rev. – 2000. – No. 24. – P. 130–138.

Guannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutase's occurrence in higher plants // Plant physiol. – 1977. – V. 59, No. 2. – P. 309–314.

Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 21. – P.473–497.

EFFECT OF GROWTH REGULATORS ON THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN POTATO GENOTYPES IN THE CONDITIONS OF SALINIZATION

Z.S. Qiymova¹, S.F. Karaev¹, N.N. Nazarova², N. Norqulov², K. Aliev²

¹Tajik National University, Dushanbe, *Venera_2002@mail.ru*

²Institute of botany, plant physiology and genetics of Academy Science of the Republic of Tajikistan, Dushanbe, *Lab.gen@mail.ru*

Abstract. Determination of the activity of the superoxide dismutase enzyme (SOD) showed that in different varieties of salt tolerance on the background of 0.5% and 1% NaCl during the addition of PB (50 µg / l) under *in vitro* conditions, increased proportionally to the salt concentration. It was developed a new medium for microtuber formation of the cultivar "Tajikistan" *in vitro*, which did not form tubers under standard conditions.

Keywords: potato, stress, salinity, growth regulator, antioxidants, microtubers *in vitro*

ИЗМЕНЕНИЕ АЦИДОФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ H^+ -АТФазы ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ТАБАКА VBI-0

А.А. Кирпичникова, Т. Чэнь, С.Б. Теплякова, М.Ф. Шишова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия, nastin1972@mail.ru

Аннотация. Рост растяжением растительных клеток является их уникальной особенностью. В основе реализации этого процесса лежит работа такого фермента, как H^+ -АТФаза плазмалеммы. Синхронизированная суспензионная культура клеток табака позволяет изучать изменения активности H^+ -АТФазы на разных стадиях развития. Наибольшая активность транспорта протонов характерна для клеток, характеризующихся максимальной интенсивностью роста. Этот процесс ингибировался ортованадатом натрия и присутствием ионов Ca^{2+} .

Ключевые слова: H^+ -АТФаза плазмалеммы, рост растяжением

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1268-1271

Рост растяжением является уникальной особенностью растительных клеток. В ходе роста растяжением происходит активный транспорт протонов во внеклеточное пространство, что связано с работой H^+ -АТФазы плазмалеммы. Интенсивность роста растяжением имеет ткане- и органоспецифичность. Поэтому в качестве модельного объекта была использована суспензионная культура клеток *Nicotiana tabacum* (VBI-0, *Virginia Bright Italia*). Преимуществом данной культуры является физиологическая однородность клеток, которые обладают способностью к синхронному переходу из одной фазы клеточного цикла в другую [Nagata et al., 1992]. Для данной культуры весь цикл развития составляет 21 день. На 3-6 сутки клетки активно делятся с образованием цепи из 4-8 клеток. В последующий период происходит синхронное прекращение клеточного деления, начинается рост клеток растяжением и в дальнейшем постепенная дезинтеграция клеточных цепей с формированием отдельных клеток популяции (рис. 1) [Zazimalova et al., 1993].

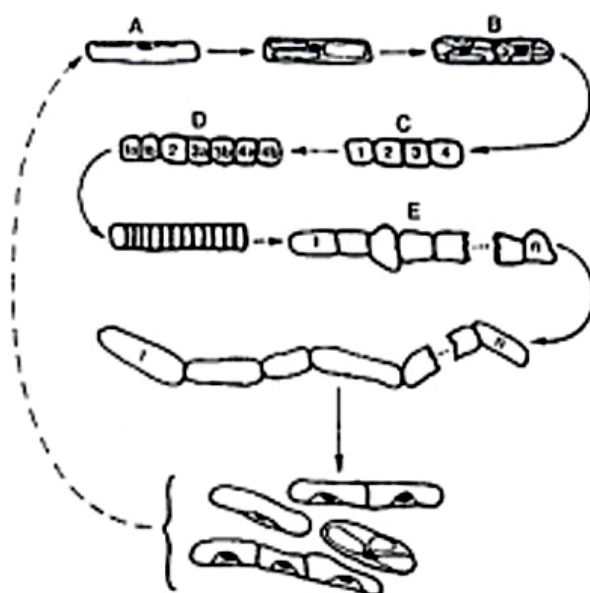


Рис. 1. Цикл развития клеток культуры табака (Zazimalova et al., 1993).

Суспензию клеток культивировали в темноте при температуре 26°C, при постоянном перемешивании на ротационном шейкере (при 110 оборотах в минуту). В работе были использованы клетки в возрасте 7, 14 и 21 суток.

Для определения интенсивности подкисления клетками табака был использован краситель-индикатор бромкрезоловый пурпуровый. Обычно этот краситель используют в диапазоне от pH 5.0 до 7.0 (рис. 2). В стерильную чашку Петри (диаметром 40 мм) вносили 4 мл культуральной среды с добавлением 10% раствора бромкрезолового пурпурового и 0,7% агара (pH 7.0). В каждую чашку Петри помещали 2,5 г клеток табака и проводили сканирование каждые 15 мин (общая продолжительность эксперимента составляла 2 часа). В дальнейшем изображение преобразовывали в черно-белое и определяли интенсивность окрашивания с помощью программы ImageJ [Чэнь и др., 2015].



Рис. 2. pH-зависимое изменение окрашивания бромкрезолового пурпурового.

В ходе предыдущих исследований с использованием везикулярной фракции плазмалеммы, полученной из клеток суспензионной культуры табака VBI-0, было показано, что гидролитическая активность H^+ -АТФазы плазмалеммы изменяется нелинейно и была максимальной на 14 день развития (рис. 3). В наших экспериментах, проведенных с использованием нативных клеток, проанализирована протон-транспортирующая активность фермента, выявленная по интенсивности закисления среды культивирования.

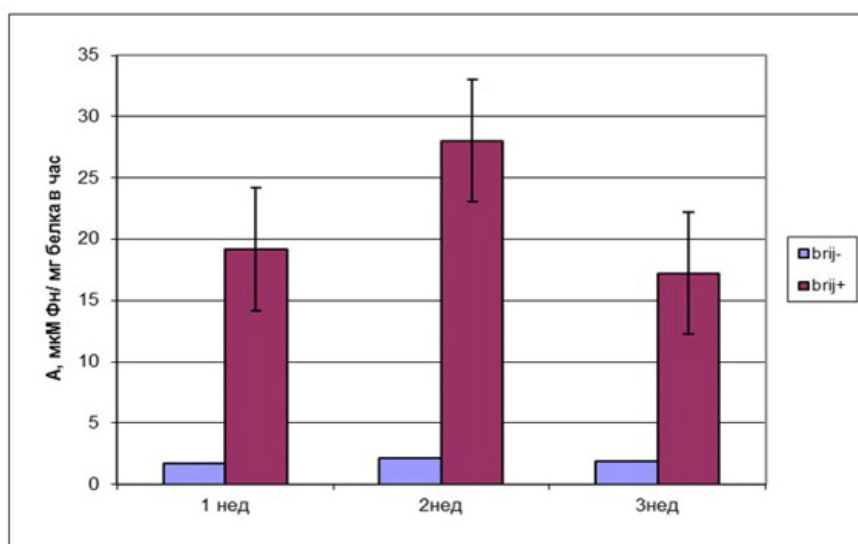


Рис. 3. Изменение гидролитической активности H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток табака суспензионной культуры VBI-0.

Было выявлено, что ацидофицирующая активность, также как и гидролитическая, достигала максимума на 14 день. Доказательство того, что данный процесс закисления опосредован активацией протонной помпы плазматической мембраны было доказано в

экспериментах с применением специфичного ингибитора – орто-ванадата натрия (рис. 4). Предобработка клеток раствором ингибитора в течение 2х часов приводила к значительному снижению изменения окраски индикатора.

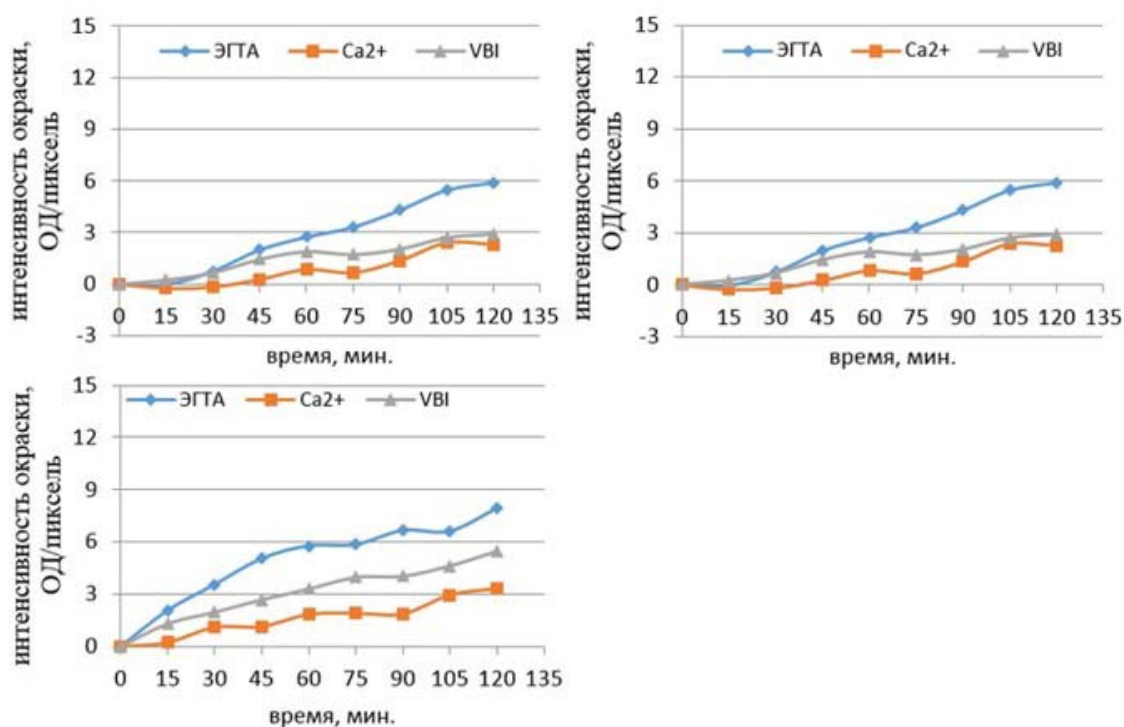


Рис. 4. Изменение ацидофицирующей активности H^+ -АТФазы плазмалеммы улеток суспензионной культуры табака VBI-0 в среде, содержащей Ca^{2+} или ЭГТА.

Показано, что наиболее чувствительными были клетки в возрасте 7 дней. Разница составляла около 50% по сравнению с 14 и 21 дневными клетками. Выявленное увеличение активности H^+ -АТФазы могло быть объяснено как усилением активности фермента, так и изменением числа ферментативных комплексов в составе плазмалеммы. Хорошо известно, что рост растяжением регулируется фитогормоном ауксином посредством изменения активности фермента, однако в наших экспериментах экзогенное внесение гормона не вызвало статистически достоверного изменения амплитуды закисляющей способности клеток. Наряду с этим известно, что первичные этапы трансдукции ауксинового сигнала включают в себя увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме. Ранее нами было показано, что этот процесс зависит от содержания кальция во внешней среде [Shishova, Lindberg 2004]. В связи с этим была проведена серия экспериментов, в которой анализировали амплитуду закисления при модуляции содержания кальция. Изменение окраски индикатора анализировали после прединкубации клеток в среде, содержащей ионы Ca^{2+} или среды с хелатором ЭГТА. Выявлено, что у всех трех возрастов закисление среды было больше в варианте с добавлением ЭГТА, особенно в возрасте 14 дней (рис. 4). Предполагается, что поступление кальция в цитоплазму при инициации роста растяжением приводит к кратковременному ингибированию H^+ -АТФазы плазмалеммы, что и отражается в снижении протонтранспортирующей работы фермента, особенно на этапе интенсивного роста клеток на 14 день развития.

Таким образом, клетки суспензионной культуры табака VBI-0 при усилении роста растяжением характеризуются увеличением закисляющей способности, за счет активации работы протонной помпы плазмалеммы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00743, с использованием оборудования Ресурсного центра СПбГУ “Развитие молекулярных и клеточных технологий”.

Литература

Чэнь Т., Михайлова Ю.В., Романюк Д.А., Шишова М.Ф. Тест-система визуализации закисляющей способности клеток суспензионной культуры табака. // Естественные и технические науки. – 2015. – № 12 (90). – С. 11–15.

Nagata T., Hasezawa S., Inze D. Tobacco By-2 Cells // Springer. – 2004. – 347 p.

Shishova M., Lindberg S. Auxin induces an increase of Ca^{2+} concentration in the cytosol of wheat leaf protoplasts // J. Plant Physiology. – 2004. – V. 161. – P. 937–945.

Zazimalova E., Opatrny Z., Brezinova A., Eder F. The effect of auxin starvation on the growth of auxin-dependent tobacco cell culture: dynamics of auxin-binding activity and endogenous free IAA content // J. Exp. Bot. – 1993. – V. 46. – P. 1205–1213.

CHANGE OF ACIDIFYING ACTIVITY PLASMA MEMBRANE H^+ -ATPase IN VBI-0 TOBACCO SUSPENSION CULTURE CELLS

A.A. Kirpichnikova, T. Chen, S.B. Teplyakova, M.F. Shishova

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Saint-Petersburg State University", Saint-Petersburg, Russia, *nastin1972@mail.ru*

Abstract. Plant cell elongation is a unique process. It is based on the activity of plasma membrane H^+ -ATPase. Tobacco cells of synchronized suspension culture VBI-0 is useful model object to investigate H^+ -ATPase activity at different growth stages. Proton transport activity was the most intensive at the stage of maximum elongation growth. Acidification was inhibited by Na-ortho vanadate and in presence of Ca^{2+} .

Keywords: H^+ -ATPase plasmalemma, growth by stretching

ИЗУЧЕНИЕ ИМПОРТА ДНК В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ РЕКОНСТРУКЦИИ

Е.С. Клименко, В.Н. Шмаков, Т.А. Болотова, И.Ю. Субота, В.И. Тарасенко,
М.В. Кулинченко, Ю.М. Константинов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *katia.klimenko@gmail.com*

Аннотация. Изолированные митохондрии растений обладают способностью импортировать молекулы ДНК. В данной работе импорт ДНК проводили в реконструированной системе, включающей изолированные митохондрии клубней картофеля и микросомальную фракцию (фрагментированные мембраны ЭР). Обнаружен стимулирующий эффект микросомальных мембран на активность импорта ДНК в митохондрии. Мы предполагаем, что, помимо митохондриальных белков, в импорте ДНК в условиях *in vivo* могут принимать участие и белки ЭР.

Ключевые слова: митохондрии, импорт ДНК, эндоплазматический ретикулум (ЭР), микросомальная фракция, *Mitochondria-associated ER Membranes (MAMs)*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1272-1275

В настоящее время известно, что важную роль в нормальном функционировании митохондрий играет постоянное взаимодействие этих органелл с эндоплазматическим ретикулумом (ЭР) [Samaga et al., 2010; Lebedzinska et al., 2009]. Структурные взаимодействия митохондрий и ЭР достигаются за счет формирования белковых комплексов, что оказывает значительное влияние на морфологию митохондрий, процессы их слияния и деления, репликацию мтДНК, передачу различного рода сигналов и ионов (в особенности ионов кальция), а также импорт белков в митохондрии [Kornmann et al., 2009, 2010; Wiedemann et al., 2009]. Межмембранные контакты митохондрий и ЭР необходимы также для импорта в митохондрии синтезируемых в ЭР липидов [Flis, Daum, 2013].

Ранее нами было показано, что изолированные митохондрии растений обладают способностью импортировать молекулы ДНК [Koulintchenko et al., 2003]. Мы предполагаем, что набор участвующих в импорте ДНК белков не ограничивается порином (VDAC) в наружной мембране и адениннуклеотидтранслоказой (АНТ) во внутренней мембране органелл [Koulintchenko et al., 2003]. Импорт молекул ДНК в митохондрии растений может происходить с участием дополнительных белковых факторов. Нельзя исключить, что структурно-функциональные комплексы в зонах мембранных контактов, участвующие в процессах обмена различных метаболитов между ЭР и митохондриями, могут оказывать свое влияние также и на транспорт ДНК в митохондрии. В данной работе впервые была предпринята попытка осуществить реконструкцию внутриклеточных взаимодействий митохондрий картофеля (*Solanum tuberosum*) и эндоплазматического ретикулума с целью изучения влияния мембран ЭР на импорт ДНК. Для этого импорт ДНК в системе *in organello* проводили в присутствии общей микросомальной фракции (фрагментированных мембран ЭР) нескольких видов растений. Ранее подобный способ реконструкции внутриклеточных взаимодействий между митохондриями и ЭР был использован для изучения транспорта липидов в изолированные митохондрии дрожжей и млекопитающих [Vance, 1990; Achleitner et al., 1999].

В результате проведенного исследования обнаружен значительный стимулирующий эффект микросомальных мембран на активность импорта ДНК в

изолированные митохондрии картофеля. Присутствие 5 мкг микросомальной фракции усиливало импорт фрагмента ДНК размером 717 п.н. примерно в 30 раз (рисунок, А). Для контроля специфичности влияния микросомальной фракции на импорт ДНК использовали сопоставимые количества БСА (бычьего сывороточного альбумина) и мембранную фракцию тонопласта свеклы (*Beta vulgaris L.*). Добавление в среду инкубации БСА также приводило к определенной активации импорта ДНК, в особенности, при тестировании в экспериментах максимального количества белка (5 мкг) стимулирующий эффект составлял 3 – 4 раза. В то же время добавление в среду инкубации фракции тонопласта свеклы не оказывала влияние на импорт ДНК в митохондрии (рисунок, А).

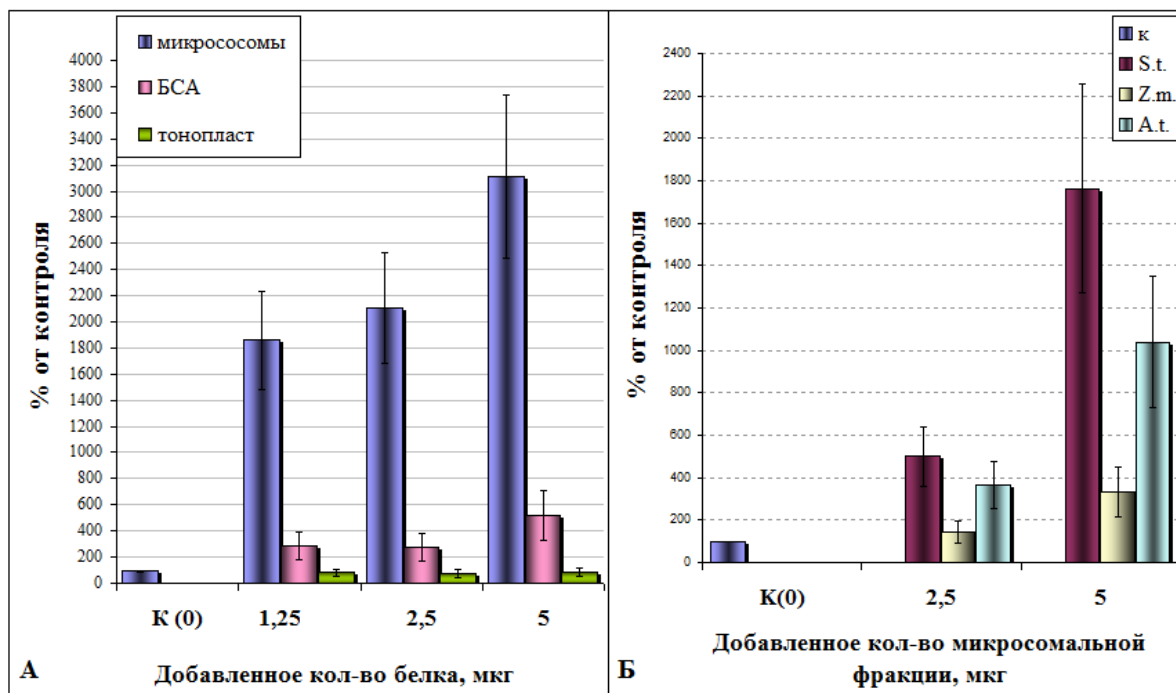


Рисунок. Импорт ДНК в изолированные митохондрии *S. tuberosum* в присутствии микросомальной фракции. Анализ эффективности импорта фрагментов ДНК длиной 717 п.н. (А). К(0) - импорт ДНК в изолированные митохондрии (контроль без фракций), (1,3; 2,5 и 5 мкг) - в присутствии белков нативной микросомальной фракции, БСА или мембранной фракции тонопласта *B. vulgaris L.* (Б) Импорт фрагмента ДНК длиной 717 п.н. в присутствии микросомальной фракции, выделенной из клубней картофеля (S.t), этиолированных проростков кукурузы (Z.m.) или 3-недельных проростков арабидопсиса (A.t.). Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени.

Установлено, что активирующее влияние микросомальной фракции имеет выраженный видоспецифический характер. Активация транспорта ДНК в митохондрии такого представителя двудольных растений как картофель в присутствии микросом, полученных из двудольных растений (*Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana*), была значительно выше по сравнению с эффектом микросомальной фракции кукурузы (*Zea mays*), представителя однодольных (рисунок, Б).

С целью выявления специфичности влияния мембранной фракции ЭР нами протестировано проявление эффекта микросом на импорт ДНК в митохондрии и митопласты (митохондрии, у которых была удалена внешняя мембрана). Добавление в среду инкубации 5 мкг микросомальной фракции стимулировало импорт ДНК в

изолированные митохондрии картофеля, в среднем в 20-29 раз, а в митопласты – в 4-6 раз. Таким образом, для активации импорта ДНК необходимо взаимодействие микросомальной фракции либо с внешней мембраной митохондрий, либо с контактными сайтами обеих митохондриальных мембран. Очевидно, что именно белки внешней мембраны митохондрий играют ключевую роль в формировании структурно-функциональных комплексов между митохондриями и мембранными структурами ЭР.

Несмотря на то, что в настоящее время состав этих белковых комплексов в растениях остается практически не изучен, на основании полученных данных мы предполагаем, что, помимо митохондриальных белков, в формировании определенных каналов/пор, способствующих импорту ДНК в митохондрии в условиях *in vivo*, очевидно, могут принимать участие и белки ЭР.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-04-00603), с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

Achleitner G., Gaigg B., Krasser A., Kainersdorfer E., Kohlwein S.D., Perktold A., Zellnig G., Daum G. Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact // *Eur J Biochem.* – 1999. – V. 264 (2). – P. 545–553.

Camara A.K.S., Lesnevsky E.J., Stowe D.F. Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria // *Antioxidants & Redox Signaling.* 2010. – V. 13 (3). – P. 279–347.

Flis V.V. and Daum G. Lipid transport between the endoplasmic reticulum and mitochondria // in: *The Endoplasmic Reticulum. A Subject Collection from Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (eds. Ferro-Novick S., Rapoport T.A. and Schekman R.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. 2013. – P. 109–130.

Kornmann B., Currie E., Collins S.R., Schuldiner M., Nunnari J., Weissman J.S., Walter P. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen // *Science.* – 2009. – V. 325. – P.477–481.

Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // *EMBO J.* – 2003. – V. 22 (6) – P. 1245–1254.

Lebedzinska M., Szabadkai G., Jones A.W.E., Duczynski J., Wieckowski M.R. Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membranes and other subcellular organelles // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2009. – V. 41. – P. 1805–1816.

Vance J.E. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria // *J. Biol. Chem.* –1990. –V. 265 (13). – P. 7248–7256.

Wiedemann N., Meisinger C., Pfanner N. Connecting organelles // *Science.* – 2009. – V. 325. – P.403–404.

STUDY OF DNA IMPORT INTO PLANT MITOCHONDRIA USING THE RECONSTRUCTION METHOD

E.S. Klimenko, V.N. Shmakov, N.A. Bolotova, Subota I.Yu., V.I. Tarasenko,
M.V. Koulintchenko, Yu.M. Konstantinov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian
Academy of Sciences, Russia, *katia.klimenko@gmail.com*

Abstract. Isolated plant mitochondria have the ability to import DNA molecules. In this study, the import of DNA was carried out in a reconstituted system consisting of isolated mitochondria of potato tubers and microsomal fraction (fragmented membrane of endoplasmic reticulum). It was shown that microsomal fraction stimulates the DNA transport into isolated plant mitochondria. We assume that, in addition to mitochondrial proteins, ER proteins can participate in DNA import *in vivo*.

Keywords: *mitochondria, DNA import, microsomal fraction, endoplasmic reticulum (ER), Mitochondria-associated ER Membranes (MAMs)*

ИЗУЧЕНИЕ ИМПОРТА ДНК РАЗНОЙ ДЛИНЫ И СТРУКТУРЫ В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ

Ю.М. Константинов^{1,3}, Т.А. Болотова¹, А. Dietrich², F. Weber-Lotfi²,
М.В. Кулинченко^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия, yukon@sifibr.irk.ru

²Institute of Molecular Biology of Plants, CNRS, Strasbourg, France

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

Аннотация. Изучены кинетика митохондриального импорта ДНК-субстратов 265 п.н., 2732 п.н. и 9 т.п.н, а также их конкурентные взаимоотношения в процессе импорта в митохондрии клубней картофеля (*Solanum tuberosum*). Фланкирование субстрата импорта 9 т.п.н. концевыми инвертированными повторами митохондриальной плазмиды 11,6 т.п.н. *Brassica napus* приводило к усилению импорта ДНК в митохондрии репы, картофеля и арабидопсиса. Сделано заключение о существовании нескольких путей импорта ДНК в митохондрии растений.

Ключевые слова: митохондрии, импорт ДНК, концевые инвертированные повторы, *Solanum tuberosum*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1276-1279

По современным представлениям природный механизм переноса нуклеиновых кислот в митохондрии высших организмов может стать основой для создания эффективных технологий направленной доставки генов в эти органеллы. Ранее нами установлен феномен природной компетентности митохондрий растений к поглощению (импорту) ДНК, участие в котором принимают порин (VDAC) и адениннуклеотидтранслоказы (АНТ), соответственно, в наружной и внутренней мембранах этих органелл [Koulintchenko et al., 2003]. Со временем стало очевидным, что набор факторов импорта ДНК не ограничивается этими белками, а сам процесс реализуется с участием нескольких нерасшифрованных пока механизмов [Weber-Lotfi et al., 2015]. Целью данной работы было выявление потенциальных альтернативных путей транспорта ДНК разной длины и структуры в митохондрии растений.

Концентрация субстрата является одним из основных факторов, определяющих скорость ферментативных реакций. Ранее Scherag (1973) показал, что работа АНТ может быть описана в рамках кинетики односубстратной ферментативной реакции. Мы предположили, что формирующие мембранную пору для транспорта ДНК переносчики (АНТ и другие), обладают разным сродством к ДНК. Это сродство, в свою очередь, может зависеть от длины молекулы ДНК, метаболического состояния митохондрий и других факторов. На рис. 1 представлены потенциальные варианты кинетики импорта, определяемые конкретным задействованным механизмом трансмембранного переноса ДНК. Определение кинетики импорта ДНК в митохондрии *S. tuberosum* для субстратов малой (265 п.н.) и средней (2732 п.н.) длины выявило существенные различия между кинетическими кривыми. Для ДНК-субстрата 265 п.н. кинетика импорта описывалась кривой, имеющей линейный характер (рис. 1, Г), тогда как кинетическая кривая импорта ДНК-субстрата 2732 п.н. имела сложный характер с несколькими выходами на плато (рис. 1, Д). Обнаруженные различия кинетических кривых импорта ДНК разной длины служат важным аргументом в пользу представлений о множественности путей митохондриального транспорта ДНК.

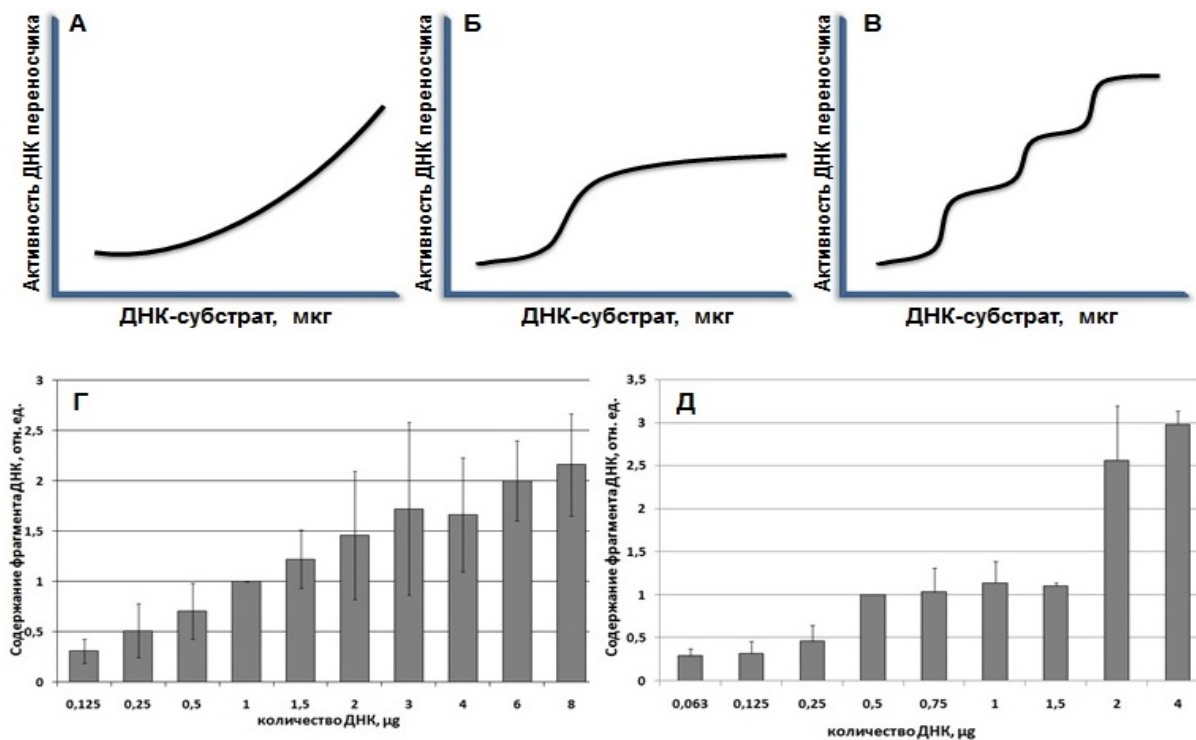


Рис. 1. А-В. Схемы вариантов кинетики импорта ДНК в митохондрии. А. Отсутствие насыщения процесса. Импорт ДНК не зависит от специфического белкового переносчика; Б. Насыщение процесса. Импорт ДНК реализуется с участием одного переносчика; В. Ступенчатое насыщение процесса. Импорт ДНК происходит при участии нескольких переносчиков. Г и Д. Определение кинетики импорта ДНК в митохондриях *S. tuberosum*. Инкубацию ДНК с митохондриями (100 мкг) проводили в течение 10 мин. Экстрагированную из митондрией ДНК анализировали методом количественной ПЦР. Представлено содержание фрагмента GFP в пробах ДНК после импорта фрагментов 265 п.н. (Г) и 2732 п.н. (Д), нормированное на содержание эндогенного гена *nad4*. Количество импортировавшегося субстрата в пробах «1 мкг» и «0,5 мкг» для фрагментов 265 п.н. и 2732 п.н., соответственно, принято за условную единицу.

Особенностью организации генома митондрией ряда высших растений является наличие видоспецифических наборов кольцевых и линейных плазмид. Особого внимания с точки зрения конструирования генетических векторов для манипуляций с митондриями заслуживают линейные плазмиды, содержащие на концах молекулы концевые инвертированные повторы (КИП). Одной из задач данной работы было выяснение роли КИП в импорте ДНК большой длины. Как показано ранее [Ibrahim et al., 2011], линейная плазида 11,6 т.п.н. митондрией *Brassica napus* может импортироваться в митондриии репы (*B. rapa*) лишь при наличии на концах инвертированных повторов (327 п.н.). Нами установлено, что фланкирование концевыми инвертированными повторами этой плазмиды фрагмента ДНК (длиной 9 т.п.н.) с нуклеотидной последовательностью, не имеющей отношения к плазмиде, приводит к усилению импорта ДНК такой длины не только в митондриии репы, но также картофеля и арабидопсиса (рис. 2).

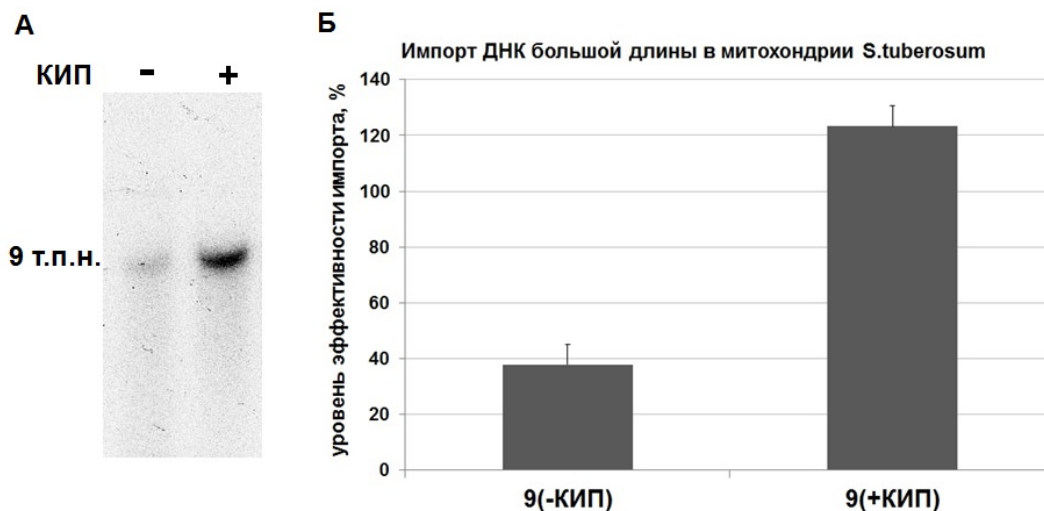


Рис. 2. Влияние КИП митохондриальной плазмиды 11,6 т.п.н. *Brassica rapa* на импорт ДНК-субстрата большой длины (9 т.п.н.) в митохондрии *S. tuberosum*. Митохондриальную ДНК после проведения импорта радиоактивно меченых ДНК-субстратов, 9 т.п.н. (-КИП) и 9,7 т.п.н. (+КИП) экстрагировали из органелл и разделяли электрофорезом в агарозном геле. (А) Авторадиограмма мембраны, на которую перенесена ДНК с геля. (Б) Диаграмма активности импорта в митохондриях ДНК-субстрата 9 т.п.н. с КИП (+) и без КИП (-).

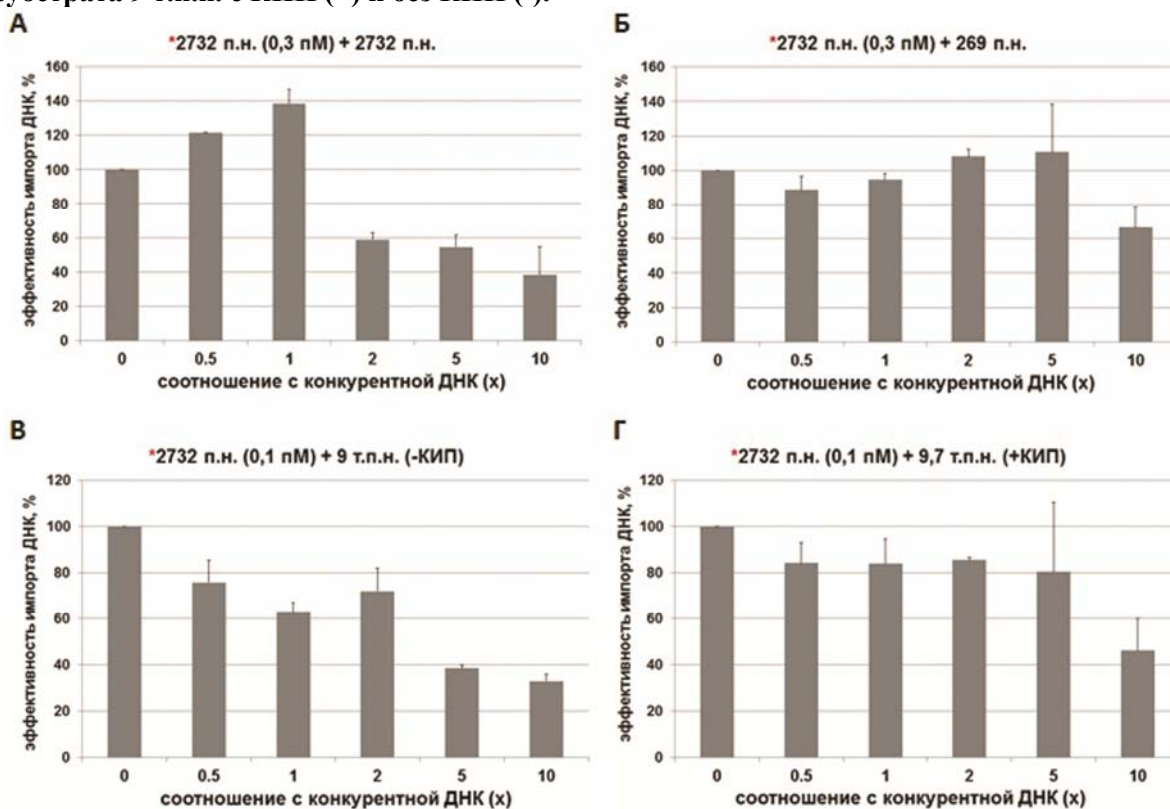


Рис. 3. Характеристика конкурентных взаимоотношений импорта ДНК средней длины в митохондрии *S. tuberosum*. Представлены диаграммы активности импорта радиоактивно меченого фрагмента 2732 п.н. (взятого в количестве 0,1 или 0,3 пМ) в митохондрии *S. tuberosum* в присутствии увеличивающегося количества немеченой ДНК (А) 2732 п.н., (Б) 269 п.н., (В) 9 т.п.н. (-КИП) и (Г) 9 т.п.н. (+КИП). Указано содержание конкурентной немеченой ДНК в каждой пробе, кратное взятому для импорта количеству меченой ДНК.

В данной работе мы исследовали также конкурентные взаимоотношения ДНК-субстратов разной длины в процессе их импорта. Для этого митохондрии инкубировали с радиоактивно меченым ДНК-субстратом (2732 п.н.) в присутствии кратно увеличивающегося количества немеченого субстрата (от 0,5 до 10 раз) той же или другой длины (рис. 3). Активность импорта ДНК длиной 2732 п.н. не изменялась в присутствии 2-5-кратного избытка ДНК малой (269 п.н.) или большой (9,7 т.п.н.) длины, содержащей КИП митохондриальной плазмиды 11,6 т.п.н. *Brassica napus*. Присутствие ДНК большой длины (9 т.п.н.) без КИП вызывало выраженное ингибирование импорта ДНК средней длины. Таким образом, импорт ДНК малой, средней и большой длины может происходить, по всей видимости, посредством альтернативных механизмов.

Из полученных результатов следует, что импорт в митохондрии ДНК разной длины и структуры осуществляется с помощью нескольких специфических механизмов. Выяснение природы специфичности митохондриального импорта в отношении различающихся ДНК-субстратов требует проведения дальнейших углубленных исследований с привлечением широкого комплекса методов молекулярной биологии, физиологии, биоинформатики и структурной биологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-04-00603).

Литература

Ibrahim N., Handa H., Cosset A., Koulintchenko M., Konstantinov Yu., Lightowlers R.N., Dietrich A., Weber-Lotfi F. DNA delivery to mitochondria: sequence specificity and energy enhancement // *Pharmaceutical Research*. – 2011. – V. 28, № 11. – P. 2871–2882.

Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // *EMBO J.* – 2003. – V. 22, № 6. – P. 1245–1254.

Scherer B., Grebe K., Riccio P., Klingenberg M. The new atractyloside type compound as a high affinity ligand to the adenine nucleotide carrier // *FEBS Letters*. – 1973. – V. 31(1). – P. 15–19.

Weber-Lotfi F., Koulintchenko M., Ibrahim N., Hammann P., Milesina D., Konstantinov Yu. M., Dietrich A. Nucleic acid import into mitochondria: New insights into the translocation pathways // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2015. – V. 1853(12). – P. 3165–3181.

STUDYING OF DIFFERENT LENGTH AND STRUCTURE DNA IMPORT INTO PLANT MITOCHONDRIA

Y.M. Konstantinov^{1,3}, T.A. Bolotova¹, A. Dietrich², F. Weber-Lotfi², M.V. Koulintchenko^{1,2}

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia, yukon@sifibr.irk.ru

²Institute of Molecular Biology of Plants, CNRS, Strasbourg, France

³Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Abstract. The kinetics of mitochondrial import of DNA substrates 265 bp, 2732 bp, 9 kbp and their competitive interrelationships during import into potato tuber mitochondria (*Solanum tuberosum*) were studied. Flanking of the DNA substrate 9 kbp by terminal inverted repeats of mitochondrial plasmid 11.6 kbp of leads to increase DNA import into mitochondria of *Brassica napus*, *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*. We concluded that there are few specific ways of DNA import into plant mitochondria.

Keywords: mitochondria, DNA import, terminal inverted repeats, *Solanum tuberosum*

ВЛИЯНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ЭКСПЛАНТА НА ИНДУКЦИЮ ЭМБРИОГЕННЫХ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ

Ю.А Костюкова, Н.И Румянцева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, Россия, *j.kostyukova@mail.ru, nat_rumyantseva@mail*

Аннотация. Показано, что дифференцировка тканей семядолей незрелых зародышей гречихи татарской сопровождается синтезом запасных веществ: крахмала, липидов, белков. Белок – основное запасное вещество семядолей гречихи. Возрастающая дифференциация клеток незрелых зародышей сопровождалась увеличением временного периода индукции ПЭКК. Установлено, что прокамбиальные клетки семядолей являются инициальными клетками, из которых формируются ПЭКК, независимо от размера эксплантационного зародыша.

Ключевые слова: гречиха татарская, незрелые зародыши, запасные соединения, инициальные клетки, эмбриогенный каллус

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1280-1284

Клеточные технологии, в основе которых лежит соматический эмбриогенез (СЭ), широко используются для быстрого размножения, криосохранения и генетической трансформации растений. Эмбриогенные культуры с высокой регенерационной активностью являются универсальным объектом для реализации таких технологий. В случае непрямого СЭ из эмбриогенных каллусных или суспензионных культур формирование эмбриоидов происходит из одной или нескольких клеток проэмбриональных клеточных комплексов (ПЭКК) или согласно другой терминологии – проэмбриогенных масс (ПЭМ). Клонирование ПЭКК осуществляется в ходе субкультивирования каллусов. Такой тип эмбриогенных культур характерен для многих однодольных и двудольных растений [Feher, 2014]. Наиболее оптимальными эксплантами для индукции эмбриогенных клеточных культур являются незрелые зародыши, поскольку они либо уже содержат эмбриогенно компетентные (тотипотентные) клетки, либо появление этих клеток может быть индуцировано действием гормонов или определенных стрессовых воздействий. В отличие от многих растений, для которых инициация эмбриогенных каллусов возможна только из зародышей строго определенного размера, для гречихи татарской размер зародыша может варьировать от 0.5 мм до 4 мм, с частотой индукции эмбриогенных каллусов близкой к 65% [Kostyukova, Rumyantseva, 2010]. При этом индукция эмбриогенных каллусов происходила только из семядолей незрелых зародышей. В задачу наших исследований входило 1. изучить дифференцировку клеток семядолей незрелых зародышей, находящихся на разных стадиях зрелости плода; 2. выявить клетки семядолей незрелых зародышей, деление которых приводит к образованию ПЭКК и последующему формированию эмбриогенного каллуса.

Для индукции эмбриогенного каллуса использовали зародыши разной длины от 1мм до 4 мм, выделенные на стадии водянистой, молочной, тестообразной и восковой спелости. Фиксацию материала, культивирование зародышей, гистологические исследования, проводили по методикам, описанным ранее [Румянцева и др., 1989; Kostyukova, Rumyantseva, 2010], электронно-микроскопические исследования – по методике, опубликованной в работе [Betekhtin et al., 2017].

Изучение гистологических срезов показало, что в семядолях зародышей 1-4 мм длины можно выделить следующие типы клеток: адаксиальный эпидермис, столбчатый

мезофилл, губчатый мезофилл, абаксиальный эпидермис и прокамбиальные тяжи (таблица). Клетки абаксиального эпидермиса имеют меньший размер и более густую цитоплазму по сравнению с клетками адаксиального эпидермиса. Прокамбиальные тяжи образованы мелкими, удлинёнными клетками и окружены паренхимными клетками обкладки.

Семядоли являются органами, в которых накапливаются определенные соединения, необходимые для прорастания зародыша и развития проростка. В семядолях зародышей гречихи татарской на разных стадиях их развития выявлены следующие запасные соединения: крахмал в виде крахмальных зерен (КЗ) в пластидах, липиды сферосом и запасные белки в вакуолях. Следует отметить, что пластиды с КЗ были немногочисленными. Увеличение размера и количества КЗ наблюдали только в губчатом мезофилле, в зародышах 3-4 мм длины. Распределение крахмала по клеткам зародышей разного размера имело свои особенности. КЗ у зародышей 1-2 мм были обнаружены только в клетках адаксиального эпидермиса, а также столбчатого и губчатого мезофилла. В зародышах 3 мм КЗ были выявлены и в клетках обкладки прокамбиальных тяжей, а в зародышах 4 мм - во всех тканях (в т.ч. и в абаксиальном эпидермисе), кроме прокамбия.

Накопление липидов в клетках семядолей было также невелико. Интересно, что у зародышей 1-2 мм липиды в виде сферосом выявлялись только в клетках абаксиального эпидермиса. У зародышей 3-4 мм - в клетках как абаксиального, так и адаксиального эпидермиса (таблица).

Накопление белка – наиболее значительный метаболический процесс, происходящий в ходе созревания семядолей гречихи. Если в зародышах 1-2 мм наблюдали только отдельные фибриллярные включения в вакуолях, то в клетках семядолей зародышей 3-4 мм вакуоли уже содержали либо крупные белковые глобулы, либо вакуоли были полностью заполнены белком. Белковые тела занимали большую часть клетки. В зародышах 1-2 мм обнаруживали белковые включения только в адаксиальном эпидермисе, а в зародышах 3-4 мм крупные белковые тела присутствовали во всех клетках, кроме прокамбиальных тяжей. Возрастание накопления белка в клетках семядолей коррелировало с изменением цвета незрелых зародышей гречихи от прозрачного к желтому. Например, белые зародыши 3 мм длины в запасующих вакуолях содержали лишь отдельные белковые глобулы, тогда как в желтых зародышах 3 мм вакуоли были полностью заполнены белком (таблица). Электронно-микроскопические исследования клеток семядолей показали, что белковые тела в клетках зародышей окружены мелкими вакуолями. Они плотно контактируют с одной стороны с расширенными цистернами ШЭПР, с другой – с мембраной тонопласта.

Известно, что вакуоли, заполненные запасными белками, могут быть окружены липидными тельцами – сферосомами [Wang et al., 2012]. Однако в нашем случае эти тельца не окрашивались Суданом III на полутонких срезах. Гистологические исследования показали, что наибольшее накопление запасных веществ наблюдается в клетках губчатого мезофилла незрелых зародышей, прилегающего к абаксиальному эпидермису, что можно рассматривать как признак более быстрой дифференциации этой ткани.

Формирование эмбрионного каллуса гречихи татарской происходит через первичное образование ПЭКК. Визуально образование ПЭКК на адаксиальной поверхности семядолей зародышей длиной 1 мм, 2 мм, 3 мм отмечали на 20-25 день культивирования. Эксплантированные зародыши каллусировали, не прорастая. Зародыши 4 мм на среде культивирования прорастали. Образование ПЭКК наблюдали уже на полностью раскрытых семядолях на адаксиальной поверхности на 30 день

культивирования. Возрастающая дифференциация клеток незрелых зародышей, синтез и накопление запасных соединений, сопровождались увеличением временного периода, необходимого для индукции эмбриогенных каллусных культур.

Таблица.

Локализация запасных веществ в клетках незрелых зародышей гречихи татарской различной длины

Размер и цвет зародыша	Стадия спелости плода	Ткани зародыша	Запасные соединения		
			Крахмальные зерна в пластидах	Белок в вакуолях	Липиды сферосом
1 мм, белый	Водянистая	Адаксиальный эпидермис	+	ФБ	-
		Абаксиальный эпидермис	-	-	++
		Мезофилл	+(ст), +(губ)	-	-
		Прокамбиальные тяжи	-	-	-
		Клетки обкладки ПрТ	-	-	-
2 мм, белый	Молочная	Адаксиальный эпидермис	+	ФБ	-
		Субэпидермальные клетки адаксиального эпидермиса	+	-	-
		Абаксиальный эпидермис	-	-	+
		Мезофилл	+(ст), +(губ)	-	-
		Прокамбиальные тяжи	-	-	-
		Клетки обкладки ПрТ	-	-	-
3 мм, белый	Молочная	Адаксиальный эпидермис	+	ФБ	-
		Субэпидермальные клетки адаксиального эпидермиса	+	-	-
		Абаксиальный эпидермис	-	-	+
		Мезофилл	+(ст), ++(губ)	-	-
		Прокамбиальные тяжи	-	-	-
		Клетки обкладки ПрТ	+	-	-
3 мм, желтый	Тестообразная	Адаксиальный эпидермис	+	+	+
		Абаксиальный эпидермис	+	+	+
		Мезофилл	+(ст), ++(губ)	+	-
		Прокамбиальные тяжи	-	-	-
		Клетки обкладки ПрТ	+	+	-
4 мм, желтый	Тестообразная, восковая	Адаксиальный эпидермис	+	+	+
		Абаксиальный эпидермис	+	++	+
		Мезофилл	+(ст), ++(губ)	++	-
		Прокамбиальные тяжи	-	-	-
		Клетки обкладки ПрТ	+	++	-

Сокращения: ПрТ – прокамбиальные тяжи, ст - столбчатый мезофилл, губ - губчатый мезофилл, ФБ - фибриллярный белок. Жирным шрифтом выделены клетки, деление которых приводит к формированию ПЭКК

Одним из факторов, определяющих компетентность клеток к внешним стимулам, является их уровень дифференцированности.

Гистологические исследования показали, что формирование ПЭКК в зародышах 1-2 мм происходит из клеток губчатого мезофилла, прилегающих к адаксиальному эпидермису (субэпидермальные клетки адаксиального эпидермиса) и прокамбиальных клеток, в более крупных зародышах – 3-4 мм длины образование ПЭКК идет

преимущественно из прокамбиальных клеток (в табл. выделено полужирным шрифтом). А.С. Кротовым [Кротов, 1975] было отмечено, что незрелые зародыши семян гречихи не обладают дифференцированными проводящими пучкам. Таким образом, в семядолях незрелых зародышей гречихи татарской ствольность прокамбиальных клеток поддерживается достаточно долго. Субэпидермальные клетки семядолей на водянистой - молочной стадии эндосперма (зародыши 1-2 мм длины) являются также наименее дифференцированными (таблица). Таким образом, инициальными клетками, из которых в семядолях незрелых зародышей образуются ПЭКК, являются субэпидермальные клетки адаксиальной поверхности семядолей зародышей 1-3 мм длины и прокамбиальные клетки зародышей 1-4 мм длины. При действии 2,4-Д компетентные клетки семядолей детерминируются на эмбриогенный путь развития. Первые деления формирования ПЭКК характеризуются неравным делением клеток, приводящим к образованию мелких пре-эмбриогенных комплексов, близким по строению к глобулярным зародышам. Дальнейший рост и дифференциация этих комплексов приводит к формированию ПЭКК, которые многими исследователями рассматриваются как аномальные соматические зародыши, образующиеся при нарушении транспорта ауксина искусственным гормоном 2,4-Д [Souter, Lindsey, 2000]. Циклическое воспроизведение ПЭКК в культуре *in vitro*, по-видимому, является своеобразной формой адвентивного эмбриоидогенеза.

Проведенные исследования позволяют заключить, что семядоли незрелых зародышей гречихи татарской помимо «идеального» экспланта для получения эмбриогенных культур, могут быть удобным объектом для изучения молекулярных процессов, лежащих в основе редетерминации прокамбиальных клеток в эмбриогенные, тотипотентные клетки.

Литература

- Кротов А.С., Лысов В.Н., Соколова И.И. Культурная флора СССР. – 1975. – 363 с.
Румянцева Н.И., Сергеева Н.В., Хакимова Л.Е., Сальников В.В., Гумерова Е.А., Лозовая В.В. Органогенез и соматический эмбриогенез в культуре двух видов гречихи // Физиология растений. – 1989. – Т. 36. – С. 187–194.
Betekhtin A., Rojek M., Jaskowiak J., Milewska-Hendel A., Kwasniewska J., Kostyukova Y., Kurczynska E., Rummyantseva N., Hasterok R. Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn // PLoS One. – 2017. – V. 12, No. 3. – doi: 10.1371/journal.pone.0173537.
Feher A. Somatic embryogenesis — stress-induced remodeling of plant cell fate // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms. – 2015. – V. 1849, I. 4. – P. 385–402.
Kostyukova Y., Rummyantseva N. Histological study of embryogenic callus induction in immature embryos of tartary buckwheat *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn // Proc. of the 11th International Symposium of Buckwheat. – 2010, July, 19-23. – P. 67–175.
Souter M., Lindsey K. Polarity and signaling in plant embryogenesis // J Exp Bot. – 2000. – V. 51, No. 347. – P. 971–983.
Wang X-D., Song Y., Sheahan M.B., Garg M., Rose R. From embryo sac to oil and protein bodies: embryo development in the model legume *Medicago truncatula* // New Phytology. – 2012. – V. 193. – P. 327–338.

THE INFLUENCE OF EXPLANT CELL DIFFERENTIATION ON INDUCTION OF EMBRYOGENIC CALLI OF TARTARY BUCKWHEAT

Yu.A. Kostyukova, N.I. Rumyantseva

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia, *j.kostyukova@mail.ru, nat_rumyantseva@mail*

Abstract. We showed that the differentiation of cotyledon tissues of Tartary buckwheat immature embryos was accompanied by accumulation of starch, lipids and proteins. Proteins were the main cotyledon reserve substances. The differentiation of cotyledon cells was accompanied by an increase in the time period of proembryonal cell complexes (PECC) induction. It was established that procambial cells of cotyledons are the initial cells from which PECC are formed, regardless of the size of embryo.

Keywords: *Tartary buckwheat, immature embryos, reserve substances, initial cells, embryogenic callus*

ВЫТЯЖКА ИЗ ЛИСТА СТЕВИИ – ПРИРОДНЫЙ СТИМУЛЯТОР РОСТА РАСТЕНИЙ

А.А. Кочетов, Н.Г. Синявина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Агрофизический научно-исследовательский институт», Санкт-Петербург, Россия, sinad@inbox.ru

Аннотация. В условиях регулируемой агроэкосистемы проведены исследования влияния водной вытяжки из сухого листа стевии (*Stevia rebaudiana Bertoni*) на всхожесть семян, рост проростков и продуктивность растений салата и огурца. Выявлена стимуляция роста проростков при обработке семян исходной вытяжкой без ее разведения (концентрация основных стевииолгликозидов – 1-1,2 мМ). Трехкратная некорневая обработка салата и огурца вытяжкой с концентрацией стевииолгликозидов 20-25 мкМ повышала биомассу обеих культур на 29-35%. Данный эффект объясняется наличием у стевииолгликозидов гиббереллиноподобной активности, что позволяет нам рекомендовать вытяжку из стевии в качестве эффективного и экологически безопасного стимулятора роста растений.

Ключевые слова: *стевия, водная вытяжка из листьев, гиббереллиноподобная активность, рост растений, стимуляция*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1285-1289

Стевия (*Stevia rebaudiana Bertoni*) – новая перспективная сельскохозяйственная культура, листья которой содержат диетические натуральные сахарозаменители, безопасные для человека при длительном употреблении в питании. Подсластители из стевии (дитерпеновые гликозиды) широко используются в мировой пищевой промышленности в качестве низкокалорийных сахарозаменителей. Общее содержание сладких гликозидов в сухом листе варьирует от 4 до 25% в зависимости от генотипа, фазы развития и условий выращивания. Стевиозид и ребаудиозид А в сумме составляют 80-95% от общего содержания стевииолгликозидов (СГ). Все СГ имеют сходное строение, являются производными стевииола и различаются только составом углеводных остатков в положениях С13 и С19.

Энткауреновый скелет СГ сходен по строению с молекулой гиббереллина и так же, как и гиббереллин формируется по метилэритритолфосфатному пути биосинтеза изопреноидов [Totte et al., 2000; Brandl, Telmer, 2007]. Вероятнее всего, этим объясняется наличие гиббереллиноподобной активности у растворов СГ, выявленной в ряде исследований [Komai et al., 1983, 1985; Villalobos et al., 1994; Olivera et al., 2008; Тимофеева и др., 2010, 2015]. В работах этих и других исследователей показано положительное влияние СГ на прорастание семян, рост и урожай ряда культур, устойчивость к воздействию низких температур и тяжелых металлов, а также к условиям засухи.

Однако практически все исследователи изучали действие на растения химически чистых СГ. Влияние же всего комплекса биологически активных соединений, содержащихся в стевии, практически не изучено. В состав экстрактов из листьев стевии помимо углеводов входят белки и аминокислоты, флавоноиды, оксикоричные кислоты, водорастворимые пигменты, витамины и др. [Wölwer-Rieck, 2012]. Большое количество публикаций содержит данные о высокой антиоксидантной активности экстрактов.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния водной вытяжки из сухих листьев стевии (ВВЛ), выращенной в условиях светокультуры на базе ФГБНУ АФИ (г. Санкт-Петербург), на всхожесть и энергию прорастания семян салата и огурца, рост и продуктивность растений.

Материалы и методы. Исследования проводили в условиях регулируемой агроэкосистемы с использованием оригинального вегетационно-облучательного оборудования при контролируемых параметрах окружающей среды. В качестве источника освещения использовали лампы ДНаЗ-400 (ООО «Рефлекс»). Для приготовления вытяжек использовали сухие листья стевии, выращенной в светокультуре при оптимальных режимах, способствующих активному вегетативному росту [Кочетов, 1996]. Растения высушивали в сушильном шкафу при 80 °С в течение суток, сухие листья измельчали до порошкообразного состояния, брали навеску 1г и трижды последовательно проводили экстракцию 20 см³ дистиллированной воды в течение 30 мин в термостате при 90-100 °С. Экстракты объединяли и доводили дистиллированной водой до общего объема 100 см³. В полученной вытяжке из листьев определяли содержание стевиозида и ребаудиозида А [Руководство..., 2004] и использовали ее для последующего разведения и обработки растений. Вытяжку готовили непосредственно перед обработкой растений. Содержание СГ в сухом листе стевии составляло 8-10%, что соответствовало 1-1,2 мМ.

Объектами исследования служили семена, проростки и растения салата сорта Тайфун и огурца сорта Зозуля. Изучали влияние вытяжки из стевии на всхожесть, энергию прорастания семян и рост проростков по следующей методике: сухие семена с предварительно определенной всхожестью помещали на 4 часа в колбу с водой при непрерывном барботировании для первичного набухания, затем переносили на 2 часа в колбы с разведениями исходной ВВЛ. Обработанные семена помещали в чашки Петри на бумажные фильтры в количестве 50 шт. для салата и 30 шт. для огурца (n=3), добавляли 5 см³ водопроводной воды, переносили в термостат и инкубировали при 23 °С, по стандартной методике определяли энергию прорастания, процент всхожести семян и проводили измерение длины гипокотилия и корня проростков. Варианты опыта: контроль – водопроводная вода; разведения исходной ВВЛ водопроводной водой в соотношении 1:100, 1:20, 1:10, 1:4, 1:2 и исходная вытяжка без разведения.

Для исследования влияния ВВЛ стевии на рост растений проростки салата и огурца высаживали в стандартные кассеты с субстратом на основе верхового торфа с минеральными добавками, для салата размер ячеек был 5x5x5 см, для огурца – 8x8x8 см. Растения выращивали в светоустановках при 14-часовом фотопериоде и облученности 60-70 Вт/м²ФАР. Температуру поддерживали на уровне 22±3 °С днем и 18±3 °С ночью. Полив салата осуществляли водой, подкормку – раствором 1н Кнопа два раза в неделю, для полива растений огурца использовали раствор 1н Кнопа. Некорневую обработку растений проводили три раза за вегетацию: для салата – на 18, 21 и 24 сутки, для огурца – на 11, 14 и 17 сутки. Варианты опыта были следующие: контроль – водопроводная вода; разведения исходной ВВЛ для салата 1:1000, 1:200, 1:100, 1:50, 1:34, 1:25, 1:17, для огурца – 1:100, 1:50, 1:25, 1:17. Размер оцениваемой выборки составлял для салата 16 растений, для огурца – 10 растений (n=3). Уборку салата проводили на 30 сутки, огурца – на 21 сутки (в фазе 5-6 листа). При уборке учитывали количество и размер листьев, диаметр розетки салата, высоту побега огурца, сырую и сухую массу растений.

Результаты и обсуждение. Согласно полученным данным, обработка семян ВВЛ стевии способствовала увеличению длины корешка и гипокотилия проростков обеих культур. Максимальный эффект наблюдался при применении неразведенной вытяжки (концентрация СГ 1-1,2 мМ). Прирост корня и гипокотилия у проростков салата составлял 90% и 24% соответственно, у проростков огурца – 13% и 36% соответственно по отношению к контролю. Для семян огурца выявлена чувствительность к обработке ВВЛ в большом диапазоне концентраций: статистически достоверное увеличение длины гипокотилия происходило в диапазоне разведений от

1:10 до 1:2 (100-500 мкМ СГ). Нами не было обнаружено статистически достоверного влияния вытяжки на энергию прорастания и всхожесть семян обеих культур. У огурца эти показатели составляли 100% во всех вариантах опыта, у салата наблюдаемые изменения энергии прорастания семян после обработки ВВЛ носили характер положительной тенденции (6-11% по сравнению с контролем), всхожесть салата не изменялась.

Некорневая обработка вегетирующих растений салата ВВЛ в диапазоне разведений 1:100 – 1:17 способствовала увеличению биомассы растений, числа листьев в розетке и их размеров (таблица). Максимальный положительный эффект, выявлен для разведения исходной ВВЛ 1:50 (20-25 мкМ СГ). Обработка растений ВВЛ при больших разведениях (1:200 и 1:1000) не оказывала достоверного влияния на параметры продуктивности салата.

Таблица.

Биометрические показатели и надземная масса салата с. Тайфун при некорневой обработке вытяжкой из листа стевии (данные приведены в % к контролю, контроль – обработка водой)

Вариант (разведение)	Число листьев	Длина листа	Ширина листа	Диаметр розетки	Масса растения	
					Сырая	Сухая
1:1000	101	98	99	100	98	106
1:200	100	98	99	100	97	111
1:100	107	102	103	105	119*	135*
1:50	111*	105	110*	106	125*	135*
1:34	106	102	103	102	116*	133*
1:25	106	100	102	102	108	122*
1:17	104	100	102	101	108	124*

Примечание: *отличия от контроля достоверны при $P \leq 0,05$

Показано, что некорневая обработка ВВЛ активизирует накопление сухого вещества у растений салата во всех вариантах опыта, что свидетельствует о повышении питательной ценности получаемой растительной продукции. Прибавка по сухой массе у обработанных ВВЛ растений была более значительная по сравнению с сырой (22-35% против 8-25% соответственно).

Некорневая обработка ВВЛ стевии растений огурца также оказывала стимулирующее влияние на рост растений. В значительной степени увеличилась их высота (11-28%), прибавка по сырой и сухой массе для разных разведений составляла 1-28% (сырая масса) и 6-29% (сухая масса). Увеличение количества листьев и их размеров наблюдали только в варианте ВВЛ 1:50, где оно не было статистически достоверным. Как и для салата, для огурца наиболее эффективным было разведение 1:50, в котором увеличение высоты растений составляло 28%, а прибавка по сырой и сухой массе – 25 и 29% соответственно.

Полученные результаты в целом согласуются с данными других исследователей по гиббереллиноподобному действию растворов СГ на растения и свидетельствуют о перспективности применения вытяжки из сухого листа стевии в растениеводстве.

Заключение. В серии экспериментов, проведенных в регулируемых условиях, показано стимулирующее влияние водной вытяжки из сухих листьев стевии на рост проростков и вегетирующих растений салата и огурца, выявлены эффективные действующие концентрации вытяжки. Установлено, что для обработки семян целесообразно применять неразведенную вытяжку, приготовленную по применяемой нами методике (концентрация основных СГ 1-1,2 мМ), в то время как для некорневой обработки растений максимальный ростстимулирующий эффект наблюдался при

разведении вытяжки 1:50 (концентрация СГ 20-25 мкМ). Ростстимулирующий эффект вытяжки объясняется, по-видимому, присутствием в ней стевиолгликозидов – веществ с гиббереллиноподобным строением и действием. Возможное влияние других биологически активных веществ, содержащихся в водной вытяжке из листьев стевии – белков, аминокислот, фенолов, флавоноидов и др., – требует дополнительного изучения. Высокая эффективность действия, низкая себестоимость, экологическая безопасность и простота производства могут служить основанием для рекомендации к использованию вытяжки из сухого листа стевии в качестве препарата, стимулирующего рост растений.

Литература

Кочетов А.А. Изучение особенностей роста и развития растений (*Stevia rebaudiana* Bertoni) в регулируемых условиях. Автореф. дис. ... канд.биол.наук. ФГБНУ АФИ, Санкт-Петербург, 1996. – 22 с.

Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Р.4.1.1672-03. – М.: Минздрав России, 2004. – 368 с.

Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю., Мифтахова И.Г. Производные дитерпеноидастевиола регулируют рост и повышают морозоустойчивость озимой пшеницы // Доклады Академии наук. – 2010. – Т. 435, № 2. – С. 282–285.

Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю., Михайлов А.Л., Стробыкина А.С., Шаймуллина Г.Х. Стевиозид – новый природный регулятор роста и устойчивости растений // Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием и школа молодых ученых «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий». 2015 г. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015. – С. 526.

Brandle J.E., Telmer P.G. Steviol glycoside biosynthesis // *Phytochemistry*. – 2007. – V. 68, No. 14. – P. 1855–1863.

Komai K., Iwamura J. Effects of stevioside and its relative compounds on growth of rice and lettuce seedlings // *J. Pesticide Sci.* – 1983. – V. 8, No. 4. – P. 445–450.

Komai K., Iwamura J., Morita T., Hamada M. Effect of stevioside and its related compounds on the induction of α -amilase biosintesis // *J. Pesticide Sci.* – 1985. – No. 10. – P. 113–117.

Oliveira B.H., Stiirmer J.C., Filho J.D.S. Plant growth regulation activity of steviol and derivatives // *Phytochemistry*. – 2008. – V. 69, No. 7. – P. 1528–1533.

Totté N., Charon L., Rohmer M., Compennolle F., Baboeuf I., Geuns J.M. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway // *Tetrahedron Letters*. – 2000. – V. 41, No. 33. – P. 6407–6410.

Villalobos N., Martin L., Macias M.J., Mancheno B., Grande M. Gibberellin-like activity of some tetracyclic diterpenoids from *elaeoselinum* species and their derivatives // *Phytochemistry*. – 1994. – No. 37. – P. 635–639.

Wölwer-Rieck U. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2012. – V. 60, No. 4. – P. 886–895.

EXTRACT FROM STEVIA LEAVES IS NATURAL PLANT GROWTH STIMULATOR

A.A. Kochetov, N.G. Siniavina

Agrophysical Research Institute, St. Petersburg, Russia, *sinad@inbox.ru*

Abstract. The purpose of this experiment was to study of the effect of water extract from dry stevia leaves (*Stevia rebaudiana Bertoni*) on the seeds germination and on the growth and net-productivity of lettuce and cucumber. The experiments were carried out under controlled condition (artificial light). The growth stimulation of seedlings was revealed during the seeds treatment with the initial extract without dilution (at the concentration of basic steviol glycosides – SG – in the extract 1-1.2 mM). Three foliar treatment of lettuce and cucumber with extracts from Stevia with a concentration of 20-25 μ M SG increased the net-productivity of both crops by 29-35%. This effect is apparently due to the presence of Gibberellin-like activity in SG. Water extract from stevia leaves can be recommended as an effective and environmentally safe plant growth stimulator.

Keywords: *stevia, water extract from leaves, controlled condition, plant growth, stimulation*

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ *IN PLANTA* В СТАДИИ РАЗВИТИЯ, ОПТИМИЛЬНОЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КАЛЛУСА В ЦЕЛЯХ ИЗУЧЕНИЯ В МОДЕЛЬНЫХ СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Н.Н. Круглова, О.А. Сельдимирова, А.Е. Зинатуллина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уфимский Институт биологии Российской академии наук, Уфа, Россия, kruglova@anrb.ru

Аннотация. Установлено, что начало морфогенному каллусу пшеницы *in vitro* дают зародыши, инокулированные на подстадии 3 стадии органогенеза (согласно периодизации: Круглова, 2012). Выявлен гистологический статус таких зародышей: обособление зачатков органов и их тканевая дифференциация, все органы представлены активно развивающимися меристематическими клетками, не покрытыми плотной клеточной стенкой. Показано, что каллус формируется из эпидермальных клеток щитка, находящихся в контакте с питательной средой.

Ключевые слова: зародыш *in planta*, морфогенный каллус *in vitro*, пшеница *Triticum aestivum L.*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1290-1294

Толерантность к абиотическим стрессам – сложный признак в силу взаимодействий между стрессором и различными молекулярными, биохимическими и физиологическими событиями, влияющими на рост растений на разных стадиях развития, поэтому неспецифические реакции растений на абиотические стрессы трудно контролировать и тем более управлять ими [Шакирова, 2001; Терлецкая, 2012; Yadav, Sharma, 2016; Терлецкая и др., 2017]. Модельными системами для изучения клеточных и тканевых механизмов реакции растений на стресс-факторы могут служить каллусные культуры *in vitro* (обзор [Круглова и др., 2018]). Основанием для использования таких моделей являются как важная роль клетки во всех морфогенетических событиях растительного организма [Бутенко, 1999; Носов, 1999; Журавлев, Омелько, 2008; Plant propagation ..., 2008; Иванов, 2011; Hand et al., 2016], так и универсальность путей морфогенеза растений *in planta* и *in vitro* [Батыгина, 2014; Батыгина, Осадчий, 2015].

Отдельная проблема в этой области – выявление особенностей экспланта, в условиях *in vitro* дающего начало морфогенному каллусу, тотипотентные клетки которого в ходе дальнейшего культивирования в модельных стрессовых условиях способны развиваться по различным путям морфогенеза, включая регенерацию стресс-устойчивого растения. В качестве экспланта для получения *in vitro* морфогенного каллуса у злаков перспективно использование незрелого зародыша [Круглова, Катасонова, 2009; Митич и др., 2009; Plant Embryo Culture ..., 2011; Сельдимирова и др., 2011, 2017; Сельдимирова, Круглова, 2013; Thi-Bich, Duc-Thanh, 2014; Seldimirova et al., 2016]. При описании инокулируемого незрелого зародыша исследователи обычно указывают либо длину зародыша, либо сутки после опыления, на которые незрелый зародыш извлекался из зерновки (обзор [Круглова и др., 2018]); при этом, как правило, не указывается стадия развития зародыша, отсутствует его гистологическое описание. В связи с этим нами проведено гистологическое исследование инокулируемых *in vitro* незрелых зародышей пшеницы на разных стадиях развития с целью выявления особенностей зародыша в стадии, оптимальной для получения морфогенного каллуса.

Материалом для исследований послужила яровая мягкая пшеница сорта Жница. Растения выращивали на экспериментальных участках научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район) и срезали на 2.5–20.0 сут после искусственного опыления. Использовали метод эмбриокультуры *in vitro*

яровой мягкой пшеницы с учетом оригинальных методических эмбриологических нюансов [Круглова, Сельдимирова, 2011]. Зародыши инокулировали на последовательных стадиях развития согласно авторской периодизации [Круглова, 2012]: четырехклеточный зародыш (2.5 сут после искусственного опыления); многоклеточный зародыш (4.0 сут после искусственного опыления); органогенез в трех подстадиях: подстадия 1 (8.0 сут после искусственного опыления), подстадия 2 (12.0 сут после искусственного опыления), подстадия 3 (17.0 сут после искусственного опыления); сформированный зародыш (20.0 сут после искусственного опыления).

Для индукции каллусообразования использовали среду, составленную по полной прописи Мурасиге-Скуга [Murashige, Skoog, 1962], pH 5.8, с введением 0.2 мг/л кинетина и 2,4-Д в следующих концентрациях: 0.0 (контроль), 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 мг/л. Зародыши инкубировали в темноте при 27 °С. Постоянные препараты зародышей, подготовленные по [Круглова и др., 2013], анализировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Germany). Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Microsoft Office Excel 2010. В таблице приведены средние значения.

Согласно полученным данным, формирование морфогенного каллуса отмечено только при культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 3 стадии органогенеза (17 сут после опыления), при концентрации 2,4-Д в 1.0–4.0 мг/л (таблица).

Таблица.

Влияние стадии эмбриогенеза и концентрации 2,4-Д в среде на отзывчивость незрелых зародышей пшеницы сорта Жница в культуре *in vitro*

Стадия эмбриогенеза	Сутки после опыления	Отзывчивость незрелых зародышей на концентрацию 2,4-Д в среде культивирования <i>in vitro</i>								
		0.0 мг/л (контроль)	1.0 мг/л	2.0 мг/л	3.0 мг/л	4.0 мг/л	5.0 мг/л	6.0 мг/л	7.0 мг/л	8.0 мг/л
Четырехклеточный зародыш	2.5	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Многоклеточный зародыш	4.0	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Подстадия 1 стадии органогенеза	8.0	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Подстадия 2 стадии органогенеза	12.0	Д	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК
Подстадия 3 стадии органогенеза	17.0	НМК	МК	МК	МК	МК	НМК	НМК	НМК	НМК
Сформированный зародыш	20.0	П	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК

Условные обозначения: МК – морфогенный каллус, НМК – неморфогенный каллус, П – проросток, Д – дегенерация зародыша

Гистологическое исследование показало, что на подстадии 3 стадии органогенеза происходит обособление зачатков органов зародыша и их тканевая дифференциация; все органы такого зародыша находятся на ранней стадии развития и представлены активно развивающимися меристематическими клетками, не покрытыми плотной клеточной стенкой. Эту подстадию развития зародыша *in planta* можно считать

оптимальной для получения морфогенных каллусов *in vitro* пшеницы данного сорта в условиях выполненных экспериментов.

Концентрация 2,4-Д также играет определенную роль в индукции формирования морфогенного каллуса, однако, на нашем мнении, не главенствующую, поскольку использование одной и той же концентрации этого синтетического ауксина вело к различной реакции разновозрастных зародышей пшеницы. Более того, в ряде вариантов отзывчивость экспланта не зависела от наличия 2,4-Д в среде.

В целом, полученные данные свидетельствуют, что при прочих равных условиях компетентность клеток зародыша пшеницы к формированию морфогенного каллуса в условиях *in vitro* зависит не столько от внешних стимулов, сколько от статуса клеток зародыша *in planta* в момент инокуляции, а именно – их меристематичности. Полученные результаты подтверждают высказанное мнение, что для злаков именно природа экспланта является основным фактором, определяющим морфогенетическую способность клеток зародыша к формированию каллуса и дальнейшую регенерацию растений из клеток каллуса в условиях культуры *in vitro* [Дунаева и др., 2000; Круглова, Катасонова, 2009; Круглова, Сельдиминова, 2011; Slesak et al., 2013; Круглова и др., 2018]. По нашему мнению, клетки такого зародыша не только морфогенетически компетентны, но и являются исходными для меристематических клеток морфогенного каллуса, имеющих все морфогенетические возможности, присущие данной особи и реализующиеся различными путями морфогенеза *in vitro*, т.е. тотипотентных. Более того, клетки зародыша, дающие начало полноценным (фертильным) растениям-регенерантам через этап формирования *in vitro* морфогенного каллуса, по-видимому, можно расценивать в определенном смысле и как стволовые клетки, в понимании Т.Б. Батыгиной [Батыгина и др., 2010; Батыгина, 2014].

В работе использовано оборудование ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН.

Литература

Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. – СПб.: ДЕАН, 2014. – 764 с.

Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдиминова О.А. От микропоры – к сорту. – М.: Наука, 2010 – 174 с.

Батыгина Т.Б., Осадчий Я.В. Выявление гомологии клеточных элементов репродуктивных и формообразовательных структур // Успехи соврем. биол. – 2015. – Т. 135, № 4. – С. 337–345.

Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

Журавлев Ю.Н., Омелько А.М. Морфогенез у растений *in vitro* // Физиол. раст. – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 643–664.

Иванов В.Б. Клеточные механизмы роста растений. – М.: Наука, 2011. – 104 с.

Круглова Н.Н. Периодизация эмбриогенеза пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Изв. Уфимского науч. центра РАН. – 2012. – № 2. – С. 21–24.

Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдиминова О.А., Зайцев Д.Ю., Зинатуллина А.Е. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. – Уфа: Гилем, 2013. – 128 с.

Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2009. – Т. 41, № 2. – С. 124–131.

Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цитогистологические аспекты. – Уфа: Гилем, 2011. – 124 с.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллус *in vitro* как модельная система для исследования стресс-устойчивости растений к абиотическим факторам (на примере злаков) // Успехи соврем. биол. – 2018. – Т. 138, № 2. – В печати.

Митич Н., Додиг Д., Николич Р. и др. Влияние условий выращивания донорных растений на культуру незрелых зародышей, выделенных из широко распространённых генотипов пшеницы // Физиол. раст. – 2009. – Т. 56, № 4. – С. 596–602.

Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиол. раст. – 1999. – Т. 46, № 6. – С. 837–844.

Сельдимирова О.А., Безрукова М.В., Галин И.Р., Лубянова А.Р., Шакирова Ф.М., Круглова Н.Н. Влияние 24-эпибрасинолида на формирование, ростовые показатели и регенерационную способность каллусов *in vitro* контрастных по засухоустойчивости сортов пшеницы // Физиол. раст. – 2017. – Т. 64, № 6. – С. 461–472.

Сельдимирова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллусах различного происхождения у пшеницы // Физиол. биохим. культ. раст. – 2011. – Т. 43, № 4. – С. 297–306.

Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Особенности начальных этапов эмбриоидогенеза *in vitro* в каллусах пшеницы различного происхождения // Изв. РАН. Серия биол. – 2013. – № 5. – С. 565–573.

Терлецкая Н.В. Неспецифические реакции зерновых злаков на абиотические стрессы *in vivo* и *in vitro*. – Алматы, 2012. – 208 с.

Терлецкая Н.В., Зобова Н.В., Ступко В.Ю. и др. Изучение устойчивости фотосинтетического аппарата мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.) и ее диких сородичей к абиотическим стрессорам *in vivo* и *in vitro*. – Алматы, 2017. – 172 с.

Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.

Hand M.L., de Vries S., Koltunow A.M. A comparison of *in vitro* and *in vivo* asexual embryogenesis // Methods Mol. Biol. – 2016. – V. 1359. – P. 3–23.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, No. 3. – P. 473–497.

Plant Embryo Culture: Methods and Protocols // Methods in Molecular Biology, Vol. 710. – Springer New York London Dordrecht Heidelberg, 2011 – 377 p.

Plant Propagation by Tissue Culture / Eds. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. – Dordrecht: Springer, 2008. – 502 p.

Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaitsev D.Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of zeatin and indolil-3-acetic acid in cells during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant.* – 2016. – V. 52, No. 3. – P. 251–264.

Slesak H., Goralski G., Pawłowska H. et al. The effect of genotype on a barley scutella culture. Histological aspects // Cent. Eur. J. Biol. – 2013. – V. 8, No. 1. – P. 30–37.

Thi-Bich H.V., Duc-Thanh N. High plant regeneration frequency from the immature embryo culture of inbred maize (*Zea mays* L.) lines // Plant Cell Biotechn. Molec. Biol. – 2014. – V. 15, No. 1-2. – P. 11–18.

Yadav S., Sharma K.D. Molecular and morphophysiological analysis of drought stress in plants // Plant growth. Chapter 10 (ed. Rigobelo E.C.) – 2016. – DOI: 10.5772/65246.

**THE HISTOLOGICAL STATUS OF THE WHEAT EMBRYO *IN PLANTA*
AT THE DEVELOPMENTAL STAGE OPTIMAL FOR OBTAINING CALLUS
IN ORDER TO STUDY IN MODEL STRESS CONDITIONS *IN VITRO***

N.N. Kruglova, O.A. Seldimirova, A.E. Zinatullina

Ufa Institute of Biology of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia,
kruglova@anrb.ru

Abstract. It is established that the beginning of the wheat morphogenic callus in vitro give embryos, inoculated at substage 3 of organogenesis stage (according to the periodization: Круглова, 2012). The histological status of such embryos is revealed: isolation of organ germs and their tissue differentiation, all organs are represented by actively developing meristematic cells not covered by a dense cell wall. It is shown that callus is formed from epidermal cells of the scutellum which are in contact with the nutrient medium.

Keywords: *embryo in planta, morphogenic callus in vitro, wheat Triticum aestivum L.*

СОХРАНЕНИЕ РЕДКОГО ВИДА *BELLEVALIA SARMATICA* (GEORGI) WORONOW КУЛЬТУРЫ *IN VITRO*

А.И. Кутковски-Муштук, Н.Г. Чоркина, М.Г. Лозинский

Национальный Ботанический сад (Институт) Академии Наук Молдовы, Кишинев, Молдова, alinacutcovschi@mail.ru

Аннотация: *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronow луковичное степное декоративное растение, включенное в Красную книгу Молдовы, охраняемое государством. Метод культивирования *in vitro* позволяет долговременно сохранять и культивировать в особых условиях со строго установленными параметрами на искусственно приготовленных питательных средах. Одним из основных условий успешного микро-клонирования является стерилизация растения и питательных сред.

Ключевые слова: *Bellevalia sarmatica*, *in vitro*, питательные среды

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1295-1298

Одной из актуальных проблем современной ботаники является разработка стратегии сохранения разнообразия видов растений, находящихся под угрозой исчезновения.

Наиболее успешной стратегией долгосрочной охраны многообразия является щита и сохранение фитоценозов и популяций спонтанной флоры – сохранение *in situ*. Но многие редкие виды достигли предела, и только сохранение *in situ* не решает проблемы защиты от все более интенсивных антропогенных факторов.

Одним из наиболее успешных методов сохранения видов от вымирания является поддержание и умножение таксона в искусственных условиях, соответствующих тем, которые в природе. Интродукция редких и исчезающих видов растений *ex situ* обеспечивает сохранение и изучение биологии их развития, различные виды размножения и культивирование вегетативно размножающегося биологического материала, эти моменты являются основой для репатриации этих видов в экологические ниши естественного произрастания видов. Сохранение интактных ценотропных фитопопуляций и генетически биологического разнообразия видов, ботанические сады играют огромную роль в увеличении количества таксонов.

Метод культивирования *in vitro* позволяет долговременно сохранять и культивировать в особых условиях со строго установленными параметрами на искусственно приготовленных питательных средах, на которые инокулируются клетки, ткани, меристемы и т.д. Метод культивирования тканей позволяет нам получить посадочный материал за относительно короткое время и в ограниченном пространстве.

Род *Bellevalia* включает около 50 видов растений. *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronow луковичное степное декоративное растение, включенное в Красную книгу Молдовы, охраняемое государством. Не так давно степные районы занимали 2/3 всей территории Молдовы, в то время как естественные степные популяции сохранялись как ограниченные территории и охраняемые территории государства.

Bellevalia многолетний луковичный поликарпик. Луковица овальная, 2–4 см в диаметре. Стебель безлистный, утолщённый, в верхней половине с соцветием, 15–30 см высотой, голый. Прикорневые листья в числе 3–7 ремневидные, мясистые, книзу суженные. Соцветие кистевидное; цветоножки при цветах прямостоячие, отклонённые, в 4–8 раз длиннее цветов, при плодах горизонтально отклонённые, сильно удлиняющиеся до 12 см длиной. Околоцветник колокольчатый, 8–9 мм длиной, серовато-бурый, доли его прямые, овально ланцетные, короче трубки в 3 раза, желтовато-белые. Плод – продолговатая коробочка с 2–8 (10) семенами (рис. 1).



Рис. 1. *Bellevalia sarmatica* (Georgi).

Использование культур *in vitro* является де-факто методом сохранения, представляющим собой жизнеспособную и эффективную альтернативу для защиты и сохранения генетического фона редких и исчезающих видов.

Одним из основных условий успешного микро-клонирования является стерилизация растения. Экспланты, взятые с донорского растения (луковица, фрагменты луковиц), тщательно промывались в водопроводной воде.

Сначала промытые проточной водой части чешуй выдерживали в растворе перманганата калия (0,05%) с Tween-20 в течение 20 минут, далее промывали трехкратно дистиллированной водой и переносили в бокс, под ламинар, в основной дезинфицирующий раствор. Поверхностную стерилизацию проводили 70%-ым раствором спирта в течение 30 секунд. Потом выдерживали в растворе диацета 0,3% (5-7 минут), после каждой процедуры материал трижды промывался дистиллированной водой. Время экспозиции и оптимальную концентрацию диацета определили экспериментально.

После стерилизации растительного материала эксплантаты инокулировали на питательную среду в большие или маленькие баночки в соответствии с размером взятых фрагментов, так чтобы неформованные луковицы имели достаточное пространство для развития.

Для изучения реактивности этого вида в *in vitro* было проверено несколько вариантов культуральной среды, все из которых имели макро- и микроэлементы в соответствии с MS (Murashige-Scoog, 1962).

При подготовке питательных сред pH доводили до 5,9-6,0, после чего их автоклавировали в течение 15 минут при 120 °С. Первичные экспланты культивировали в вегетационной комнате в темноте при 20 °С. Для введения в культуру *in vitro* в первом пассаже мы использовали безгормональную питательную среду по прописи Murashige, Skoog (1962) – (MS). После их адаптации в культуре и отсева инфицированных и некротированных эксплантов, через 2 недели, во втором пассаже были протестированы среды, провоцирующие интенсивный геммогенез с различными концентрациями цитокининов. Как известно, цитокинины способствуют пробуждению и росту адвентивных почек, луковичек, поэтому было исследовано влияние трёх типов цитокининов в концентрациях от 0,5 до 10 мг/л в сочетании с ауксинами в концентрациях от 0,1 до 0,25 мг/л. Максимальные показатели размножения, полученные на средах с исследуемыми гормонами, отображены в таблице.

Таблица.

Интенсивность регенерации микролуковичек и преобладающий тип морфогенеза у эксплантов чешуй редких видов в зависимости от регуляторов роста и их концентраций в питательной среде

Вид	Вариант среды MS	Цитокинины/ Ауксины	Концентрация гормонов, мг/л
<i>Bellevalia sarmatica</i> (Georgi) Woronov	B1	БАП/ α -НУК	0,5/0,25
	B2	кинетин/ ИУК	0,2/0,1
	B3	2iP/ ИУК	0,5/0,2

Введение в культуру *in vitro* проводили на питательных средах с различными концентрациями фитогормонов. Для инициирования культуры были испытаны низкие средние значения ауксина и цитокинина (варианты В-1, В-2, В-3). Два варианта среды (В-6, В-9) были протестированы для быстрого развития лукович и образования корней.

В качестве источника углерода использовали сахарозу. Все культуральные среды затвердевали при концентрации 6 г/л агара, рН среды устанавливали до 5,8 перед автоклавированием.



Рис. 2. *Bellevalia sarmatica* (Georgi) в *in vitro*.

Первые очевидные прогнозы были сделаны через 4 недели, когда было обнаружено, что большое количество эксплантов образовали небольшие выпуклости, похожие на луковичи 0,5 мм (рис. 2). Тестирование и экспериментальный анализ среды показали оптимальную среду для инициирования культуры: микро- и макроэлементы по Murashige, Skoog (1962), добавленные с гормональной концентрацией 0,5 мг/л (БАП) и 0,25 мг/л - (α -НУК). После 6 недель инкубации на этой среде получали 10-12 лукович/эксплантов с диаметром 3,0 мм. На среде В-2, с меньшей концентрацией БАП, образовалось меньшее количество лукович (7-9 лукович/эксплантов). Регенерация также имела место на питательной среде с кинетином (В-2), но с более низким процентом (4-6 лукович / эксплант). Первые луковичи *de novo* на этой среде наблюдались через 8 недель. Это свидетельствует о том, что присутствие БАП

способствует более высокой активности и поддержанию роста изолированных тканей и индукции органогенеза по сравнению с вариантами обогащенными кинетином. Полученные луковицы переносили в дополнительные среды с более высокой концентрацией фитогормонов и сахарозы. Увеличение концентрации сахарозы в среде заставляло луковицы расти быстрее, а на этих средах наиболее крупные луковицы с диаметром 14-17 мм. В течение 2 недель на средах В-6, В-9 началось формирование корневой системы и произошло формирование листьев. Растения, полученные на средах В-6 и В-9, не имели больших различий в размерах. Однако наиболее оптимальной средой на этой стадии является среда В-6 с концентрацией 60 г/л сахарозы. Использование различных концентраций фитогормонов позволяет руководить и ускорять условия переноса растений *de novo* в условиях *ex vitro*. Высокие концентрации сахарозы вызывают более быстрый рост эксплантатов, что позволяет значительно сократить период созревания луковиц и ускорить фазы цветения на 1,5-2,0 года.

Неформованные луковицы *in vitro* проходят несколько этапов акклиматизации и успешно переносятся в условия *ex vitro*. Первоначально они были посажены в перлит и торф (1:1). В течение первых 14 дней культивирования влажность воздуха поддерживалась дисперсией воды – туманом для этого использовали полиэтиленовые камеры. Все растения (100%) адаптировались, продолжали расти и развиваться.

CONSERVATION OF THE RARE KIND OF *BELLEVALIA SARMATICA* (GEORGI) WORONOW CULTURE *IN VITRO*

A. Cutcovschi-Mustuc, N.Ciorchina, M. Lozinschi

National Botanical Garden (Institute) of Republic of Moldova, Chisinau, Republic of Moldova, alinacutcovschi@mail.ru

Abstract. *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronov bulbous steppe ornamental plant, included in the Red Book of Moldova, protected by the state. The method of *in vitro* cultivation allows long-term preservation and cultivation under special conditions with strictly established parameters on artificially prepared nutrient medium. One of the main conditions for successful micro-cloning is sterilization of the plant and nutrient medium.

Keywords: *Bellevalia sarmatica*, *in vitro*, nutrient medium

МЕТОД КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *IN VITRO* ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ *WITHANIA SOMNIFERA* L. (DUNAL)

А.И. Кутковски-Муштук, Н.Г. Чоркина, М.И. Трофим

Национальный Ботанический сад (Институт) Академии Наук Молдовы, Кишинев, Молдова, alinacutcovschi@mail.ru

Аннотация. Растение *Withania somnifera* L. (Dunal), семейства *Solanaceae* исследуется в качестве растения интродуцента в Молдовы с высокими терапевтическими свойствами. Для размножения растений существует много способов регенерации. Но есть растения, которые для воспроизведения требуют особых условий. Одно из них – *W. somnifera*.

Ключевые слова: *Withania somnifera*, экспланты, стерилизация

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1299-1302

Последние столетия ботанические сады внесли значительный вклад в развитие и экологического воспитания общества. Роль ботанических садов в сохранения фиторазнообразия видов растений нашей планеты трудно переоценить. Для размножения растений существует много способов регенерации. Но есть растения, которые для воспроизведения требуют особых условий.

Один из способов сохранения генофонда редких и эндемических видов в условиях установок искусственного климата может быть создание коллекций живых растений *in vitro*, меристем, культур клеток, культур тканей и в виде семян другого генетического материала.

Выращивание в условиях *in vitro* дает возможность контролировать многие факторы внешней среды: температуру, влажность, продолжительность и интенсивность светового дня, состав питательных веществ. Это и определило широкое использование культуры растительных тканей *in vitro* в качестве модельной системы для теоретических и прикладных исследований в области физиологии и биотехнологии растений.

Растение *Withania somnifera* L. (Dunal) (рис. 1) семейства *Solanaceae* исследуется в качестве растения интродуцента в Молдовы с высокими терапевтическими свойствами ценными в медицине Ayurvedic. Этот вид широко распространен во многих регионах Азии, Африки и Европы, но родом из Индии. *Withania Somnifera* также называют Ashwagandha или зимняя вишня. В Индии это растение популярно и называют его индийский женшень, но самое известное имя – Ashwagandha, что в переводе означает «лошадиный запах». Ashwagandha у себя на родине – многолетнее растение, в наших условия ведет себя как однолетнее растение.

Как правило, каждая искусственная среда *in vitro* представляет собой комбинацию неорганических соединений (минералы) и органические соединения, в том числе углеводы, витамины и рострегулирующие вещества. Каждая питательная среда, используемая для культуры, содержит затвердители, обычно агар. Для подготовки среды, вода должна быть очищенной, фильтрованной, дистиллированной, деионизированной.

Инокуляция культуры *in vitro* составляет два последовательных этапа:

- 1) выбор и приготовление экспланта из стерильного растительного материала;
- 2) размещение экспланта в культуральные пробирки, колбы (сосуд) методом инокуляции на поверхность среды.

Выбор и стерилизация донорских органов эксплантов имеют важную роль, как и источник растительного материала, а также и период сезона, в котором эксплант принят для инокуляции.



Рис. 1. *Withania somnifera*.

При культивировании вида *in vitro* были протестированы различные варианты сред и различные типы эксплантов. Были разработаны схемы стерилизации растительного материала, экспланта и сред.

Для исследования влияния цитокининов на морфогенные процессы у *W. somnifera* были отобраны различные типы эксплантов: апикальные и боковые меристемы, фрагменты побегов, фрагменты листьев (3x4 мм), семена. Все экспланты были взяты из растений, выращенных в открытом грунте. Перед инокуляцией *in vitro* экспланты дезинфицировали.

Для стерилизации растений *Withania somnifera*, во-первых, каждая часть растения была разделена и каждый тип фрагмента помещали в разные стаканы и закрывали чашками Петри. Каждый эксплант промывали 4-5 раза водопроводной водой, после чего добавляли Na_2SO_4 , промывали, пока моющее средство не исчезнет. Для дезинфекции добавляли Tween 20 (2 капли) + KMnO_4 (4 капли), после чего экспланты сначала промывали водопроводной водой, а затем 2–3 раза промывали дистиллированной водой. После исчезновения раствора в дистиллированную воду добавляли в стакан 2-3 капли KMnO_4 , и материал оставляли в этом растворе в течение 10 минут и транспортировали в бокс.

В боксе удаляли дистиллированную воду и добавляли диацид 0,01%. Меристемы оставляли в диациде в течение 7 минут, остальные части растения выдерживали в диациде 10 минут. После удаления диацида экспланты промывали 4 раза автоклавированной дистиллированной водой для тщательного промывания от диацида. Для более эффективной дезинфекции растения промывали H_2O_2 , затем снова промывали автоклавированной дистиллированной водой.

После стерилизации все экспланты инокулировали на разные типы сред с или без гормонов.

Перед инокуляцией был выбран состав среды. В дополнение к микро- и макроэлементам в среде также важны витамины и сахароза. рН, установленный нами для питательной среды *in vitro* *W. somnifera*, составляет 5,6–5,8. После приготовления среды стерилизовали в автоклаве при 115 °С в течение 8 минут – для агаровой среды и при 110 °С в течение 5 минут – для жидких сред.

После инокуляции все растения были помещены в культуральную, где температура поддерживалась на уровне 23 ± 20 °С, 16 часов света/8 часов темноты и 65% относительной влажности воздуха.

Различные питательные среды были испытаны для культивирования *in vitro* *W. somnifera*, протестированы на индукцию и иницирование органогенеза, проявляющегося посредством процессов ризогенеза и каулогенеза. Мы также тестировали среды для укоренения *W. somnifera* в культуре *in vitro*. Процесс разработки этого растения в культуре *in vitro* обусловлен регуляторами роста, которые используются в различных количествах в среде. Основной средой, используемой для развития культуры *in vivo*, является Murashige, Skoog. В зависимости от количества ауксинов и цитокинов продолжается развитие растений. Известно, что в процессе органогенеза содержание ауксинов должно быть ниже, чем цитокинов, тогда как для ризогенеза увеличивается содержание ауксина и уменьшается цитокинин.

Инокуляция растений является сложным процессом, который протекает в стерильных условиях. *Withania somnifera* – это растение с благоприятными свойствами для инокуляции и высоким регенерационным потенциалом. Вначале инокулировали меристемы, затем листья, цветы, семена. В результате I-посадки появился калусогенез, ризогенез и каулогенез. Для следующих посадок (2-5) использовали калусную массу и меристемы от растений, полученных *in vitro*. У растений, которые образовывали корни, воздушную часть инокулировали в условиях *in vitro*, а корни переносили в *ex vitro* для развития растений в открытый грунт. Растение инокулировали на агаризованной и жидкой среде.

Средняя температура хранения растений в культуре *in vitro* составляла 23-25 °С. Когда температура опускается ниже 20 °С, растения перестают расти. Во всех испытанных средах визуализировались ризогенез, каулогенез и калусогенез.



Рис. 2. *Withania somnifera* в *in vitro*.

За основу для развития *Withania somnifera in vitro* была взята агаризованная среда MS-100% с добавлением гормонов. Была обогащена следующими гормонами: БАП; 2,4 D; 2,5 S + зеатин и α -НУК. Для инокулирования были использованы следующие виды эксплантов: апикальная и латеральная меристемы, фрагменты листьев, стеблей. Экспланты инокулированы на этих средах. Полученные результаты показали, что изменения в культуре *in vitro* находятся в зависимости от времени года, от фазы развития, расположения по своей природе экспланта на стебле и от гормонального баланса ауксинов и цитокининов. После 4 недель у эксплантов, которые были инокулированы на среды с добавлением 2,4 D и БАП гормонов, было отмечено

калусообразование, а на средах с добавлением гормона 2,5S+зеатин и α -НУК – каулогенез и ризогенез (рис. 2). Более эффективное развитие новообразований наблюдалось на эксплантах из апикальной и боковой меристем. Затем культуры перемещены в специальные для выращивания камеры или помещения – так называемые инкубационные.

CULTIVATION METHOD *IN VITRO* OF MEDICINAL PLANT *WITHANIA SOMNIFERA* L. (DUNAL)

A. Cutcovschi-Mustuc, N. Ciorchina, M. Trofim

National Botanical Garden (Institute) of the Academy of Sciences of Moldova,
Chisinau, Republic of Moldova, alinacutcovschi@mail.ru

Abstract. The plant *Withania somnifera* L., Solanaceae family is investigated as a plant of an introducent in Moldova with high therapeutic properties. For the reproduction of plants, there are many ways of regeneration. But, there are plants that require special conditions for reproduction. One of them is *W. somnifera*.

Keywords: *Withania somnifera*, explants, sterilization

ПЕРСПЕКТИВЫ *DRACOSEPHALUM* В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Е.В. Кучарова, Ж.М. Охлопкова

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», Якутск, Россия, oleneek@mail.ru

Аннотация. Работа посвящена изучению перспектив использования растений рода *Dracoscephalum* для культивирования. Также рассмотрены методы получения культур клеток разных видов *Dracoscephalum*.

Ключевые слова: *Dracoscephalum*, *in vitro*, полюс холода – Оймякон, уникальный химический состав, культура клеток

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1303-1304

Издавна змееголовники известны своими лекарственными свойствами, применяемыми в народной медицине, при болезнях дыхательных путей, в качестве жаропонижающего средства, при астении, как средство, повышающее потенцию. Лекарственные свойства их обусловлены содержанием в надземной части растений биологически активных веществ – карденолидов, алкалоидов, дубильных веществ, кумаринов, флавоноидов [Данилова, Павлова, 2012]. Среди представителей рода *Dracoscephalum* можно отметить *D. kotscyi* Voiss, который имеет антиноцептивный эффект, эфирные масла *D. surmandinum* ингибируют рост клеток аденокарциномы молочной железы человека [Кузовкина и др., 2014], *Dracoscephalum moldavica* используется в качестве кардиотонического агента и имеет антиаритмический и противоинфарктные свойства [Pouraboli et al., 2016]. *D. kotschyii* содержит в листьях противоопухолевый компонент ксантомитрол, который при клинических экспериментах *in vivo* был более эффективным при ингибировании темпа роста опухоли [Najafi et al., 2009]. Таким образом, род *Dracoscephalum* притягивает внимание исследователей в изучении химического состава и выявлении полезных свойств.

Существует множество работ *in vitro* по представителям рода *Dracoscephalum* с использованием различных эксплантов – как узловые сегменты, эксплантаты листьев и подмышечных почек.

Из-за редкой встречаемости и малого количества некоторых видов *Dracoscephalum* для исследователей *in vitro* является удобным методом получения биомассы с целью дальнейшей коммерциализации крупномасштабного производства различных соединений.

В Республике Саха (Якутия) род *Dracoscephalum* представлен пятью видами. При изучении химического состава надземной фитомассы *Dracoscephalum palmatum* Steph., произрастающего на территории Полюса холода – Оймякон, было выделено 23 соединения (фенилпропаноиды, кумарины, флавоноиды и тритерпены), среди которых сальвионоловая кислота В, кафтаровая кислота, цихориновая кислота, умбеллиферон, эскулетин, апигенин-7-0-β-D-глюкуронопиранозид, изооргофоллин и лютеолин-4'-0-β-D-глюкопиранозид) были обнаружены впервые для представителя рода *Dracoscephalum* [Olennikov et al., 2013].

Исходя из этого в качестве объекта, был выбран вид *Dracoscephalum palmatum* Steph. Приспособление к условиям Крайнего Севера, высокая скорость роста, а также уникальный химический состав делают этот вид удачным для клеточных культур. В результате проведенных нами исследований по культурам клеток растения *Dracoscephalum palmatum* Steph. была выявлена высокая всхожесть семян в лабораторных условиях, также интенсивное каллусообразование. В дальнейшем

планируется работа по получению нескольких линий культур клеток и исследованию их вторичных метаболитов.

Литература

Данилова Н.С., Павлова П.А. Интродукционные возможности видов рода *Dracocephalum* L. в Центральной Якутии // Вестник КрасГАУ. – 2012. – № 9. – С. 70–72.

Кузовкина И.Н., Прокофьева М.Ю., Урмалина А.Р., Чернышева Т.П. Морфологические и биохимические особенности генетически трансформированных корней шлемника андрахновидного // Физиология растений. – 2014. – Т. 61, № 5. – С. 739–749.

Najafi M., Ghasemian E., Fathiazad F., Garjani A. Effects of total extract of *dracocephalum moldavica* on ischemia/reperfusion induced arrhythmias and infarct size in the isolated rat heart iranian // Journal of Basic Medical Sciences. – 2009. – V. 11, No. 4. – P. 229–235.

Olennikov, D.N., Chirikova N.K., Oklopkova Z.M., Zulfugarov I.S. Chemical composition and antioxidant activity of *tánara ótó* (*Dracocephalum palmatum* Stephan), a medicinal plant used by the Nort-Yakutian Nomads // Molecules. – 2013. – V. 18. – P. – 14105–14121.

Pouraboli I., Nazari S., Sabet N. et al. Antidiabetic, antioxidant, and antilipid peroxidative activities of *Dracocephalum polychaetum* shoot extract in streptozotocin-induced diabetic rats: *in vivo* and *in vitro* (Ed. John M. Pezzuto) // Pharm. Biol. – 2016. – No. 54 (2). – P. 272–278.

PROSPECTS OF *DRACOCEPHALUM* IN CULTURE OF CELLS

E.V. Kucharova, Zh.M. Okhlopkova

M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia, oleneek@mail.ru

Abstract. The work is devoted to the study of the prospects of using plants of the genus *Dracocephalum* for cultivation. Methods of obtaining cell cultures of different types of *Dracocephalum* were also considered.

Keywords: *Dracocephalum*, *in vitro*, pole of cold – *Oymyakon*, unique chemical composition, cell culture

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОЦЕНКЕ ФЕНОТИПА ТРАНСГЕННЫХ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

В.Г. Лебедев, К.А. Шестибратов

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пушкино, Россия, vglebedev@mail.ru

Аннотация. Изучение фенотипа растений является неотъемлемой частью как фундаментальных, так и прикладных исследований. В последние годы для этих целей стали активно применяться компьютерные методы анализа, в основном, на травянистых растениях. Начиная с 2010 года, мы работаем над изучением фенотипа трансгенных растений осины, березы и груши с помощью технологий имиджинга. Исследовано влияние генотипа и условий выращивания на изменение параметров листовой пластинки и плодов трансгенных деревьев.

Ключевые слова: фенотипирование, трансгенные растения, груша, осина, береза

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1305-1307

Фенотип организма является продуктом взаимодействия генотипа и окружающей среды, и понимание этих взаимосвязей является одной из ключевых проблем современной биологии. Изучение фенотипа особенно актуально для трансгенных растений, у которых встраивание новых или блокирование экспрессии существующих генов в большинстве случаев приводит к его изменениям, причем, не всегда ожидаемым (т.н. непреднамеренные эффекты). Традиционные методы оценки фенотипа (например, с помощью измерительных приборов) очень длительны и трудоемки, а также деструктивны, что не позволяет проводить широкомасштабные эксперименты с большим числом генотипов, а также исключает повторный анализ одних и тех же растений. Этим недостатком лишена современная экспериментальная технология из т.н. омикс-технологий – феномика. Составной частью феномики является фенотипирование – комплексная оценка признаков растения через количественное измерение его отдельных параметров, и поэтому ее иногда называют высокопроизводительной физиологией растений. Компьютерный анализ изображений, представляющих собой оцифрованные признаки, позволил существенно увеличить производительность фенотипирования, которое выступало тормозящим фактором в научных исследованиях [Furbank, Tester, 2011].

Древесные растения являются интересным объектом изучения как с точки зрения фундаментальной науки, так и прикладных исследований, но им уделяется значительно меньше внимания по сравнению с травянистыми видами. Феномика также не является исключением: в одном из последних обзоров по этой теме [Humprik et al., 2015] около половины исследований проводилось с арабидопсисом, а остальные – в основном с зерновыми, но древесные растения не упоминались. Около 10 лет назад, когда методы высокопроизводительного фенотипирования только входили в употребление, нами была разработана оригинальная методика анализа окраски плодов, основанная на получении изображений в стандартизованных условиях и их последующем анализе в системе цифровых координат L^*a^*b . Данная методика была использована для оценки динамики созревания плодов томата, в которых методом РНК интерференции был подавлен ген биосинтеза этилена [Долгов и др., 2008]. В дальнейшем компьютерные методы анализа изображений мы использовали для оценки фенотипа ряда древесных трансгенных растений – осины, березы и груши, экспрессирующих различные гены.

Листья являются органом фотосинтеза и играют большую роль в выживании и росте растений [Xu et al., 2009]. Известно много примеров изменения формы и

размеров листьев у трансгенных растений, как ожидаемых, так и непреднамеренных. В своих исследованиях на листьях трансгенных деревьев мы использовали программу LAMINA (Leaf shApe deterMINAtion) [Bylesjo et al., 2008]. Анализ листовых параметров двулетних трансгенных растений осины и березы с геном глутаминсинтетазы GS1, основного фермента азотного метаболизма растений, проведенный в 2010 году в теплице, показал отличия от контроля по ряду признаков. Оценка этих же растений в полунатуральных условиях в 2011 году существенных различий не выявила, но после переноса из защищенного грунта площадь листьев березы уменьшилась в среднем на 25%, а осины – на 37%. В трехлетнем эксперименте (2014-2016) мы оценивали влияние трансформации геном GS1 на рост и содержание листовых пигментов у двух видов березы (*Betula pubescens* и *B. pendula*), выращиваемых в полунатуральных условиях на различном азотном фоне [Lebedev et al., 2017]. Анализ листьев 21 генотипа березы (4 контрольных и 17 трансгенных) с помощью программы LAMINA позволил определить эффект встраивания гена и различной доступности азота.

Компьютерную оценку листовых параметров проводили также на растениях осины, трансформированных с целью модификации состава древесины геном ксилоглюканазы *sp-Xeg* из гриба *Penicillium canescens* [Шестибратов и др., 2012] или РНК-интерференционной конструкцией с фрагментами гена биосинтеза лигнина 4CL [Shestibratov et al., 2011]. Эксперименты в 2012-2013 годах показали, что ген ксилоглюканазы, помимо изменения содержания целлюлозы, привел к уменьшению ширины листовой пластинки у некоторых генотипов. Блокирование экспрессии гена 4CL не повлияло на площадь листьев, но существенно изменило их форму – они стали менее округлыми.

Исследования по фенотипированию также осуществляли на трансгенных растениях груши, проходившими полевые испытания [Lebedev, Dolgov, 2008; Dolgov et al., 2011]. Измерения изображений листьев, выполненные в 2011-2013 годах, показали отклонения для ряда генотипов, но в большинстве случаев они были нестабильными во времени, что позволяет предположить влияние погодных условий. Для оценки формы и размера плодов трансгенных растений груши с маркерным геном *gus* использовали программу TomatoAnalyzer [Brewer et al., 2006]. Плоды нескольких генотипов, собранные в 2011 году, показали превышение над контрольными образцами по нескольким параметрам. Однако изменения были нестабильными: у тех же генотипов плоды урожая 2013 года не отличались от контроля, тогда как у других были отмечены изменения в меньшую сторону. Насколько нам известно, ранее об анализе размера и формы плодов трансгенных деревьев, тем более с помощью компьютерных технологий, не сообщалось.

В настоящее время мы работаем над 3Д моделированием кроны трансгенных деревьев на основе цифровых изображений.

Литература

Долгов С.В., Тимербаев В.Р., Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., Корнеева И.В., Харченко П.Н. Использование механизма ПТИГ для модификации процесса созревания плодов. Сборник научных трудов «Молчание генов». – Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2008. – С. 253–269.

Шестибратов К.А., Подрезов А.С., Салмова М.А., Ковалицкая Ю.А., Видягина Е.О., Логинов Д.С., Королева О.В., Мирошников А.И. Фенотипическое проявление экспрессии гена ксилоглюканазы из *Penicillium canescens* в трансгенных растениях осины // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 5. – С. 1–9.

Brewer M.T., Lang L., Fujimura K., Dujmovic N., Gray S., van der Knaap E. Development of a controlled vocabulary and software application to analyze fruit shape variation in tomato and other plant species // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141. – P. 15–25.

Bylesjo M., Segura V., Soolanayakanahally R.Y., Rae A.M., Trygg J., Gustafsson P., Jansson S., Street N.R.. LAMINA: a tool for rapid quantification of leaf size and shape parameters // *BMC Plant Biology.* – 2008. – V. 8. – No. 82.

Dolgov S.V., Lebedev V.G., Firsov A.P. Pear fruit taste modification by thaumatin II gene expression // *Acta Horticulturae.* – 2011. – V. 909. – P. 67–73.

Furbank R.T., Tester M. Phenomics – technologies to relieve the phenotyping bottleneck // *Trends Plant Sci.* – 2011. – V. 16. – P. 635–644.

Humplik J.F., Lazar D., Husickova A., Spichal L. Automated phenotyping of plant shoots using imaging methods for analysis of plant stress responses - a review // *Plant Methods.* – 2015. – V. 11. – No. 29.

Lebedev V.G., Dolgov S.V. Stability of gus and bar gene expression in transgenic pear clonal rootstock plants during several years // *Acta Horticulturae.* – 2008. – V. 800. – P. 373–382.

Lebedev V.G., Kovalenko N.P., Shestibratov K.A. Influence of nitrogen availability on growth of two transgenic birch species carrying the pine GS1a gene // *Plants.* – 2017. – V. 6(1). – No. 4.

Shestibratov K., Lebedev V., Podrezov A., Salmova M. Transgenic aspen and birch trees for Russian plantation forests // *BMC Proceedings.* – 2011. – V. 5, Suppl. 7. – P. 124.

Xu F., Guo W., Xu W., Wei Y., Wang R. Leaf morphology correlates with water and light availability: What consequences for simple and compound leaves? // *Prog Nat Sci.* – 2009. – V. 19. – P. 1789–1798.

IMAGING TECHNOLOGIES IN PLANT PHENOTYPING OF TRANSGENIC TREES

V.G. Lebedev, K.A. Shestibratov

Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia, vglebedev@mail.ru

Abstract. The plant phenotyping is an integral part of both fundamental and applied research. In recent years, automated image analysis has been actively used, but mainly for herbaceous plants. Since 2010 we are studying the phenotype of transgenic aspen, birch and pear plants using imaging technology. The effects of the genotype and environmental conditions on size and shape of leaves and fruits of transgenic trees were investigated.

Keywords: *phenotyping, transgenic plants, pear, aspen, birch*

ВЛИЯНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ МЕТАБОЛИТОВ *FUSARIUM SPOROTRICHIOIDES* НА ПРОЦЕССЫ РЕГЕНЕРАЦИИ *AVENA SATIVA* В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

С.Ю. Луговцова, Н.А. Нешумаева, Н.В. Зобова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, Россия, zobovnat@mail.ru

Аннотация: Токсические метаболиты *F. sporotrichioides* в концентрации 40 и 50% в среде пролиферации каллусов овса достоверно ингибируют их рост и регенерацию, как на селективной среде пролиферации, так и на среде регенерации без метаболитов, сохраняя свое последствие с предыдущего этапа отбора на селективных средах пролиферации. Применение более высокого уровня стресса, чем 50% метаболитов в культуре каллусов овса для отбора устойчивых форм не оправдано. На средах с метаболитами получены регенеранты овса.

Ключевые слова: овес, каллусная культура, регенерация, фитотоксины. *F. sporotrichioides*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1308-1312

Диапазон взаимоотношений микроорганизмов с растением очень широк – от патогенеза до симбиоза [Кононенко, Буркин, 2009; Гагкаева и др., 2012; Щеклеина, Щенникова, 2013]. Актуальность изучения и определения токсигенных грибов и продуцируемых ими микотоксинов, влияющих на развитие растений, признана во всем мире и связана с их чрезвычайно серьезной опасностью для животных и человека. В то же время эти грибы представляют практический интерес для современной биотехнологии как продуценты биологически активных веществ, которые могут быть использованы в качестве селективных факторов для отбора устойчивых форм в клеточной селекции зерновых культур [Сурин и др., 2001, 2002; Тырышкин, 2007]. Отсутствие генетических источников устойчивости к фузариозной грибной инфекции осложняет создание требуемых сортов классическими методами. Использование культуры *in vitro* в получении устойчивых к корневым гнилям растений-регенерантов овса в присутствии токсических метаболитов возбудителей, может решить проблему борьбы с распространением этой инфекции.

Целью исследований явилось изучение влияния метаболитов микромицетов р. *Fusarium* в отношении процессов регенерации в каллусной культуре овса для отбора генотипов, устойчивых к фузариозным инфекциям.

В качестве объектов исследования использовали 6 пленчатых сортов овса: Тубинский, Саян, Казыр, Сельма, Талисман, Золотой початок и 2 голозерных: Голец, Тюменский голозерный. Донорные растения для введения в культуру выращивали в полевых условиях. Культивирование тканей *in vitro* [Бутенко, 1989] проводили в три этапа: индукция, пролиферация и регенерация каллусов, используя среду Мурасиге-Скуга (МС) в качестве основы. Индукция каллусогенеза протекала в культуре незрелых зародышей овса на среде МС с добавлением 2,4-Д – 3 мг/л и ИУК – 2 мг/л. Образовавшиеся жизнеспособные каллусы пассировали на среду пролиферации (МС + 2,4-Д – 1,5 мг/л) контрольную и селективные. В качестве селективирующего агента служили токсины гриба *F. sporotrichioides*, выделенного из популяции региональных возбудителей семенных инфекций овса. Для их получения изолят *F. sporotrichioides* культивировали поверхностным способом на питательной среде Чапека в течение 14 суток при температуре 24 °С. После удаления биомассы микромицета, полученный

фильтрат метаболитов стерилизовали методом Тиндаля. Простерилизованные метаболиты *F. sporotrichioides* (*Fs*) добавляли в среду пролиферации каллусов в разных концентрациях – 30%, 40% и 50%. Регенерацию растений в каллусной культуре проводили на среде МС с кинетином – 1 мг/л и ИУК – 0,5 мг/л без применения селективирующего агента. Данные в таблицах приведены в относительных единицах (число эксплантов, претерпевших изменения/количество пассированных на соответствующие среды, %). При обработке данных использовали многомерный дисперсионный анализ [Сорокин, 2010].

Исследованные сорта отличались по отзывчивости на условия культивирования *in vitro* и формирования каллусов. Наибольшую индукцию с учетом фрагментации крупных каллусов показали голозерные сорта Голец (98,5%), Тюменский голозерный (90,4%) и пленчатые Тубинский (109,2%), Саян (96,7%) (таблица не приводится).

Образовавшиеся каллусы пересаживали на среды пролиферации: контрольную и с метаболитами *Fs*. Добавление в среду 30% и 40% *Fs*, вело к угнетению процессов пролиферации (увеличение объемов каллусов) и стеблегенеза (побегообразование) практически у всех сортов (табл. 1).

Таблица 1.

Характеристика регенерационных процессов в культуре *in vitro* незрелых зародышей овса на селективных средах, содержащих метаболиты *F. sporotrichioides*

Сорт	Пролиферация			Стеблегенез		
	контроль	Fs-30%	Fs-40%	контроль	Fs-30%	Fs-40%
Тюменский голозерный	72,5	44,7	40,7	37,5	28,9	33,3
Голец	73,9	36,0	24,6	45,7	19,1	11,5
Тубинский	80,0	44,9	23,6	37,8	26,9	16,4
Саян	79,4	29,8	22,8	44,1	17,9	14,0
Казыр	68,2	59,6	39,4	27,3	46,8	15,2
Золотой початок	100	38,3	22,5	21,2	26,7	0
Сельма	86,1	53,6	33,3	36,1	26,8	0
Талисман	54,8	36,7	23,5	16,1	20,3	9,8
Среднее по всем сортам	76,9	43,0	28,8*	33,2	26,7	12,5*
Стандартная ошибка	опыта=10.0 (пролиферация)			опыта=9.71 (стеблегенез)		
Различия средних	фактора "сорта" – недостоверны, "условия" – достоверны на уровне 1%					

Здесь и далее в таблицах * – достоверные отличия $P < 0,05$

На среде с более высоким содержанием токсических метаболитов (*Fs*-40%) наблюдалось достоверное угнетение процессов по сравнению с контролем почти в 2 раза. Из голозерных сортов наиболее устойчивым к стрессору оказался Тюменский голозерный, у которого пролиферация и стеблегенез близки на контрольной и селективных средах. Различия между сортами по опыту не значимы.

Выход полноценных растений регенерантов оценивали на двух фонах: 1 - на среде пролиферации с метаболитами *Fs* и 2 – на среде регенерации без таковых (табл. 2). На среде пролиферации (фон 1, табл. 2) образование регенерантов шло достаточно активно, достигая 42-31% в контроле, снижалось почти у всех генотипов в присутствии метаболитов *Fs*, а при их концентрации в среде 40% - достоверно. Можно отметить сорта Тюменский голозерный, Тубинский и Сельма с наиболее высокими показателями регенерации в этих условиях.

Каллусы овса, не подвергшиеся некрозу на стадии пролиферации, но не сформировавшие полноценных регенерантов, пассировали на среду регенерации без метаболитов. Уровень регенерации в этих условиях снижался двукратно в контроле, а последствие метаболитов *Fs* отражалось в дополнительном снижении показателя регенерации, для *Fs*-40% – значимом (фон 2, табл. 2).

Таблица 2.

Характеристика образования регенерантов, пригодных для высадки в грунт после отбора на селективных средах, на двух фонах

Сорт	Фон 1 – среда пролиферации с токсинами			Фон 2 – среда регенерации без токсинов		
	контроль	<i>Fs</i> -30%	<i>Fs</i> -40%	контроль	<i>Fs</i> -30%	<i>Fs</i> -40%
Тюменский голозерный	42,5	40,8	33,3	13,3	40,0	44,4
Голец	26,1	22,5	21,3	87,5	5,6	0
Тубинский	31,1	19,2	14,5	20,8	34,6	37,5
Саян	17,6	20,2	10,5	30,8	13,3	28,6
Казыр	18,2	25,5	12,1	51,7	52,9	11,1
Золотой початок	3,0	11,7	0	33,3	34,8	50,0
Сельма	41,7	21,4	7,1	15,8	40,0	10,5
Талисман	16,1	16,5	3,9	16,7	40,0	12,5
<i>Среднее по сортам</i>	<i>24,5</i>	<i>22,2</i>	<i>12,8*</i>	<i>33,7</i>	<i>32,7</i>	<i>24,3</i>
Стандартная ошибка	опыта=6.06 (на пролиферации)			опыта=23.2 (на регенерации)		
Различия средних	фактора "сорт" достоверны на уровне 1% и "условия" достоверны на уровне 1%			фактора "сорт" недостоверны и "условия" недостоверны		

Достоверных отличий между сортами по обоим фонам не установлено. Каллусы сортов Тубинский, Сельма и Талисман после пересадки с селективных сред на регенерацию даже несколько увеличивали формирование регенерантов по сравнению с каллусами с контрольной среды. Вероятно, в составе метаболитов *Fs* присутствовали не только фитопатогены, но и фитогормоны, которые могут стимулировать процесс закладки корней и побегов, что отмечено в составе культурального фильтрата патогенных грибов *C. sativus* и *F. oxysporum*, где выявлены фитогормоны как ингибиторного, так и стимулирующего характера (абсцизовая кислота и ИУК) [Шаяхметов, 2001].

Используемые метаболиты *Fs*, даже в концентрации 40% не полностью ингибировали регенерацию каллусов, поэтому давление стрессора на этот процесс усиливали до *Fs*-50%, и сорта Тюменский голозерный и Тубинский, отличающиеся высокими показателями регенерации, испытаны на фоне 1 (табл. 3).

Таблица 3.

Характеристика образования регенерантов на контрольной и селективной средах пролиферации (фон 1)

Сорт	контроль	<i>Fs</i> -50%
Тюменский голозерный	88,90	16,67
Тубинский	68,80	4,35
Среднее по опыту	78.85	10.51*
Стандартная ошибка опыта=3.89		
Различия средних фактора "сорт" недостоверны, фактора "условия" достоверны на уровне 5%		

Если в этих условиях образование регенерантов в контроле имело высокий уровень, то на селективной среде оно резко и достоверно снижалось. Вероятно, уровень *Fs*-50% является предельно допустимым для использования метаболитов исследованного изолята в отборе устойчивых форм в каллусной культуре овса.

Таким образом, метаболиты с микотоксинами *F. sporotrichioides* в используемой нами форме в концентрации *Fs*-40% и большей (*Fs*-50%) достоверно ингибируют пролиферацию и регенерацию каллусов, как на селективной среде пролиферации, так и на среде регенерации без метаболитов, сохраняя свое последствие с предыдущего этапа отбора на селективных средах пролиферации. Это свидетельствует о корректности использования выделенных и использованных нами метаболитов с токсинами *Fs* в качестве селективирующего агента. Их присутствие в высокой концентрации (*Fs*-50%) в среде пролиферации не полностью, но очень сильно, угнетает регенерацию, по крайней мере, у некоторых сортов овса, что, во-первых свидетельствует о достаточной устойчивости овса к *F. sporotrichioides*, а, во-вторых, об отсутствии необходимости применения более высокого уровня стресса в каллусной культуре овса. Различия голозерных и пленчатых сортов по исследованным параметрам не отмечено. Полученные в каллусной культуре растения регенеранты дорощены до семенного потомства и будут проверены на устойчивость к фузариозной инфекции в лабораторных и полевых условиях.

Литература

Бутенко Р.Г. Биотехнология растений: культура клеток. – М.: Агропромиздат, 1989. – 290 с.

Гагкаева Т.Ю., Дмитриев А.П., Павлюшин В.А. Микробиота зерна – показатель его качества и безопасности // Защита и карантин растений. – 2012. – № 9. – С. 14–18.

Кононенко Г.П., Буркин А.А. О контаминации фузариотоксинами зерна злаков, используемых на кормовые цели // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – № 4. – С. 81–88.

Макарова Р.В., Борисова Т.А. Кефели В.И. Содержание цитокининов и ИУК в регенерантах табака, носителях активных агробактериальных IPT-генов // Докл. РАН. 1995. – Т. 356, №2. – С. 280–283.

Монастырский О.А., Ярошенко В.А. Биопрепараты против развития токсигенных грибов на зерне // Защита и карантин растений. – 2000. – № 3. – С. 32–33.

Сорокин О.Д. Прикладная статистика на компьютере. – Краснообск: СО РАСХН, 2010. – 337 с.

Сурин Н.А., Громовых Т.И., Зобова Н.В. и др. Получение регенерантов ярового ячменя, устойчивых к токсинам возбудителей корневых гнилей в условиях Восточной Сибири // Микология и фитопатология. – 2002. – Т. 36, № 2. – С. 67–71.

Сурин Н.А., Сорокатая Е.И., Громовых Т.И., Зобова Н.В. Необходимость повышения устойчивости к корневым гнилям сортов ярового ячменя в Красноярском крае // Доклады РАСХН. – 2001. – № 3. – С. 16–18.

Тырышкин Л.Г. Генетическое разнообразие пшеницы и ячменя по эффективной устойчивости к болезням и возможности его расширения: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – СПб., 2007. – 40 с.

Тырышкин, Л.Г. Соматоклональная изменчивость пшеницы и ячменя по устойчивости к болезням // Идентифицированный генофонд растений и селекция. – СПб.: ВИР. – 2005. – С. 758–773.

Шаяхметов И.Ф. Биологическая активность метаболитов из культурального фильтрата *Cochliobolus sativus* и *Fusarium oxysporum* в связи с клеточной селекцией

злаковых на устойчивость к фитопатогенам // Микология и фитопатология. – 2001. – Т. 35, № 6. – С. 66–71.

Щеклеина Л.М., Щенникова Н.Н. Изменение микрофлоры семян ячменя при хранении // Защита и карантин растений. – 2013. – № 2. – С. 24–26.

Falk D.E., Reinbergs E. OAC Kippen spring barley // Can. J. Plant Sci. – 1991. – V. 71, No. 1. – P. 205-206.

Tyryshkin L.G., Tyryshkina N.A. Resistance to diseases in wheat collection samples and somaclonal variants // Czech. J. Genet. Plant Breed. – 2003. – No. 1. – P. 21–23.

INFLUENCE OF TOXIC METABOLITES FUSARIUM SPOROTRICHIOIDES ON THE PROCESSES OF REGENERATION OF AVENA SATIVA IN THE TISSUE CULTURE

S.Yu. Lugovtsova, N.A. Neshumayeva, N.V. Zobova

Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture «Federal Research Center «Krasnoyarsk Scientific Center of the SB RAS», Krasnoyarsk, Russia, zobovnat@mail.ru

Abstract. Toxic metabolites of *F. sporotrichioides* in a concentration of 40 and 50% in the oat callus proliferation media significantly inhibit their growth and regeneration both in the selective proliferation medium and in the regeneration medium without metabolites, retaining its aftereffect from the previous selection step in selective proliferation media. The use of a higher stress level than 50% of metabolites in the oat callus culture to select stable forms is not justified. On mediums with metabolites regenerants of oats are formed.

Keywords: *oats, callus culture, regeneration, phytotoxins. F. sporotrichioides*

СОВРЕМЕННЫЕ СВЕТОДИОДНЫЕ ИСТОЧНИКИ СВЕТА КАК ФАКТОР ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЙНОСТИ РАСТЕНИЙ

Ю.Ц. Мартиросян^{1,3}, В.В. Мартиросян¹, А.А. Кособрюхов^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия, yumart@yandex.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, Пущино, Россия, kosobr@rambler.ru

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия, yumart@yandex.ru

Аннотация. Проведена сравнительная оценка действия разных спектральных световых режимов при использовании светодиодных, индукционных облучателей и ламп ДНАТ на функциональные характеристики фотосинтетического аппарата растений картофеля. Низкие значения скорости фотосинтеза растений в светокультуре по сравнению с растениями в естественных условиях обусловлены активностью реакций световой стадии фотосинтеза, меньшим накоплением пигментов, а также активностью отдельных звеньев реакции карбоксилирования.

Ключевые слова: картофель, фотосинтез, светодиоды, индукционный облучатель

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1313-1315

Повышение эффективности выращивания растений в светокультуре во многом связано с внедрением технологий, включающих создание оптимального светового режима. В настоящее время широко используются светильники с натриевыми и ртутными лампами, которые имеют максимумы излучения в области 550-600 и 450 нм. [Буткин и др., 2011; Далькэ и др., 2013]. Использование новых источников света – светодиодных облучателей (СД) позволяет резко сократить энергозатраты на выращивание растений за счет их высокой светоотдачи, длительного рабочего ресурса и возможности регулирования спектра излучения [Johkan et al., 2010; Мартиросян и др., 2016]. Более широкое применение в светокультуре растений находят также индукционные лампы – энергосберегающие источники света, принцип работы которых основан на электромагнитной индукции и газовом разряде для генерации видимого света.

Целью данной работы являлось изучение активности фотосинтетического аппарата при облучении растений лампами различного типа: ДНАТ, светодиодными облучателями (СД), индукционными лампами, а также в условиях естественной солнечной радиации. Использовали лампы ДНАТ-600 и светодиодные облучатели с уровнями интенсивности света на высоте верхних листьев: 250-270, 260-270 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$, соответственно, а также индукционные лампы с уровнем интенсивности света 260-280 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$. Одновременно растения выращивали в условиях открытого грунта в период с июня по август при естественной радиации и уровне 1000-1300 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$.

Измерения скорости CO_2 газообмена проводили с помощью газового анализатора LCPro+ (ADC BioScientific Ltd., Англия). Световые и углекислотные кривые строили путем последовательного повышения уровней интенсивности света и концентрации углекислоты. Анализ углекислотной кривой CO_2 -газообмена проводили по модели [Farquhar et al., 1980].

Независимо от используемых источников облучения (ДНАТ, светодиоды или индукционная лампа) скорость фотосинтеза, рассчитываемая на единицу листовой поверхности растений, не различалась по вариантам опыта. Относительно низкие скорости фотосинтеза обусловлены, прежде всего, развитием на растениях большой листовой поверхности, что в результате приводило к относительно низким значениям активности фотосинтетического аппарата в расчете на единицу листовой поверхности. При высоких уровнях интенсивности солнечной радиации наблюдали высокие значения скорости фотосинтеза.

Для оценки потенциальных возможностей работы фотосинтетического аппарата, а также активности ряда световых и темновых процессов фотосинтеза были построены углекислотные кривые CO_2 газообмена листьев растений выращенных при различных условиях облучения и полученные результаты проанализированы с использованием математической модели [Farquhar et al., 1980].

Полученные данные позволяют сделать вывод, что лимитирующим звеном работы фотосинтетического аппарата растений выращиваемых под индукционной лампой может быть активность фермента Рубиско. Действительно, при выращивании под лампами ДНАТ и СД облучателями максимальная скорость карбоксилирования составляла 9-10 мкмоль $\text{CO}_2 \text{ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, а под индукционной лампой около 5 мкмоль $\text{CO}_2 \text{ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Следует отметить также низкие значения эффективности карбоксилирования у этих растений, что может свидетельствовать о высоком сопротивлении устьиц потоку CO_2 внутрь листьев растений.

Более низкие значения скорости фотосинтеза растений, выращиваемых при светодиодном облучении и индукционной лампой, по сравнению с показателями растений, выращиваемых в естественных условиях солнечной радиации, могут быть обусловлены активностью реакций световой стадии фотосинтеза – скорости электронного транспорта растений, а также меньшим накоплением пигментов этими растениями. Сумма хлорофиллов $a+b$ была меньше у этих вариантов.

Для оценки функционального состояния фотосинтетического аппарата растений при выращивании их в аэропонной установке под натриевой и индукционной лампами использовали метод индукции флуоресценции хлорофилла с применением импульсно-модулированного флуориметра (РАМ-флуориметра). На основании нескольких измеряемых флуоресцентных параметров (F_0 , F_m , F_p , F_0' , F_m' , F_t) рассчитывали максимальный фотохимический квантовый выход ФС II (F_v/F_m), эффективный фотохимический квантовый выход ФС II (Yield), показатели фото - (qP) и нефотохимического тушения флуоресценции ФС II (NPQ , qN), и другие характеристики ФСА листьев растений. Выращивание растений под индукционной лампой приводило к снижению эффективного квантового выхода ФС II (Yield), уменьшению фото - (qP) и нефотохимического тушения флуоресценции ФС II (NPQ).

Таким образом, проведенные исследования позволили оценить действие различных источников облучения на растения, выявить структурно-функциональные особенности в тех или иных световых условиях выращивания, а также их вклад в работу фотосинтетического аппарата. Впервые проведено исследование активности фотосинтетического аппарата растений, выращиваемых в различных световых условиях (по интенсивности и спектральному составу), активности отдельных звеньев реакции карбоксилирования.

Литература

Буткин А.В., Григорай Е.Е., Головки Т.К., Табаленкова Г.Н., Далькэ И.В. Культивирование салата в условиях защищенного грунта на Севере // Аграрная наука. – 2011. – № 8. – С. 24–26.

Далькэ И.В., Табаленкова Г.Н., Малышев Р.В., Буткин А.В., Григорай Е.Е. Продуктивность и компонентный состав биомассы листового салата при разной интенсивности освещения в условиях защищенного грунта. – Гавриш, 2013. – № 4. – С. 13–16.

Мартirosян Ю.Ц., Диловарова Т. А., Креславский В.Д. Кособрюхов А.А. Действие светодиодного облучения различного спектрального состава на фотосинтетический аппарат растений картофеля в культуре *in vitro* // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51, № 5. – С. 680–687.

Farquhar G.D., von Caemmerer S., Berry J.A. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C3 plants // *Planta*. –1980. – V. 149, No. 1. – P. 78–90.

Johkan M., Shoji K., Goto F., Hashida S., Yoshihara T. Blue light-emitting diode light irradiation of seedlings improves seedling quality and growth after transplanting in red leaf lettuce // *Hort. Sci.* – 2010. – No. 45. – P. 1809–1814.

NEW LED SOURCES OF LIGHT AS A FACTOR OF INCREASE IN CROP PRODUCTIVITY

Y.Ts. Martirosyan^{2,3}, V.V. Martirosyan², A.A. Kosobryukhov^{1,2}

¹Institute of Basic Biological Problems, RAS, Pushchino, Russia, kosobr@rambler.ru

²All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia, yumart@yandex.ru

³Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, yumart@yandex.ru

Abstract. A comparative evaluation of the effect of different spectral light regimes using LEDs, induction irradiators and DNAT lamps on the functional characteristics of the photosynthetic apparatus of potato plants was carried out. Low values of the rate of photosynthesis of plants in light culture as compared to plants under natural conditions are explained with the activity of light-stage photosynthetic reactions, a smaller accumulation of pigments, and the activity of the carboxylation reaction.

Keywords: *potato, photosynthetic apparatus, LEDs*

ЭНХАНСЕРЫ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ ТРАНСЛЯЦИИ В УСЛОВИЯХ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

А.С. Низкородова¹, Р.У. Мусабаев¹, Н.Ж. Каримов², Б.К. Искаков¹

¹Республиканское государственное предприятие «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина» комитета науки министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан, *anna_niz@mail.ru*

²Республиканское государственное предприятие «Институт биологии и биотехнологии растений» комитета науки министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан, *peksg@gmail.com*

Аннотация. Был исследован стимулятор трансляции TPS (Translation-initiation Promoting Site), присутствующий в 5'-нетранслируемых последовательностях прокариотических мРНК с высоким уровнем экспрессии. TPS комплиментарен сайту 5'-GGAUCA-3' на 3'-конце 16S рРНК. При сочетании TPS с Шайн-Далгарно (SD) было показано достоверное повышение уровня экспрессии по сравнению с одной только SD в клетках *E. coli* в стрессовых условиях: в 5,5 раз при понижении температуры (25 °С), и почти в 2 раза при повышении (44 °С).

Ключевые слова: Шайн-Далгарно, инициация трансляции, прокариотическая экспрессия, энхансер

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1316-1320

Инициация трансляции у прокариотических организмов происходит благодаря комплиментарному взаимодействию 5'-нетранслируемой последовательности (5'-НТП) мРНК (последовательности Шайн-Далгарно) и 3'-концевой последовательности 16S рРНК (анти-Шайн-Далгарно) [Shine, Dalgarno, 1975]. Тем не менее, подобный механизм инициации не является универсальным для прокариот – многие прокариотические мРНК лишены последовательности Шайн-Далгарно (SD), что не мешает их экспрессии [Ivanov et al., 1997; Wu, Janssen, 1997]. Более того, было показано, что для некоторых микробных геномов количество генов с SD меньше количества генов без SD [Chang et al., 2006] и каким образом иницируется трансляция таких «не-SD» генов прокариотических организмов пока неизвестно.

Анализ последовательностей прокариотических мРНК с высоким уровнем экспрессии выявил наличие в их 5'-НТП последовательности 5'-UGAUCC-3', располагавшейся в районе от -84 н. до -12 н. перед стартовым кодоном [Thanaraj, Pandit, 1989]. Эта последовательность комплиментарна сайту 5'-GGAUCA-3' на 3'-конце 16S рРНК, предшествующему последовательности анти-Шайн-Далгарно (рис. 1). Было высказано предположение, что данная последовательность, названная TPS (Translation-initiation Promoting Site) [Thanaraj, Pandit, 1989], является сайтом связывания рибосом, аналогичным последовательности Шайн-Далгарно. При анализе генов *S. cerevisiae* с высоким уровнем экспрессии также была обнаружена последовательность TPS, а при анализе 18S рРНК у 40 видов эукариотических организмов анти-TPS была обнаружена у всех видов без исключения и без вариаций последовательности [Thanaraj, Pandit, 1989].

Нами были получены конструкции на основе плазмиды рЕТ23с, кодирующие ген β-глюкуронидазы (GUS) под управлением T7-промотора и T7-терминатора транскрипции и отличающиеся своими 5'-НТП (табл. 1).

Полученными конструкциями трансформировали клетки *E. coli* экспрессионного штамма BL-21(DE3), проводили индукцию экспрессии 1 mM IPTG и инкубировали клетки при разных температурных режимах (25 °С, 37 °С, 44 °С) в течение часа. Температура культивирования 37 °С была взята за физиологический оптимум, 25 °С –

Таблица 2.

Относительный уровень экспрессии β -глюкуронидазы при разных температурах культивирования клеток

Конструкции	Температура культивирования 25 °С		Температура культивирования 37 °С		Температура культивирования 44 °С	
	Уровень экспрессии по отношению к emp	Уровень экспрессии по отношению к SD	Уровень экспрессии по отношению к emp	Уровень экспрессии по отношению к SD	Уровень экспрессии по отношению к emp	Уровень экспрессии по отношению к SD
emp	1,00	0,08*	1,00	0,03*	1,00	0,01*
SD	12,47*	1,00	38,42*	1,00	94,06*	1,00
TPS	1,28	0,10*	0,93	0,02*	1,38	0,01*
TPSfar	0,53*	0,04*	1,02	0,03*	1,20	0,01*
TPS-SD	1,57	0,13*	6,67*	0,17*	4,33*	0,05*
SD-TPS	1,24	0,10*	2,31	0,06*	2,24	0,02*
TPS SD	14,46*	1,16	39,69*	1,03	78,75*	0,84
TPSlongSD	68,31*	5,48*	51,61*	1,34	177,29*	1,88*

Примечания: * – отличие между выборками достоверно ($p \leq 0,05$). Уровень значимости, соответствующий фактическому t -критерию, рассчитывался в Microsoft Excel как двухвыборочный t -тест с неравными дисперсиями и двусторонним распределением; для каждой из конструкций количество повторов измерений составляло 10 и более.

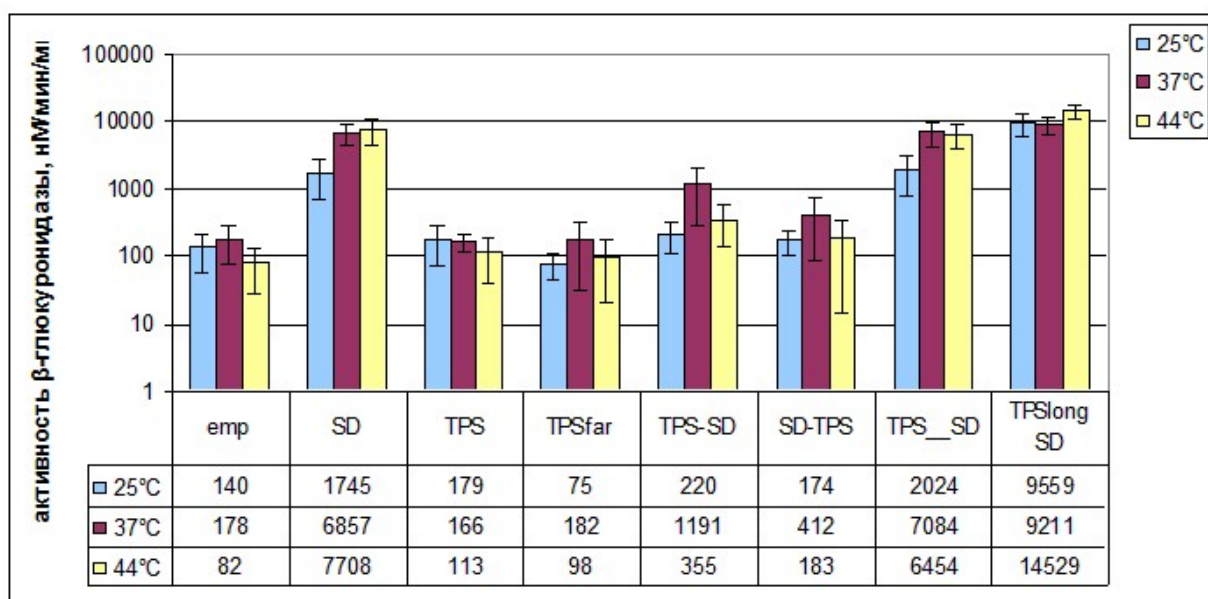


Рис. 2. Активность β -глюкуронидазы при различных температурах культивирования клеток *E. coli*.

Различные комбинации последовательностей TPS и SD относительно друг друга демонстрировали различные уровни энхансерной активности при разных температурах культивирования (рис. 2). Причем длина спейсерного участка между этими элементами имела определяющее значение. При отсутствии спейсерной последовательности (TPS-SD) уровень экспрессии GUS в сравнении с последовательностью SD был достоверно в ~6-20 раз ниже, то есть наличие сайта TPS вплотную к SD препятствовало стандартному связыванию SD с анти-Шайн-Далгарно на 16S рРНК. При наличии короткой спейсерной последовательности (TPS_SD) уровень экспрессии не отличался от контрольного при всех температурных режимах культивирования. При увеличении

длины спейсера до 30 н. (**TPSlongSD**) наблюдалось достоверное повышение уровня экспрессии по сравнению с **SD** в стрессовых условиях: в 5,5 раз при понижении температуры и почти в 2 раза при повышении. В то же время при оптимальной температуре культивирования разницы в уровне экспрессии отмечено не было.

Полученные данные позволяют сделать предположение об изменении конформации бактериальных рибосом в условиях температурных стрессов, что может приводить к связыванию мРНК с 16S рРНК в иных участках, чем при стандартной температуре культивирования. Причем конформационные изменения могут быть различны в зависимости от вида стресса (повышение или понижение температуры). Таким образом, сайт TPS, расположенный на оптимальном расстоянии от стартового кодона, позволяет увеличивать уровень инициации трансляции в условиях температурного стресса, то есть является не усилителем трансляции в полном смысле, а именно стимулятором трансляции (Translation-initiation Promoting Site), как было предложено Thanaraj T.A. [Thanaraj, Pandit, 1989].

Литература

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – V. 72. – P. 248–254.

Cervera M. Histochemical and fluorometric assays for *uidA* (GUS) gene detection // *Methods in Molecular Biology*. – 2002. – V. 286. – P. 203–212.

Chang B., Halgamuge S., Tang S-L. Analysis of SD sequences in completed microbial genomes: non-SD-led genes are as common as SD-led genes // *Gene*. – 2006. – V. 373. – P. 90–99.

Ivanov L., Aleksandrova R., Dragulev B., Abou-Haidar M. A second putative mRNA binding site on the *E. coli* ribosome // *Gene*. – 1995. – V. 160. – P. 75–79.

Ron E.Z., Davis B.D. Growth rate of *Escherichia coli* at elevated temperatures: limitation by methionine // *J. Bacteriol.* – 1971. – V. 107. – P. 391–396.

Shine J., Dalgarno L. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. // *Nature*. – 1975. – V. 254. – P. 34–38.

Thanaraj T.A., Pandit M.W. An additional ribosome-binding site on mRNA of highly expressed genes and a bifunctional site on the colicin fragment of 16S rRNA from *Escherichia coli*: important determinants of the efficiency of translation-initiation // *NAR*. – 1989. – V. 17. – P. 2973–2985.

Thanaraj T.A., Pandit M.W. Translation-initiation promoting site on transcripts of highly expressed genes from *Saccharomyces cerevisiae* and the role of hairpin stems to position the site near the initiation codon // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 1990. – V. 7. – P. 1279–1289.

Wu C., Janssen G. Expression of streptomycete leaderless mRNA encoding chloramphenicol acetyltransferase in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 1997. – V. 179. – P. 6824–6830.

ENHANCERS OF PROKARYOTIC TRANSLATION UNDER THE TEMPERATURE STRESS

A.S. Nizkorodova¹, R.U. Musabaev¹, N.Zh. Karimov², B.K. Iskakov¹

¹State Research Institute of Molecular Biology and Biochemistry named after M.A. Aytkozhin, Almaty, Kazakhstan, *anna_niz@mail.ru*

²State Research Institute of Plants' Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan, *peksg@gmail.com*

Abstract. The novel translation stimulator TPS (Translation-initiation Promoting Site), presented in the 5'-untranslated sequences of prokaryotic mRNAs with a high expression level, was studied. TPS is complimentary to the 5'-GGAUCA-3' site at the 3'-end of 16S rRNA. When TPS was combined with Shine-Dalgarno (SD), a significant increase in expression level was shown in comparison with SD alone in *E. coli* cells under stress conditions – 5.5 times greater at 25 °C, and almost 2-fold greater at 44 °C.

Keywords: *Shine-Dalgarno, translation initiation, prokaryotic expression, enhancer*

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ЭФФЕКТА НАНОКОМПОЗИТОВ СЕРЕБРА НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ И ИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ КАРТОФЕЛЯ

О.А. Ножкина¹, А.И. Перфильева¹, И.А. Граскова¹, А.В. Сидоров¹, Б.Г. Сухов²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский институт химии им. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, smallolga@mail.ru

Аннотация. В работе были проведены исследования, направленные на изучение наночастиц серебра, которые были упакованы в различные гуминовые вещества, природного происхождения для переработки растений против фитопатогенов. Экспериментально были показаны антибактериальные свойства некоторых наноконпозитов и их предшественников. Вещества препятствуют росту бактерий и их способности к образованию биопленки, в то же время, не нанося вреда растениям.

Ключевые слова: наноконпозиты серебра, антибактериальные свойства, гуминовые вещества

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1321-1326

Известно, что серебро обладает бактерицидным эффектом [Граскова и др., 2018]. Одним из перспективных направлений не только в медицине, но и теперь в растениеводстве, стало изучение наночастиц серебра упакованных в различные матрицы, которые удобны в использовании и безопасны для растений, а также с помощью них осуществляется адресная доставка веществ в бактериальную клетку фитопатогена [Омельченко и др., 2014]. Это свойство серебра стало интересно для изучения его как средства защиты культурных растений от патогенов. Одним из ярких примеров такого патогена является кольцевая гниль картофеля, вызываемая бактерией *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* (*Cms*). Как правило, эти бактерии представляют собой прямые или слегка изогнутые палочки размером 0.4–0.75 × 0.8 – 2.5 мкм, неправильной формы и часто клино- или булавовидной формы, преимущественно одиночные, но часто в парах V-образной конфигурации и иногда расположенные полисадно [Van der Wolf et al., 2005]. Это облигатные аэробы, которые растут медленно, нуждаются в богатых питательных средах и некоторых факторах роста. Они являются хемоорганотрофами, с метаболизмом дыхательного типа и образованием небольшого количества кислоты из маннитола, сорбитола, глюкозы, у некоторых штаммов – из маннозы; каталазоположительные, оксидазоотрицательные, индол не образуют, нитрат не восстанавливают [Граскова и др., 2018].

Для распространения этого возбудителя благоприятными являются климатические условия Северо-Восточной и Центральной Европы, а также Канады. Ежегодный ущерб от кольцевой гнили в Европе достигает более 15 млн евро [Eichenlaub et al., 2011]. Несмотря на то, что *Cms* не является карантинным организмом в России, ареал распространения возбудителя в стране расширяется. По оценкам Европейской и Средиземноморской организации защиты растений (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) потери урожая картофеля в России от заболевания кольцевой гнилью могут достигать 47 % [Van der Wolf et al., 2005]. Фактором, затрудняющим борьбу с заболеванием, является отсутствие эффективных экологически безопасных средств защиты. Поэтому целью нашего исследования стало

изучение нанокompозитов содержащих серебро на основе гуминовых веществ различной природы, как одних из перспективных направлений в растениеводстве и как одних из перспективных средств борьбы с данным растительным патогеном.

В работе было исследовано влияние нанокompозитов серебра на основе гуминовых веществ и их предшественников на растительный патоген картофеля, возбудитель кольцевой гнили *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* штамма Ас – 1405, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов, ИБФМ РАН. Использовались нанокompозиты и их предшественники трех видов: НКГв – грязи/AgNO₃, НКГв – угли/AgNO₃, НКГв – сланцы/AgNO₃, Гв – грязи, Гв – угли, Гв – сланцы, полученные с месторождений на территории Монголии. Нанокompозиты были синтезированы в Иркутском институте химии им А. Е. Фаворского и хорошо растворимы в воде и удобны в использовании их водные растворы. Изучение бактерицидного эффекта нанокompозитов осуществляли путем измерения оптической плотности бактериальной суспензии, которую выращивали на жидкой питательной среде для бактерий. Измеряли оптическую плотность бактериальной суспензии в динамике с следующих точек: 0, 2, 4, 18, 24, 48, 66, 72, 92 часов при длине волны 595 нМ (рис. 1).

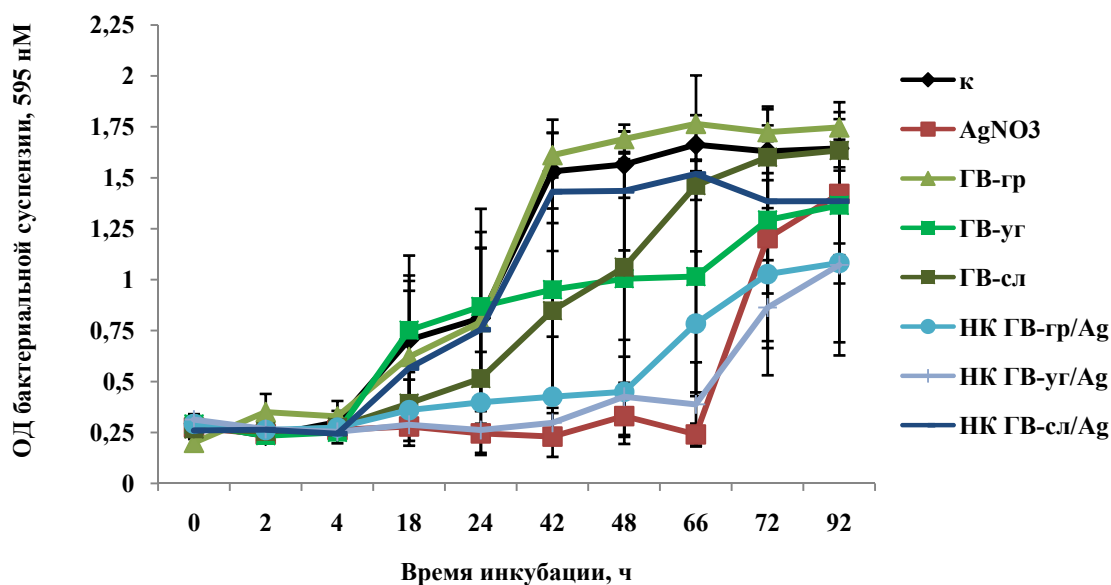


Рис. 1. Влияние нанокompозитов серебра на основе гуминовых веществ и их предшественников на оптическую плотность (К – контроль; AgNO₃ – нитрат серебра; Гв–гр – гуминовые вещества на основе грязей; Гв–уг – гуминовые вещества на основе углей; Гв–сл – гуминовые вещества на основе сланцев; НКГв–гр/AgNO₃ – нанокompозит серебра с гуминовыми веществами на основе грязей; НКГв–уг/AgNO₃ – нанокompозит серебра с гуминовыми веществами на основе углей; НКГв–сл/AgNO₃ – нанокompозит серебра с гуминовыми веществами на основе сланцев).

Данные по исследованиям оптической плотности показывают, что нитрат серебра ингибирует рост бактерий, так же, как и нанокompозиты серебра с гуминовыми веществами на основе углей и грязей, тем самым проявляют повышенный бактерицидный эффект. Все остальные вещества стимулируют рост. А также проводились исследования их биопленкообразования, которое проводилось по следующей схеме: бактериальной суспензии с НК и его предшественниками, заранее профильтрованные с помощью фильтра 0,22 мкм, раскапывали в условиях бокса на стерильный 96-луночный планшет по 200 мкл против чистой среды. Стерильный планшет

убирали в темноту на 2 сут. Через 48 часов из лунок планшета удаляли суспензию и окрашивали пленки, образовавшиеся на дне. Для этого в каждую лунку аккуратно (не взбалтывая) вносили 150 мкл дистиллированной воды и 20 мкл 1% кристаллвиолета и инкубировали в течении 45 минут при комнатной температуре. После тщательного промывая дистиллированной водой (аккуратно не попадая в лунки) для экстракции краски из пленки добавляли 200 мкл 96% этанола и измеряли оптическую плотность этого раствора при длине волны 595 нм. Интенсивность окраски содержимого лунок свидетельствовала о степени пленкообразования (рис. 2).

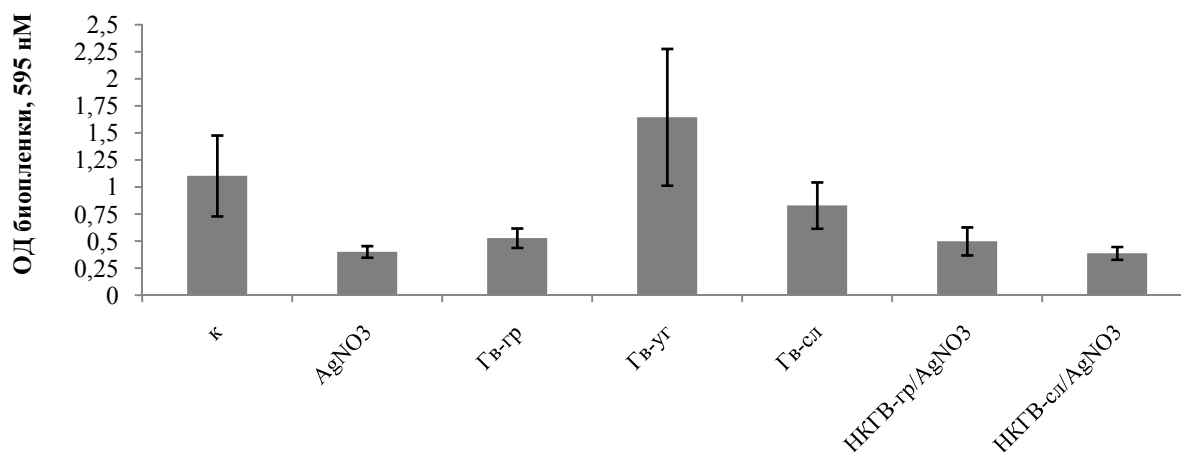


Рис. 2. Образование биопленок под действием нанокмозитов и его предшественников (обозначения как на рис. 1).

Данные по образованию биопленок показывают, что Гв – угли и НКГв – уг/AgNO₃ стимулируют рост биопленкообразования, противно как AgNO₃, Гв –грязи, НКГв – гр/AgNO₃, НКГв – сл/AgNO₃ ингибируют рост биопленок, что лишний раз доказывает их высокий бактерицидный эффект. Полученный результат о влиянии нанокмозитов на биопленкообразование *Stm* является чрезвычайно важным, так как известно, что исследуемая бактерия способна образовывать биопленки внутри стебля приводя к закупорке сосудов растений, что вызывает вилт и пожелтение листьев у них.

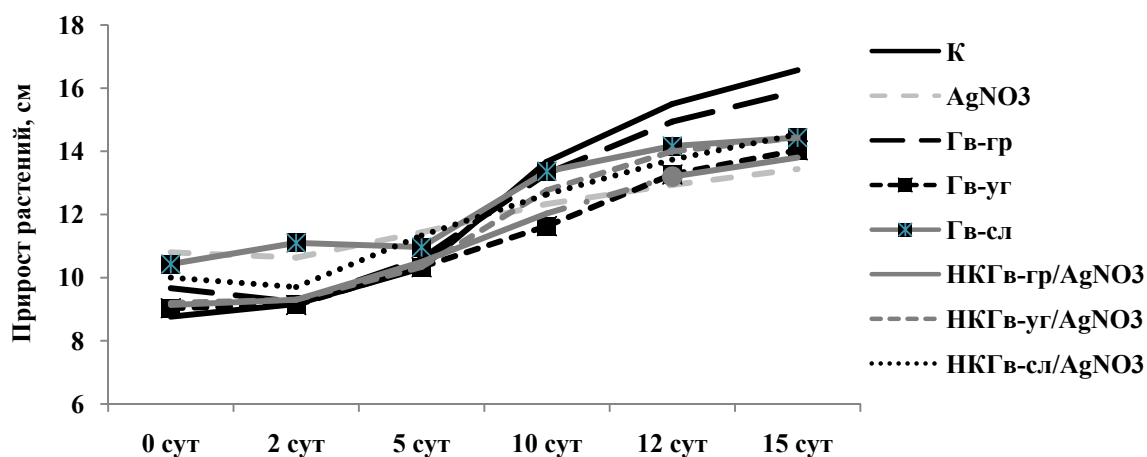


Рис. 3. Влияние нанокмозитов серебра в различных матрицах, а также их предшественников на прирост картофеля *in vitro* по сравнению с контролем (обозначения как на рис. 1).

Растения для эксперимента выращивали в факторостатных условиях (при температуре 23-25 °С днем и 18- 20 °С – ночью, влажность – 75-85 %, освещенность – 5000-7000 лк при 16-часовом световом дне) в течение 14 суток. Далее их пересаживали на жидкую среду (питательная среда для растений Мурасиге-Скуга) без агара. На растениях проводились исследования по влиянию НК и его предшественников на прирост и количество листьев, добавляя в них по 1 мл растворенных веществ. Через каждые 2 дня производили замеры прироста (рис. 3) и количества листьев (рис. 4), визуально анализировали пигментацию листьев, а также исследовали активность пероксидазы, как показатель устойчивости к патогену. Активность пероксидазы мерили при помощи спектрофотометра с добавлением перекиси водорода (рис. 5).

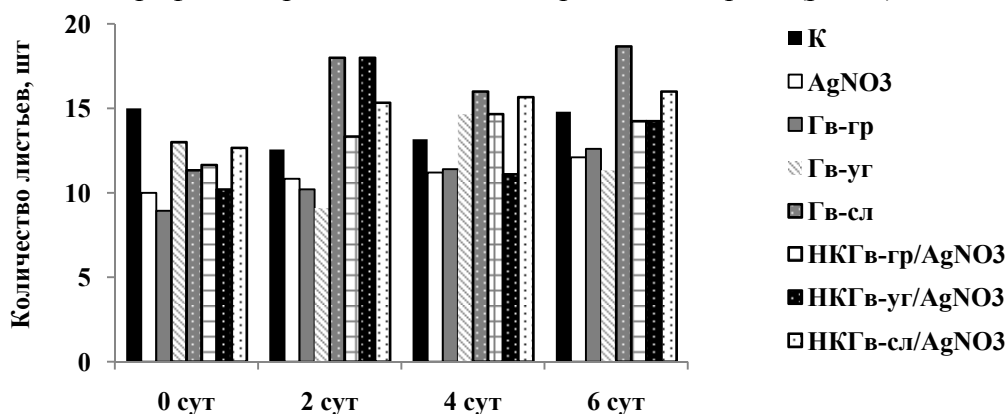


Рис. 4. Влияние нанокompозитов серебра в различных матрицах, а также их предшественников на количество листьев картофеля *in vitro* по сравнению с контролем (обозначения как на рис. 1).

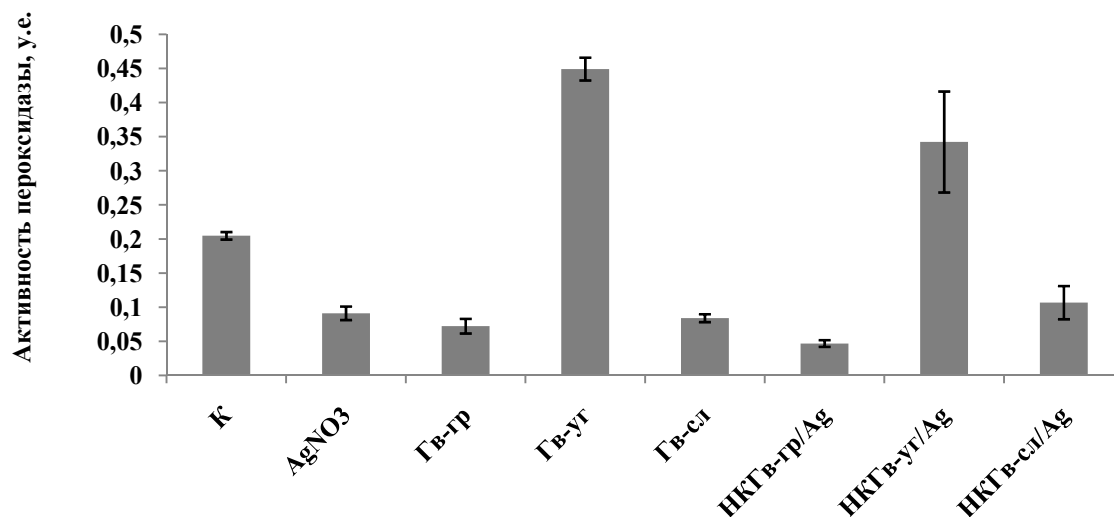


Рис. 5. Влияние нанокompозитов серебра в различных матрицах, а также их предшественников на активность пероксидазы в тканях картофеля *in vitro* по сравнению с контролем (обозначения как на рис. 1).

Результаты показали, что AgNO₃ негативно влиял на оба исследуемых показателя. Гв - гр значительно подавляют активность пероксидазы, не влияет на прирост растений, при этом снижая количество листьев на них. Гв - уг в 2 раза по сравнению с контролем стимулируют активность пероксидазы, при этом снижают прирост растений и количество листьев. Это свидетельствует о негативном влиянии углей на картофель, наличии стрессового состояния. Гв - сл ингибирует активность фермента, на прирост

растений в начале периода наблюдения не оказывало влияние, за тем снижало, при этом стимулирование образование листьев у картофеля. Наноккомпозит на основе пеллоидов НКГв - гр/AgNO₃ характеризовался низкой активностью пероксидазы по сравнению с контролем, небольшим снижением прироста растений, количество листьев было на уровне контроля. Обработка картофеля НКГв - уг/AgNO₃ приводила к повышению активности фермента в 2 раза, прирост растений снижался по сравнению с контролем, количество листьев было как у необработанных растений. Наноккомпозит на основе сланцев НКГв - сл/AgNO₃ незначительно понижал активность пероксидазы картофеля, пророст растений несколько снижался, однако стимулировалось образование листьев по сравнению с контрольными растениями.

Обобщая полученные данные, можно предположить, что действие наноккомпозитов на основе гуминовых веществ различной природы и их предшественники является антибактериальным. Имеющиеся графики подтверждают, что НКГв – сл/AgNO₃ и НКГв – уг/AgNO₃ проявляют повышенную антибактериальную активность по отношению к возбудителю кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum*, так же как и нитрат серебра. Ингибируют у бактерий пленкообразование и их рост. НКГв – уг/AgNO₃ и его предшественник Гв – уг проявили повышенный бактериальный эффект и стимулировали рост растений, поэтому на основе данных исследований можно предположит, что наноккомпозиты на основе углей самые эффективные, экологически безопасные вещества для борьбы с фитопатогеном картофеля. Поэтому можно утверждать, что использование наноккомпозитов на основе гуминовых веществ является эффективным средством для обработки растений против бактериальных заболеваний.

Работа поддержана грантом РФФИ и Правительством Иркутской области (проект № 17-416-380001).

Литература

Граскова И.А., Перфильева А.И., Арсентьев К.Ю., Клименков И.В., Мотылева С.М., Войников В. К. Характеристика штамма АС-1405 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, вызывающего кольцевую гниль картофеля // Агрохимия. – 2018. – № 3 – С. 73.

Омельченко А.В., Юркова И. Н., Жижина М.Н. Стимулирующее действие наночастиц серебра на рост и развитие растений пшеницы // Ученые записи Таврического национального университета им. В. И. Вернадского – серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27, № 1. – С. 127–135.

Eichenlaub R., Gartemann K.H. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens // Annu. Rev. Phytopathol. – 2011. – V. 49. – P. 445–64.

Van der Wolf J. M., Elphinstone J. G., Stead D. E., Metzler M., Muller P., Hukkanen A., Karjalainen R. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot // Plant Research International B.V. Wageningen, February 2005. – Report 95.

**STUDYING ANTIBACTERIAL EFFECT OF SILVER NANOCOMPOSITES
ON THE BASIS OF HUMIN SUBSTANCES AND PRECURSORS SUBSTANCES IS
THEIR AGAINST THE EXCITANT RING ROT OF THE POTETO**

O.A. Nozhkina¹, A. I. Perfilyeva¹, I. A. Graskova¹, A. V. Sidorov¹, B. G. Sukhov²

¹Siberian institute of physiology and biochemistry of plant of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Irkutsk, Russia

²Irkutsk institute of chemistry of Favorskii of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Irkutsk, Russia, *smallolga@mail.ru*

Abstract. In work the researches directed to studying of nanoparticles of silver which were packed in various matrixes of humic substances natural origin for processing of plants against phytopathogens were conducted. Experimentally were shown antibacterial properties of some nanocomposites, and their predecessors. Substances inhibit growth of bacteria and their ability to biofilm formation, at the same time without doing harm to plants.

Keywords: *nanocomposites, nanoparticles of silver, antibacterial properties, humic substances*

ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА И ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА НА ФОТОСИНТЕЗ РАСТЕНИЙ

В.Н. Нурминский¹, Ю.Б. Захаров²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Россия, cell@sifibr.irk.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систем энергетики им. Л.А. Мелентьева Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, contain@mail.ru

Аннотация. В настоящей работе исследовали влияние спектрального состава и интенсивности света на интенсивность ассимиляции CO₂ при фотосинтезе растений томата (*Solanum lycopersicum*). Изучение газообмена проводили с помощью портативного газоанализатора GFS-3000 (Walz, Германия). Получены графики зависимости уровня фотосинтеза от мощности излучения света при различных длинах волн: 395, 425, 445, 455, 525, 590, 605, 625, 655 нм.

Ключевые слова: томат, светодиодные облучатели, фотосинтез

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1327-1329

Свет в жизни растений играет определяющую роль. Световая энергия, прежде всего, определяет основополагающий процесс в растениях – фотосинтез. Жизнедеятельность растений находится в тесной зависимости от интенсивности и спектрального состава света. Показано, что свет разного спектрального состава регулирует рост и развитие, фотосинтетические процессы и продуктивность растений [Belous et al., 2012; Дорофеев и др., 2011; Карначук, Гвоздева, 1998; Карначук, Головацкая, 1998; Карначук и др., 2011].

Зависимость фотосинтеза от энергии света является вполне очевидной и существенной. Уже достаточно давно установлено отсутствие линейной зависимости между активностью процесса фотосинтеза и освещенностью. Световая кривая фотосинтеза (зависимость активности фотосинтеза от интенсивности света) имеет форму логарифмической кривой. Прямая зависимость скорости процесса от притока энергии имеет место только при низкой интенсивности света. В области насыщающих интенсивностей света дальнейшее увеличение освещенности не увеличивает скорость фотосинтеза.

Как известно, из всего спектра для жизни растений важна фотосинтетически активная, находящаяся в пределах от 380 до 710 нм, и физиологически активная радиация (300-800 нм), но наиболее значимы красные лучи, спектр которых находится в пределах от 600 до 720 нм [Belous et al., 2012; Дорофеев и др., 2011; Карначук, Гвоздева, 1998]. Эти световые волны необходимы для образования хлорофилла. Свет этой части спектра является основным поставщиком энергии для фотосинтеза и влияет на процессы, связанные с изменением скорости развития растения. Вместе с тем избыток красной части спектра задерживает процессы образования генеративных органов. Синие и фиолетовые (380-490 нм) лучи, как и красная составляющая, принимают непосредственное участие в фотосинтезе, стимулируют образование белков и регулируют скорость развития растения [Belous et al., 2012].

Помимо интенсивности существенное значение для фотосинтеза имеет спектральный состав света. Спектр действия фотосинтеза (кривая его зависимости от длины волны падающего света) при выровненном числе квантов имеет два четко выраженных максимума: в красной и синей части спектра, аналогичных максимумам

поглощения хлорофилла. Красные и синие лучи наиболее эффективны в фотосинтезе. Анализ кривой квантового выхода фотосинтеза в зависимости от длины волны показывает, что он имеет близкие значения в диапазоне длин волн 580–680 нм (около 0,11). В сине-фиолетовой части спектра (400–490 нм), поглощаемой наряду с хлорофиллами также и каротиноидами, квантовый выход снижается (до 0,06), что связывают с менее продуктивным использованием энергии, поглощаемой каротиноидами. В дальней красной области спектра (более 680 нм) наблюдается резкое снижение квантового выхода.

Качество света оказывает сложное и разностороннее влияние на фотосинтез. Спектральный состав света определяет состав продуктов, синтезируемых при фотосинтезе: на синем свете преимущественно синтезируются органические кислоты и аминокислоты, а позднее – белки, тогда как красный свет индуцирует синтез растворимых углеводов, а со временем – крахмала. Отмечено регулирующее действие синего света на активность ферментов фотосинтетического превращения углерода.

Известно, что различные спектры света могут вызывать у растений и различные процессы морфогенеза. По литературным данным, синий свет характеризуется как основной компонент морфогенеза [Катаева, Аветисов, 1981]. При синем свете формируются листья с большим содержанием хлорофилла. Показано, что синий свет усиливает закладку вегетативных почек у побегов табака в условиях *in vitro*, а красный стимулирует развитие цветочных почек [Константинова и др., 1987].

Для светокультуры растений необходимо знание теоретических основ и методов выращивания растений с помощью искусственного облучения. Источниками излучения в светокультуре растений служат электрические лампы различных типов. Необходимо, чтобы в их спектре были все участки видимого излучения с преобладанием красных, зеленых, синих и фиолетовых лучей, а также небольшая доля длинного ультрафиолетового и короткого инфракрасного света.

В настоящее время для освещения рассадных компонентов теплиц и светокультуры растений все более широко используются светильники с высокоэффективными газоразрядными лампами высокого давления (металлогалогеновыми (МГЛ) и натриевыми (ДНаТ)) мощностью 400–200 Вт. Оптимальное соотношение спектральных участков ФАР в общем светопотоке, наряду с другими факторами, может определять максимальную фотосинтетическую продуктивность растений. Повышение эффективности выращивания растений в светокультуре во многом связано с внедрением прогрессивных технологий, в том числе предусматривающих оптимизацию светового режима. Применение современных источников света, светодиодных облучателей, позволяет резко сократить энергозатраты на выращивание растений за счет высокой светоотдачи, длительного рабочего ресурса и возможности регулировать спектр облучения.

В настоящей работе исследовали влияние спектрального состава и интенсивности света на интенсивность ассимиляции CO_2 ($\text{мкмоль}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) при фотосинтезе растений томата (*Solanum lycopersicum*). Изучение газообмена проводили с помощью портативного газоанализатора GFS–3000 (Walz, Германия). Принцип газометрического определения скорости фотосинтеза с этой системе заключается в регистрации изменения концентрации CO_2 в потоке газа, проходящего через камеру, герметически отделенную от атмосферы, в которую помещен лист растения. Достоинствами метода являются его относительная простота, высокая чувствительность, а также возможность измерения фотосинтетической активности на листе, не отделенном от растения. В результате проведенных исследований получены графики зависимости уровня фотосинтеза от мощности излучения света при различных длинах волн: 395, 425, 445, 455, 525, 590, 605, 625, 655 нм.

Литература

Дорофеев В.Ю., Медведева Ю.В., Карначук Р.А. Оптимизация светового режима при культивировании оздоровленных растений картофеля *in vitro* с целью повышения продукционного процесса // Материалы VI Московского международного конгресса, часть 1 (Москва, 21-25 марта, 2011 г.). – М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2011. – С. 238–239.

Карначук Р.А., Гвоздева Е.С. Влияние света на баланс фитогормонов и морфогенез в культуре ткани зародышей пшеницы // Физиология растений. – 1998. – Т. 45, № 2. – С. 289–295.

Карначук Р.А., Головацкая И.Ф. Гормональный статус, рост и фотосинтез растений, выращенных на свету разного спектрального состава // Физиология растений. – 1998. – Т. 45, № 6. – С. 925–934.

Карначук Р.А., Дорофеев В.Ю., Медведева Ю.В. Фоторегуляция роста и продуктивности растений картофеля при размножении *in vitro* // VII Съезд общества физиологов растений России, Международная конференция «Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» 4-10 июля 2011. – Нижний Новгород, 2011. – С. 313–314.

Катаева Н.В., Аветисов В.А. Клональное размножение в культуре ткани. // Культура клеток растений. – М.: Наука, 1981. – С.137–149.

Константинова Т.Н., Аксенова Н.П., Сергеева Л.И., Чайлахян М.Х. Взаимное влияние света и гормонов на регуляцию морфогенетических процессов в культуре *in vitro* // Физиология растений. – 1987. – Т. 34, № 4. – С. 795–802.

Belous O.G., Maljarovskaja V.I., Kolomijez T.M. Effect of spectral composition of light on growth of *Chryzantemum morifolium in vitro* // Nauka i Studia: Przemysł. – 2012. – No. 10. – P. 30–35.

THE EFFECT OF THE SPECTRAL COMPOSITION AND INTENSITY OF LIGHT ON PLANT PHOTOSYNTHESIS

V.N. Nurminsky¹, Yu.B. Zakharov²

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, cell@sifibr.irk.ru

²Melentiev Energy Systems Institute of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, contain@mail.ru

Abstract. In this work, we investigated the effect of the spectral composition and intensity of light on the intensity of CO₂ assimilation during the photosynthesis of tomato plants (*Solanum lycopersicum*). Gas exchange studies were carried out using a portable gas analyzer GFS-3000 (Walz, Germany). The graphs of the dependence of the level of photosynthesis on the power of light emission of different wavelengths (395, 425, 445, 455, 525, 590, 605, 625, 655 nm) were obtained.

Keywords: tomato, LED irradiators, photosynthesis

ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ *POPULUS × BEROLINENSIS*

В.В. Павличенко, М.В. Протопопова, В.К. Войников

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, vpavlichenko@gmail.com, marina.v.protopopova@gmail.com, vvk@sifibr.irk.ru

Аннотация. В работе представлены некоторые особенности микроклонального размножения тополя берлинского (*Populus ×berolinensis*). Приведен способ введения в стерильную культуру, описан состав питательной среды для культивирования в условиях *in vitro*, а также определены типы эксплантов и составы питательных сред для эффективного микроклонального размножения тополя берлинского.

Ключевые слова: микроклональное размножение растений, тополь берлинский, регуляторы роста, питательные среды, органогенез

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1330-1333

Микроклональное размножение является одним из подходов по изучению особенностей ответа растительного организма на факторы окружающей среды, а также позволяет быстро и эффективно увеличивать количество экспериментально материала [Jain, Haggman, 2007]. Размноженные в условиях *in vitro* растения позволяют более быстро и эффективно проводить эксперименты по оценке влияния негативных стрессовых воздействий по сравнению с натурными экспериментами, требующими как больших площадей, так и времени, затрачиваемого на выращивание растений в грунте. Кроме того, микроклональное размножение растений позволяет проводить эксперименты круглогодично, что особенно важно в климатических условиях Восточной Сибири, где вегетационный период длится от 30 дней на севере до 140 дней на юге.

Каждый вид растений имеет свои особенности микроклонального размножения. Для эффективного микроклонального размножения важен подбор оптимального состава питательных сред, концентраций фитогормонов и типа растительного экспланта, используемого для получения регенерантов. Известно, что образование регенерантов из различных типов эксплантов проходит с разной эффективностью. Подбор же оптимальных концентраций фитогормонов позволяет повышать эффективность микроклонального размножения, а также получать максимальное количество регенерантов из всех типов эксплантов.

Целью исследования было выявление особенностей микроклонального размножения тополя берлинского (*Populus ×berolinensis* Dippel).

В качестве объекта исследования был выбран тополь берлинский (*Populus ×berolinensis*). Представителей рода *Populus* часто используют в качестве модельных объектов для изучения процессов роста и развития древесных растений в виду их высокой способностью к регенерации.

В качестве субстрата для регенерации и культивирования растений тополя *in vitro* агаризованную (7 г/л) питательную среду на основе 1/2 MS 5524 [Murashige, Skoog, 1962] производства Sigma-Aldrich с добавлением хелата железа и микроэлементов до полной нормы от среды MS, тиамин (1 мг/л), пиридоксин (0,5 мг/л), никотиновой кислоты (0,5 мг/л), аденин сульфата (40 мг/л) и мезоинозита (50 мг/л), сахарозы (2%) и агара (7 г/л). Кислотность среды доводили до значения pH 5,7. В качестве регуляторов роста использовали кинетин (КИН), бензиладенин (БА), тидиазурон (ТДЗ) и индолилмасляную кислоту (ИМК) в различных концентрациях.

Для введения в стерильную культуру использовали молодые отрезки стеблей с пазушной почкой, срезанные с растений тополя берлинского на территории СИФИБР СО РАН. Свежесрезанные участки стебля стерилизовали в 2 этапа. Сначала погружали на 20 секунд в 70% спирт, а затем переносили в 10% раствор белизны с добавлением Tween-20, в котором промывали в течение 1 минуты. После завершения стерилизации экспланты несколько раз отмывали в стерильной воде и перемещали на твердую питательную среду, содержащую помимо основных элементов, перечисленных выше, 0,5 мг/л КИН. Побеги, проросшие из пазушных почек в течение первых 10 дней экспозиции, срезали и переносили на питательную среду для укоренения, содержащую ИМК в финальной концентрации 0,15 мг/л. Появление первых корней отмечали уже через 5 суток экспонирования. Для сохранения растений в стерильной культуре применяли метод последовательной пересадки срезанных верхних частей растения (3-4 листа) на питательную среду для укоренения через каждые 25-30 дней.

Для изучения особенностей прямого органогенеза, а также поиска оптимального состава питательной среды для эффективного микроклонально размножения проводили серию экспериментов. Готовили ряд отличающихся по составу ауксинов и цитокининов питательных сред (таблица). На поверхность твердой питательной среды помещали по 5 отрезков каждого типа эксплантов, взятых от одного растения: черешки листьев, отрезки стеблей без пазушных почек, кусочки листьев с раневой паренхимой и отрезки корней. Сосуды с эксплантами экспонировали в световой комнате, в условиях фотопериода 16/8 ч (день/ночь) при 24 °С в течение 20 суток. Через 20 суток все регенеранты, образовавшиеся на эксплантах, переносили на питательную среду для удлинения стеблей, содержащую кроме базовых компонентов КИН в концентрации 0,1 мг/л. Полученные через 20 дней регенеранты срезали и укореняли на питательной среде, содержащей 0,15 мг/л ИМК.

Результаты исследования показали, что наибольшее количество регенерантов из одного растения тополя берлинского можно получить на среде с добавлением БА и ИМК (0,1 мг/л) (таблица). Наибольшую эффективность при этом показали отрезки стеблей и корней. Питательная среда с добавлением КИН и ИМК оказалась наименее эффективна для микроклонального размножения тополя берлинского среди изученных комбинаций цитокининов и ауксина. На среде с добавлением ТДЗ и ИМК помимо регенерантов также отмечали образование органогенного каллуса из всех четырех типов эксплантов.

В нашей предыдущей работе [Павличенко и др., 2016] была произведена сравнительная оценка эффективности образования регенератов на питательных средах с добавлением только цитокининов в различных концентрациях. В качестве цитокининов использовали КИН, БА и ТДЗ производства Sigma-Aldrich с финальными концентрациями 0,1 мг/л, 0,25 мг/л, 0,5 мг/л и 1 мг/л. Использованные виды цитокининов приводили к образованию регенерантов у тополя берлинского с различной эффективностью. Так, при использовании БА в питательной среде получали регенеранты из всех типов эксплантов. Наибольшее количество регенерантов образовывалось при добавлении КИН. Добавление ТДЗ оказалось малоэффективным и может использоваться для микроклонального размножения тополя берлинского только из черешков листьев. Следует отметить, что на питательной среде, содержащей только КИН [Павличенко и др., 2016] удалось получить в 2 раза больше регенерантов из отрезков стеблей, чем при использовании той же среды с добавлением ИМК. Данный факт может быть объяснен тем, что соотношение внутриклеточной ИМК и экзогенного КИН является достаточным для эффективного органогенеза.

Питательная среда с БА (0,5 мг/л) в сочетании с ИМК (0,1 мг/л) позволила получить большее количество регенерантов, по сравнению со средой, содержащей

только БА [Павличенко и др., 2016]. Питательные среда с добавлением ТДЗ как в сочетании с ИМК, так и без добавления ауксинов [Павличенко и др., 2016] могут использоваться для получения органогенного каллуса, но не для эффективного микроклонального размножения тополя берлинского.

Таблица.

Количество регенерантов, полученных из разных типов эксплантов

Цитокинин, 0,5 мг/л	ИМК, мг/л	Тип растительного экспланта			
		Лист	Черешки листьев	Отрезки стеблей	Отрезки корней
КИН	0,5	-	-	-	7
	0,25	-	-	10	8
	0,1	-	-	1	16
	0,05	-	-	7	22
БА	0,5	1	5	15	15
	0,25	13	15	6	19
	0,1	16	14	20	18
	0,05	5	5	15	13
ТДЗ	0,5	8	-	7	5
	0,25	7	6	10	8
	0,1	7	14	18	6
	0,05	8	-	-	-

Полученные результаты показывают, что более простые по составу питательные среды могут использоваться для эффективного микроклонального размножения тополя берлинского, а применение БА позволяет получать регенеранты из всех типов эксплантов.

Результаты исследования показали, что наибольшее количество регенерантов тополя берлинского можно получить на среде с БА и ИМК (таблица). Наибольшую эффективность при этом показали отрезки стеблей и корней. Питательная среда с КИН и ИМК оказалась наименее эффективной. На среде с ТДЗ и ИМК помимо регенерантов отмечали образование каллуса из всех типов эксплантов. Таким образом, питательная среда с ТДЗ (0,5 мг/л) и ИМК (все концентрации) может быть использована для получения органогенного каллуса тополя берлинского.

Авторы благодарят ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН за предоставленный доступ к аналитическому оборудованию.

Литература

Павличенко В.В., Протопопова М.В., Золотовская Е.Д., Байрамова Э.М., Коновалов А.Д., Войников В.К. Изучение влияния различных цитокининов на эффективность образования регенерантов при микроклональном размножении тополя берлинского (*Populus ×berolinensis* Dipp.) // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – Т. 6, № 4. – С. 164–168.

Jain S.M., Haggman H. Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht, Springer, 2007. – 559 p.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. – 1962. – V. 15. – P. 473–497.

THE PECULIARITIES OF *POPULUS* × *BEROLINENSIS* MICROPROPAGATION

V.V. Pavlichenko, M.V. Protopopova, V.K. Voinikov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, vpavlichenko@gmail.com, marina.v.protopopova@gmail.com, vvk@sifibr.irk.ru

Abstract. The study presents some peculiarities of Berlin poplar (*Populus* × *berolinensis*) micropropagation. A method for introducing into a sterile culture, the composition of the culture medium for *in vitro* culture, and the explant types and nutrient media compositions for the effective micropropagation of the Berlin poplar are described.

Keywords: *plants micropropagation, Berlin poplar, grow regulators, nutrient medium, organogenesis*

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОЗДАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ БОЛЕЗНЕЙ

Н.Е. Павловская, И.Н. Гагарина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина", Орёл, Россия, *ninel.pavlovsckaya@yandex.ru, i-gagarina@list.ru*

Аннотация. В работе дано физиолого-биохимическое обоснование создания биологических средств защиты растений. С этой целью проведены исследования компонентов иммунной сигнальной системы бобовых, крупяных и лекарственных растений на ростстимулирующую и антиоксидантную систему гороха, картофеля, томатов и огурца. На основании установленного положительного действия лектинов и биофлавоноидов на рост, развитие и бактериостатические свойства бобовых и овощных культур создан новый биологический препарат, обладающий стимулирующим и фунгицидным действием (патент №2626174).

Ключевые слова: лектины, биофлавоноиды, биологические средства защиты, антиоксидантная активность

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1334-1338

В последние годы, несмотря на применение химических препаратов, происходит интенсивное нарастание потерь сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей. Принцип построения полной защиты, основанной на использовании пестицидов, в конечном итоге оказался малоперспективным из-за возрастающей стоимости обработки, усиливающегося загрязнения окружающей среды и нарушения естественного биоценоза.

К числу защитных мероприятий, способных снизить остроту ситуации относится создание непоражаемых сортов. Вместе с тем, основой альтернативной химической технологии защиты сельскохозяйственных растений являются биологические препараты и физические методы.

Потери зерновых от болезней без применения пестицидов могут составлять до 15%. Зернобобовые культуры и в том числе горох поражаются, в основном, корневыми гнилями и аскохитозом. Недобор урожая может составлять от 20% до полной гибели.

В этих условиях растения адаптируются в результате функционирования конститутивных и индуцибельных систем [Тарчевский, 2000; Озерецковская, 2002]. Конститутивные системы вырабатываются в ходе эволюции, а индуцибельные системы появляются в ответ на действие стрессора (элиситора). Растения реагируют на неблагоприятные воздействия повышением стресс-толерантности.

При воздействии патогенов и их элиситоров в растениях включается система защиты (НАДФН-оксидазная, пероксидазная, фенольная, фитоалексинообразующая и т.д.), синтезируется совокупность токсических для патогенов белков, а также ферментов, разрушающих клеточные стенки патогенов, или укрепляющих клеточные стенки растений, и др. Защита растений, основанная на индуцировании их устойчивости с помощью собственных компонентов иммунной системы позволяет избежать загрязнения окружающей среды и является экологически безопасной. Методы стимулирования выработки растениями компонентов болезнестойкости растений может дополнить арсенал существующих средств защиты, позволит сократить потери урожая гороха и других зернобобовых культур от болезней и вредителей и снизить нагрузку химических средств защиты сельскохозяйственных растений на человека и животных.

Установлено, что устойчивые к фузариозу сорта гороха имеют более высокую каталазную, пероксидазную, но низкую по сравнению с восприимчивыми сортами активность о-дифенолоксидазы, высокое содержание лигнина, высокую активность лектинов, фитоалексинов (при инфицировании) и содержание ингибиторов протеиназ (ТИА и ХИА) в семенах [Павловская и др., 2013].

Точная функция лектинов бобовых в естественных условиях неизвестна, но они, вероятно, участвуют в защите растений от хищников, растительноядных беспозвоночных, травоядных животных, микроорганизмов, вредителей и насекомых [Харборн, 1985; Запрометов, 1996].

Одними из наиболее распространенных представителей вторичного метаболизма у растений являются и фенольные соединения. Во многих случаях именно они защищают растения от действия патогенных микроорганизмов и обуславливают устойчивость к действию биотических и абиотических факторов.

Высоким содержанием фенольных соединений отмечена гречиха – ценная сельскохозяйственная культура, в вегетативных и генеративных органах которой синтезируются и накапливаются растительные полифенольные соединения (флавоноиды, антоцианы, дубильные вещества, фитоалексины), выполняющие защитную функцию в отношении возбудителей патогенных заболеваний.

Исследованная нами динамика накопления фенольных соединений в генеративных органах различных по устойчивости к *Bruchus pisorum* L. сортообразцов гороха показало, что содержание фенольных соединений в зерне у группы устойчивых сортообразцов колеблется в среднем около 305 мг%, а у группы восприимчивых – около 209 мг%. Содержание фенолов в створках бобов у группы устойчивых сортообразцов почти вдвое выше, чем у группы восприимчивых [Зубарева, 2006].

Основываясь на роли лектинов и фенолов в устойчивости растений к возбудителям болезней и насекомым, нами ранее создано средство, повышающее иммунитет гороха, пшеницы, ячменя, овощных культур (патент №2463759). Препарат повышает урожай гороха, пшеницы, ячменя, картофеля, перца, томатов, огурца – на 15-20%.

Целью данной работы является создание нового средства защиты овощных культур на основе флавоноидов гречихи и лектинов, выделенных из различных растительных источников.

Объектом исследования являются: биофлавоноиды гречихи, лектины сои, одуванчика, лопуха, чистотела, подорожника, полыни горькой. Исследование компонентов иммуномодулирующего средства проводили на семенах овощных культур: огурца, томатов и картофеля. Для прогнозирования иммуномодулирующих свойств служили: всхожесть семян, показатели роста и развития проростков, суммарная антиоксидантная активность и активность пероксидазы.

Результаты. Расчет антиоксидантной активности (АА) показал (табл. 1), что все исследуемые растительные лектины проявляют высокую антиоксидантную активность. Но самой высокой она была при использовании лектинов одуванчика и корней лопуха.

Установлено, все лектины обладают стимулирующими свойствами в концентрации $10^{-4}\%$ и по своей активности располагаются в следующем порядке: лектины чистотела > лектины корня лопуха и полыни горькой > лектины сои > лектины корня подорожника > лектины одуванчика. Под влиянием лектинов повышается энергия прорастания и всхожесть семян картофеля и морфометрические показатели проростков (табл. 2). Аналогичным действием обладают и биофлавоноиды гречихи, входящие в комплексный препарат.

Таблица 1.

Антиоксидантная активность (АА) растительных лектинов

№ п/п	Исследуемый образец	Антиоксидантная активность (АА), %
1	Лектины семян сои <i>Glycine max</i>	54,82
2	Лектины корней одуванчика лекарственного <i>Taraxacum officinale</i>	89,09
3	Лектины корней лопуха большого <i>Arctium lappa</i> L.	68,28
4	Лектины корней подорожника большого <i>Plantago major</i>	59,45
5	Лектины полыни горькой <i>Artemisia absinthium</i> L.	48,85
6	Лектины чистотела <i>Chelidonium majus</i> L.	54,33

Таблица 2.

Влияние компонентов нового комплексного препарата на рост и развитие 10-дневных проростков картофеля сорта Краса

Вариант	Всхо- жесть лабора- торная, %	Энергия прора- стания, %	Длина проро- стков, см	Масса проро- стков, г	Длина коре- шка, см	Масса коре- шков, г	Кол-во коре- шков, шт
Контроль (без обработки)	71,1	69,1	2,4	0,07	0,6	0,30	1
Лектины семян сои <i>Glycine max</i> 10 ⁻⁴ %	76,4	74,1	3,1	0,09	0,8	0,34	1
Лектины корней одуванчика лекарственного <i>Taraxacum officinale</i> 10 ⁻⁴ %	71,3	70,2	3,6	0,10	1,4	0,60	2
Лектины корней лопуха большого <i>Arctium lappa</i> L. 10 ⁻⁴ %	78,1	77,5	3,6	0,09	1,8	0,85	2
Лектины корней подорожника большого <i>Plantago</i> <i>major</i> 10 ⁻⁴ %	74,6	72,4	3,6	0,09	1,4	0,78	3
Лектины чистотела <i>Chelidonium majus</i> L. 10 ⁻⁴ %	80,1	79,1	3,4	0,12	2,1	0,92	3
Лектины полыни горькой <i>Artemisia</i> <i>absinthium</i> L. 10 ⁻⁴ %	78,2	76,2	3,2	0,10	2,0	0,66	2
Биофлавоноиды 10 ⁻⁴ %	76,4	75,1	4,9	0,10	2,1	0,87	3

Сравнение действия комплексного препарата с известным биопрепаратом Фитоспорином М показало, что новый препарат оказал аналогичное действие на рост и развитие проростков картофеля (табл. 3).

Таблица 3.

Влияние нового комплексного препарата на рост и развитие 10-дневных проростков картофеля сорта Краса

Вариант	Длина проростков, см	Масса проростков, г	Длина корешка, см	Масса корешков, г	Кол-во боковых корешков
Контроль (без обработки)	2,4	0,07	0,6	0,30	1
Контроль – биопрепарат Фитоспорин М	4,1	0,19	1,5	0,90	3
Комплексный препарат 10 ⁻⁴ %	4,2	0,19	1,6	0,91	3

Сравнение действия нового комплексного препарата с Фитоспорином М на активность пероксидазы картофеля, томатов и огурца подтвердило стимулирующее действие на антиоксидантную систему овощных культур обоих биопрепаратов (рисунок).

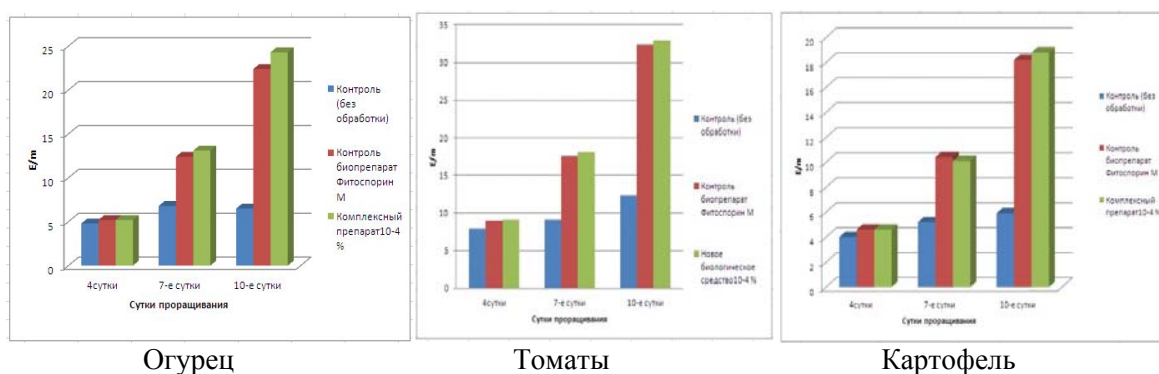


Рисунок. Активность фермента пероксидазы в проростках огурца сорта Серпантин (E/m), томатов сорта Розовый гигант и картофеля сорта Краса под влиянием биопрепаратов.

Нами предложена тест-система на основе лектинов, позволяющая с помощью реакции агглютинации прогнозировать бактериальную и грибковую зараженность овощных культур. Низкая зараженность выявлена в образцах картофеля, томатов и огурца при обработке препаратом «Фитоспорин М» и комплексным биологическим пестицидом.

Таким образом, на основании установленного положительного действия компонентов сигнальной системы иммунитета (лектинов и биофлавоноидов) на рост, развитие и бактериостатические свойства овощных культур создан новый биологический препарат, обладающий стимулирующим и фунгицидным действием (патент №2626174).

Литература

Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. – Москва: Наука, 1996. – 45с.

Зубарева К.Ю. Структурно-биохимические особенности *Pisum sativum* L., определяющие их устойчивость к *Bruchus pisorum* L. – Автореферат диссертации кандидата биологических наук : 03.00.12. – Воронеж. гос. Университет, 2006.

Озерецковская О.Л. Проблемы специфического фитоиммунитета // Физиология растений. – 2002. – Т. 49. – № 3. – С. 148–154.

Павловская Н.Е. и др. Физиолого-биохимическое обоснование создания биологических средств защиты растений от болезней и вредителей // Монография, Орел: ГНУ ВНИИЗБК. – 2013. – 188 с.

Павловская Н.Е., Гагарина И.Н. и др. Средство для предпосевной обработки семян гороха. – Патент №2463759 от 20 октября 2012 г. Бюллетень № 29.

Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Бородин Д.Б. и др. Средство для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта. – Патент №2626174 от 21 июля 2017 г. Бюллетень № 21.

Тарчевский И.А. Элиситор-индуцируемые сигнальные системы и их взаимодействие // Физиология растений. – 2000. – Т. 47, № 2. – С. 321–331.

Харборн Дж. Введение в экологическую биохимию. – Москва: Мир, 1985. – 312 с.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDY ON THE DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL MEANS OF PROTECTION OF PLANTS FROM DISEASES

N.E. Pavlovskaya, I.N. Gagarina

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Orel State Agrarian University", Orel, Russia, ninel.pavlovsckaya@yandex.ru, i-gagarina@list.ru

Abstract. In the work the physiological and biochemical substantiation of creation of biological means of protection of plants is given. For this purpose, the components of the immunomodulatory agent for the detection of antioxidant activity were studied. The highest activity was shown by lectins isolated from dandelion medicinal *Taraxacum officinale*. Pectins and bioflavonoids showed high growth-stimulating abilities on potato sprouts. Created a new biological preparation based on lectins and bioflavonoids, also showed good results in comparison with industrial drug fitosporin M. Application of complex preparation on cucumbers, tomatoes and potatoes on indicators of antioxidant activity also confirmed immunostimulating effect.

Keywords: *lectins, bioflavonoids, elicitors, biological remedies, antioxidant activity*

ПОСТАНОВКА МЕТОДА ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО МЕЧЕНИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК РАЗНОЙ ДЛИНЫ И АНАЛИЗА ИМПОРТА МЕЧЕНЫХ СУБСТРАТОВ В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ

А.В. Панфилов¹, Ю.М. Константинов², М.В. Кулинченко²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия, panfilov.alexander@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, mk100171@yahoo.com

Аннотация. Мы применили два подхода получения флуоресцентно меченой ДНК как субстратов импорта в митохондрии: (1) введение флуоресцентного красителя в молекулы ДНК с помощью амплификации в ПЦР с использованием праймеров, содержащих Cy3; (2) включение в ДНК модифицированного мононуклеотида аминоксил-дУТФ в ходе ПЦР с последующим мечением АА-дУТФ активированным N-гидроксисукцимидным эфиром (Cy3-SE). Мы провели тестирование эффективности импорта в митохондрии, изолированные из *A. thaliana*, субстратов ДНК, меченых таким образом в ПЦР.

Ключевые слова: флуоресцентное мечение ДНК, полимеразная цепная реакция, модификация нуклеотидов, импорт ДНК в митохондрии растений

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1339-1343

Флуоресцентное мечение нуклеиновых кислот, дезоксирибонуклеиновой (ДНК) и рибонуклеиновой (РНК) является основным методом биодетекции в ДНК/РНК-диагностике, молекулярно-генетических исследованиях, секвенировании, геномном анализе, флуоресцентной микроскопии [Bentley et al., 2008], применяется в протеомике, метаболомике, геномной инженерии растений (трансгенез) [Ranasinghe et al., 2005]. Флуоресцентное мечение молекул ДНК/РНК, проводимое с использованием, в основном, цианиновых красителей с полиеновой структурой в транс-форме [Alexander et al., 2015], позволяют идентифицировать точечные мутации в генах, детектировать локальную модификацию и конформацию в биополимерах сложного строения. В молекулярно-генетических исследованиях существует необходимость в разработке методов быстрого анализа специфических последовательностей ДНК.

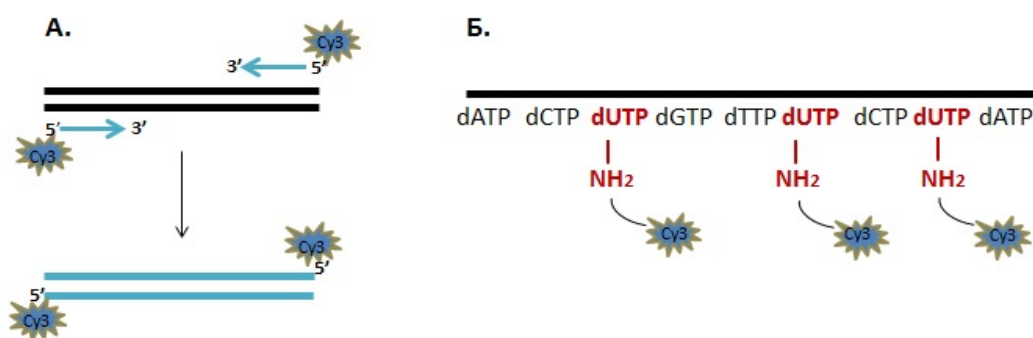


Рис. 1. Схема способов введения флуоресцентно меченых нуклеотидов в молекулы ДНК. А. Амплификация фрагментов ДНК в ПЦР с использованием флуоресцентно меченых праймеров; Б. Амплификация фрагментов ДНК в ПЦР с использованием аминоксил-дУТФ вместо/вместе с дТТФ и последующей инкубацией фрагментов ДНК с активизированным N-гидроксисукцимидным эфиром красителя, Cy3-SE.

Ранее при изучении процесса импорта ДНК в митохондрии использовали радиоактивно меченые [Koulintchenko et al., 2003] или «холодные» (немеченые) субстраты ДНК [Клименко и др., 2011]. Радиоактивно меченые субстраты получают амплификацией фрагмента ДНК в одном цикле ПЦР в присутствии [$\alpha^{32}\text{P}$] дЦТФ. После инкубации радиоактивно меченой ДНК с митохондриями и последующих обработок экстрагированную митохондриальную ДНК разделяют электрофоретически в агарозном геле и переносят на мембрану: анализ импорта ДНК с помощью радиоавтографии позволяет визуализировать полноразмерные молекулы импортированной ДНК, качественно и с высокой чувствительностью оценить влияние тех или иных эффекторов на импорт ДНК. Использование радиоактивной метки имеет, тем не менее, ряд очевидных недостатков. Анализ импорта немеченых субстратов ДНК проводят при помощи метода ПЦР в реальном времени. Такого рода анализ позволяет проводить количественную оценку влияния на процесс разных агентов и ингибиторов, изучать его кинетические характеристики, однако также имеет недостатки, связанные с тем, что в ходе анализа детектируются не полноразмерные молекулы ДНК, а лишь ее фрагменты.

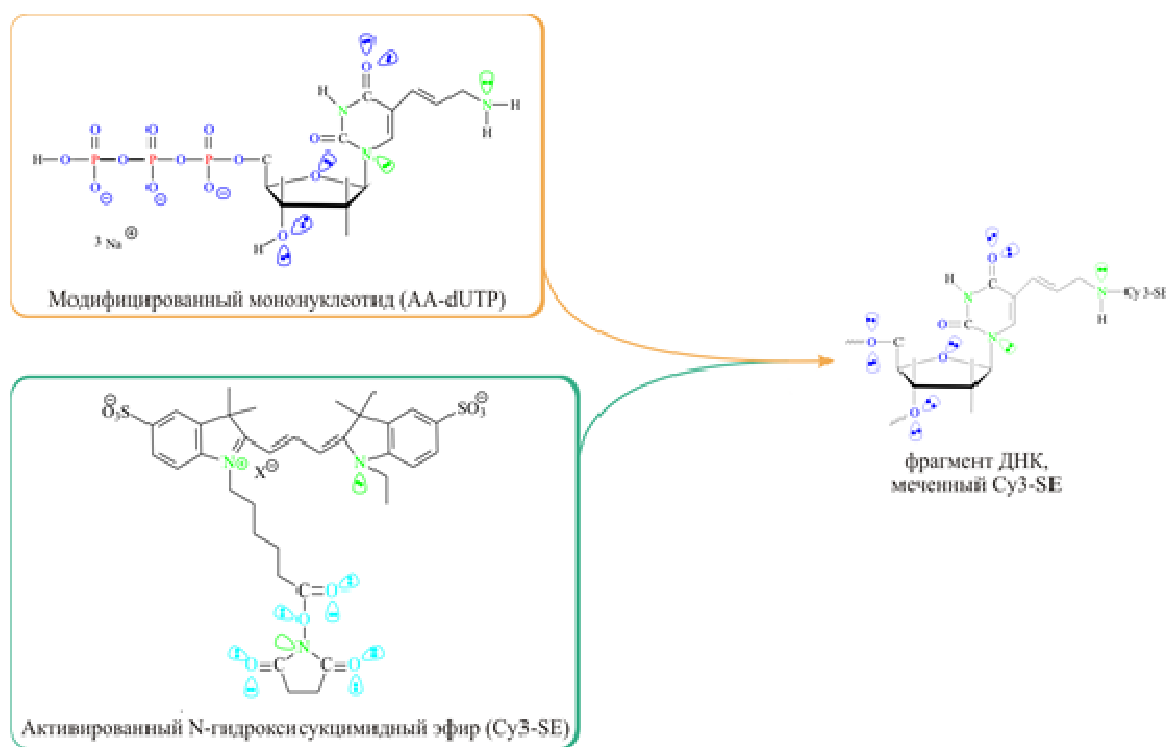


Рис. 2. Схема мечения ДНК фрагмента флуоресцентным красителем N-гидроксисукцинимидным эфиром Cy3-SE (NHS-ester).

Мы предположили, что введение в молекулы ДНК нерадиоактивной флуоресцентной метки позволит преодолеть недостатки, сохраняя при этом основные преимущества использования для импорта меченых субстратов ДНК, такие, как возможность тестирования после экстракции полноразмерных импортированных молекул, высокую чувствительность и специфичность, а также быстроту анализа. Ранее меченую таким образом ДНК использовали лишь в одной работе [Jackson et al., 2014] для характеристики импорта ДНК в изолированные митохондрии человека.

Для того чтобы ввести в состав молекулы ДНК флуоресцентный краситель, можно использовать амплификацию фрагментов ДНК с помощью праймеров, имеющих на 5'-концах Cy3 (цианин 3) (рис. 1А). Флуоресцентную метку можно ввести в ДНК

также посредством инкубации фрагментов ДНК, содержащих наряду с дТТФ аминоксил-дУТФ, с активированным эфиром красителя Су3 (рис. 1Б). Мы применили оба подхода получения флуоресцентно меченых субстратов импорта: для молекул ДНК с длиной 0,1- 3 т.п.н. была использована амплификация с флуоресцентно мечеными праймерами (рис. 1А), для молекул ДНК с длиной 7 – 9 т.п.н. способ модификации последовательности с последующей активацией флуоресцентным красителем (рис. 1Б). Во втором случае задача исследования заключалась в том, чтобы в процессе полимеразной цепной реакции (ПЦР) *in vitro* встроить в двунитевую ДНК комплементарно дТТФ (дезокситимидин-5'-трифосфат) минорный компонент модифицированный мононуклеотид 5-(3-аминоаллил)-2'-дезоксинуридин-5'-трифосфат (аминоаллил-дУТФ), с последующим постсинтетическим мечением аминоксил-дУТФ (АА-дУТФ) в составе амплифицированных молекул ДНК активированным N-гидроксисукцинимидным эфиром (Су3-SE) (рис. 2).

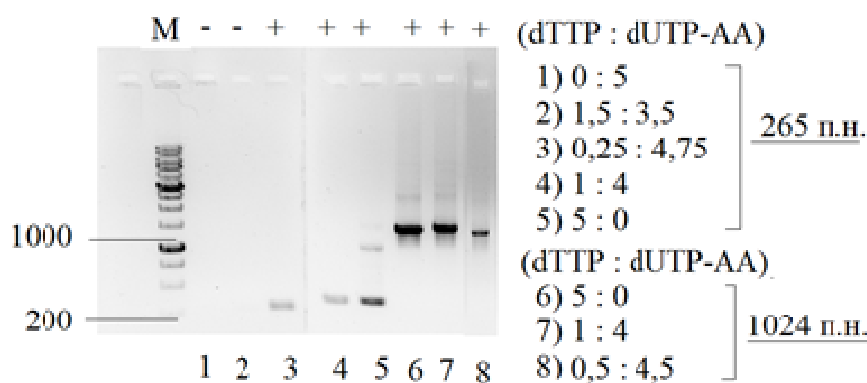


Рис. 3. Анализ зависимости эффективности амплификации ДНК размером 265 и 1024 п.н. от соотношения в реакционной смеси ПЦР мононуклеотидов дТТФ и АА-дУТФ. Представлен результат электрофоретического разделения в агарозном геле продуктов ПЦР, полученных с использованием указанных на рисунке соотношений дТТФ и АА-дУТФ в мкл. М – маркер.

Для оптимизации встраивания аминоксил-дУТФ в молекулу ДНК и синтеза ДНК (необходимой для последующей реамплификации) были протестированы несколько условий: активность разных ферментов (Dream-Taq [Thermo Scientific] и Epcuslo [Евроген] полимеразы) и разные соотношения мононуклеотидов дТТФ:АА-дУТФ. Максимальное флуоресцентное свечение наблюдалось при $\lambda_{\text{max}} = 260$ нм для соотношений дТТФ:АА-дУТФ (1:4) с ферментом Dream-Taq полимеразой. На рис. 3 представлены данные синтеза фрагментов ДНК длиной 265 и 1024 п.н. с различными соотношениями дТТФ:АА-дУТФ. Следует отметить, что для обоих фрагментов ДНК с увеличением объема дТТФ синтезируется большее количество ДНК.

Далее постсинтетическое мечение аминоксил-дУТФ, включенных в состав нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК размером 265 п.н. и 1024 п.н., проводили в фосфатном буфере $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ при рН 8.4. Флуоресцентное мечение было отмечено для короткого фрагмента ДНК (265 п.н.) с тестируемыми соотношениями дТТФ:дУТФ-АА, а именно 1:4 и 0,5:4,5, однако его уровень был невысоким.

Сотрудниками лаборатории было проведено тестирование эффективности импорта в митохондрии, изолированные из растений арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), двух субстратов ДНК размером 109 п.н. и 852 п.н., полученных амплификацией в ПЦР с помощью праймеров, содержащих на 5'-конце

флуоресцирующую группу (Cy3) (рис. 1А). На рис. 4 представлены результаты анализа импорта флуоресцентно меченой ДНК данных фрагментов в митохондрии, изолированные из линии дикого типа (*Col-0*) и мутантной линии *tspo* (по гену *At2g47770*, кодирующему белок TSPO, от Tryptophan-rich Sensory Protein).

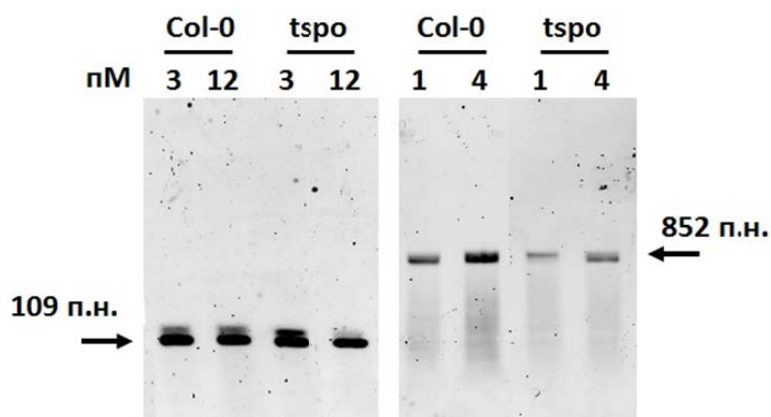


Рис. 4. Анализ импорта флуоресцентно меченой ДНК в митохондрии арабидопсиса (*A. thaliana*) линий дикого типа (*Col-0*) и мутанта (*tspo*). На рисунке представлены результаты электрофоретического разделения митохондриальных проб импорта фрагментов ДНК размером 109 п.н. и 852 п.н. Визуализация флуоресцентно меченых фрагментов проведена с помощью сканера GE Healthcare. Указано количество ДНК в пМ, взятое для инкубации с митохондриями.

Показано, что с увеличением количества флуоресцентно меченой ДНК в среде инкубации, от 3 до 12 пМ (0,2-0,85 мкг) для малых фрагментов или от 1 до 4 пМ (0,5-2 мкг) для средних фрагментов, эффективность импорта не менялась для фрагментов обоих размерных классов. Таким образом, в данной работе впервые была продемонстрирована возможность использования для анализа эффективности импорта ДНК в митохондрии растений флуоресцентно меченых субстратов.

Литература

Клименко Е.С., Милейко В.А., Морозкин Е.С., Лактионов П.П., Лактионов Ю.М. Характеристика импорта и экспорта ДНК в митохондриях картофеля (*Solanum tuberosum*) с использованием метода количественной ПЦР // Биологические мембраны. – 2011. – Т. 28 (3). – С. 199–205.

Bentley et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry // Nature. – 2008. – P. 53–59.

Gorka A.P., Nani R.R., Schnermann M.J. Cyanine polyene reactivity: scope and biomedical applications // Organic and Biomolecular Chemistry. – 2015. – P. 1–3.

Jackson C.B., Zbinden C., Gallati S., Schaller A. Heterologous expression from the human D-Loop in organello // Mitochondrion. – 2014. – V. 17. – P.67–75.

Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // EMBO J. – 2003. – V. 22 (6). – P. 1245–1254.

Ranasinghe R.T., Brown T. Fluorescence based strategies for genetic analysis // Chem. Commun. – 2005. – P. 5487–5502.

DEVELOPING OF METHOD OF FLUORESCENT LABELING OF DNA FRAGMENTS WITH DIFFERENT LENGTHS AND ANALYSIS OF LABELED SUBSTRATES IMPORT IN THE MITOCHONDRIA OF PLANTS

A.V. Panfilov¹, Yu.M. Konstantinov^{1,2}, M.V. Koulintchenko²

¹Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, *panfilov.alexander@mail.ru*

²Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *mk100171@yahoo.com*

Abstract. We applied two approaches to obtain the fluorescent labeled DNA as substrates for mitochondria import: (1) introduction of the fluorescent dye in DNA molecules using PCR amplification with primers containing Cy3; (2) incorporation in DNA of modified mononucleotide aminoallyl-dUTP during PCR, followed by postsynthetic labeling of the AA-dUTP by activated N-hydroxysuccinimide ester (Cy3-SE). We tested the efficiency of import into mitochondria isolated from *A. thaliana* of DNA substrates labeled thus in PCR.

Keywords: *fluorescent labeling of DNA, polymerase chain reaction, modification of nucleotides, DNA import in plant mitochondria*

БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АКТИНОБАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БАЙКАЛЬСКИМИ ЭНДЕМИЧНЫМИ АМФИПОДАМИ-ФИТОФАГАМИ, ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОТОПОВ ОЗЕРА

Е.С. Протасов¹, Д.В. Аксенов-Грибанов^{1,2}, М.Е. Краснова¹, И.А. Дмитриев¹,
В.А. Емшанова¹, Е.В. Мадьярова^{1,2}, М.А. Тимофеев¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия, protasov.evgenii@gmail.com

²Автономная некоммерческая организация «Байкальский исследовательский центр», Иркутск, Россия

Аннотация. В ходе проведения работы исследован биосинтетический потенциал актинобактерий, выделенных из двух групп эндемичных ракообразных озера Байкал – литоральных и глубоководных амфипод. Показано преобладание представителей рода *Streptomyces* для обеих групп амфипод. Тестирование биосинтетической активности с помощью диск-диффузионного метода проводили против ряда модельных микроорганизмов – *E. coli*, *P. putida*, *B. subtilis*, *S. carnosus*, *S. cerevisiae*. Проведенное исследование выявило наличие штаммов как с направленной активностью против отдельных групп микроорганизмов (грамотрицательных, грамположительных, грибов), так и широкого спектра активности.

Ключевые слова: актинобактерии, амфиподы, эндемики, озеро Байкал

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1344-1347

В настоящее время наблюдается рост случаев заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными штаммами, что представляет серьезную проблему для современной медицины. Особую значимость это приобретает в свете медленного развития новых антибиотиков [Redgrave et al., 2014]. Природные соединения, выделенные из различных организмов – растений, животных и микроорганизмов, по-прежнему остаются основным источником для создания новых лекарств не только в борьбе с инфекционными заболеваниями, но и при борьбе с раком, заболеваниями иммунной системы, при трансплантации органов и др. [Wright, 2017]. Одной из наиболее продуктивных групп микроорганизмов, ответственных за синтез примерно 60% всех биологически активных метаболитов, открытых в период с 1940-х по 2010, являются актинобактерии. При этом, представители этой группы синтезируют такие важные классы соединений, как полиеновые макролиды, макролиды типа олигомицина, антрациклины, большинство аминогликозидов и актиномицинов [Bérdu, 2012]. Как и в других группах продуцентов биологически активных веществ, среди актинобактерий наблюдается снижение числа открытий новых веществ и высокий процент повторного выделения уже известных соединений. Для решения этой проблемы исследователи сместили свое внимание на малоисследованные объекты, такие как морские осадки и беспозвоночные [Beemelmans et al., 2016; Dhakal et al., 2017]. Вместе с тем, перспективными для исследования являются экосистемы с длительной эволюцией и специфическими абиотическими условиями. Одной из таких экосистем является озеро Байкал.

В данном исследовании мы изучили две группы байкальских эндемичных амфипод-фитофагов (*Amphipoda*, *Crustacea*) на предмет наличия ассоциированных с ними актинобактерий и их биосинтетического потенциала. В первой группе (литоральных амфипод) нами было выделено 8 штаммов актинобактерий из четырех видов амфипод: *Eulimnogammarus cruentus*, *E. viridis*, *Brandtia latissima lata*, *E. cyaneus*. По результатам филогенетического анализа гена 16S рРНК 5 штаммов было отнесено к роду *Streptomyces*, а 3 других к роду *Micromonospora*. Амфиподы были собраны с

глубин от 0,5 до 20 м в районе Южного Байкала. Также были выделены и штаммы из глубоководных амфипод видов *Pallasea brandtii flavices*, *Crypturopus tuberculatus*, *Acanthogammarus godleuskii* (Dyb., 1874), *E. ussolzewii* (Dyb.), *E. aheneus*, *Ommatogammarus carneolus melanophthalmus*, выловленных с глубин от 126 до 300 м. Как и в литоральной группе, подавляющее число штаммов (11) было отнесено к роду *Streptomyces*. Однако также было показано наличие представителей других родов – *Pseudonocardia* (2), *Amycolatopsis* (1), а также одного штамма из рода *Micromonospora* (табл. 1).

Таблица 1.

Список штаммов актинобактерий, выделенных из байкальских эндемичных амфипод

Штамм	Вид амфипод	Глубина пробоотборам
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P97-2	<i>Eulimnogammarus cyaneus</i>	0,5
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P97-4	<i>Eulimnogammarus cyaneus</i>	0,5
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P32-2	<i>Brandtia (Brandtia) latissima lata</i>	4
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P36-1	<i>Brandtia (Brandtia) latissima lata</i>	4
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P38-4	<i>Brandtia (Brandtia) latissima lata</i>	4
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P39-1	<i>Brandtia (Brandtia) latissima lata</i>	4
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P22-1	<i>Eulimnogammarus cruentus</i>	20
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P28-2	<i>Eulimnogammarus (Philolimnogammarus) viridis viridis</i>	20
<i>Pseudonocardia</i> sp. IB2015P10-1	<i>Pallasea brandtii flavices</i>	126
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P11-2	<i>Crypturopus tuberculatus</i>	126
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P11-3	<i>Crypturopus tuberculatus</i>	126
<i>Pseudonocardia</i> sp. IB2015P11-4	<i>Crypturopus tuberculatus</i>	126
<i>Amycolatopsis</i> sp. IB2015P14-2	<i>Acanthogammarus godleuskii</i>	126
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P138-1	<i>Eulimnogammarus ussolzewii</i>	150
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P138-2	<i>Eulimnogammarus ussolzewii</i>	150
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P139-1	<i>Eulimnogammarus aheneus</i>	150
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P139-2	<i>Eulimnogammarus aheneus</i>	150
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P140-1	<i>Odontogammarus calearatus pulcherrimus</i>	150
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P141-1	<i>Ommatogammarus carneolus melanophthalmus</i>	200
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P142-1	<i>Eulimnogammarus ussolzewii</i>	300
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P143-1	<i>Ommatogammarus carneolus melanophthalmus</i>	300
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P143-2	<i>Ommatogammarus carneolus melanophthalmus</i>	300
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P143-3	<i>Ommatogammarus carneolus melanophthalmus</i>	300

Для изучения биосинтетического потенциала актинобактерий чистые культуры были выращены в жидкой среде NL-19 (маннитол – 20 г/л, соевая мука – 20 г/л, вода водопроводная – 1 л) в течение 5-10 дней. Для получения экстрактов полученный после центрифугирования супернатант смешивали с равным объемом этилацетата и интенсивно встряхивали в течение часа на шейкере. Далее этилацетатную вытяжку испаряли в вакуумном испарителе, а получившийся сухой экстракт ресуспендировали в 500 мкл метанола. Для проведения антибиотических тестов предварительно подсушенные бумажные диски (с нанесенными 40 мкл экстракта) укладывали на

поверхность свежепосеянных и подсохших тест-культур *E. coli*, *P. putida*, *B. subtilis*, *S. carnosus*, *S. cerevisiae*. Чашки с тест-культурами культивировали в течение 24 часов в термостате при оптимальных для роста тест-культур температурах, после чего были оценены зоны ингибирования.

Таблица 2.

Антибиотическая активность выделенных штаммов актинобактерий против тест-микроорганизмов

Штамм	<i>B. subtilis</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>P. putida</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P97-2	+	+	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P97-4	+	-	+	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P32-2	-	-	+	+	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P36-1	+	-	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P38-4	+	+	-	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P39-1	-	+	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P22-1	+	+	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P28-2	+	+	+	+	-
<i>Pseudonocardia</i> sp. IB2015P10-1	+	+	+	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P11-2	+	+	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P11-3	-	-	-	-	-
<i>Pseudonocardia</i> sp. IB2015P11-4	-	-	-	-	-
<i>Amycolatopsis</i> sp. IB2015P14-2	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P138-1	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P138-2	+	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P139-1	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P139-2	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P140-1	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P141-1	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P142-1	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P143-1	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P143-2	-	+	+	+	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P143-3	-	+	+	+	-

По результатам исследования антибиотической активности было показано наличие штаммов как со специфичной активностью против грамположительных *Micromonospora* sp. IB201511-2, *Streptomyces* sp. IB2015P22-1, *Streptomyces* sp. IB2015P97-2), так и против широкого круга тест-культур (*Pseudonocardia* sp. IB201510-1, *Streptomyces* sp. IB2015143-2, *Streptomyces* sp. IB2015P36-1). Вместе с тем, среди выделенных штаммов, лишь один – *Micromonospora* sp. IB2015P32-2 проявил специфическую активность против грамотрицательных культур *E. coli* и *P. putida* (табл. 2). Как видно из табл. 2, как в группе актинобактерий, выделенных из литоральных амфипод, так и в группе бактерий, выделенных из глубоководных амфипод, присутствуют штаммы, характеризующиеся как узко направленной активностью против одного типа микроорганизмов, так и с широкой активностью против различных тест-объектов.

Таким образом, озеро Байкал и его обитатели, особенно эндемики-фитофаги, обитающие длительное время в условиях постоянных и низких температур и повышенного содержания кислорода, могут обладать специфическими связями с симбионтной микрофлорой. Микроорганизмы, ассоциированные с амфиподами из различных экотопов озера, по-видимому, обладают специализированными метаболическими путями, позволяющими им синтезировать новые соединения для защиты своих хозяев. Предварительные исследования биосинтетического потенциала

актинобактерий, ассоциированных с эндемичными амфиподами озера Байкал, показывают их перспективность как источника новых штаммов и природных соединений.

Данное исследование было выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-14-01063, РФФИ (16-34-60060, 18-34-00294), Госзадания 6.9654.2017/8.9, совместной программы Михаил Ломоносов германской службы академических обменов DAAD и Министерства образования и науки РФ (6.12737.2018/12.2, 6.12738.2018/12.2) и гранта фонда Байкал.

Литература

Beemelmans C. et al. Natural products from microbes associated with insects // Beilstein J. Org. Chem. – 2016. – V. 12. – P. 314–327.

Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading // J. Antibiot. (Tokyo). – 2012. – V. 65, No. 8. – P. 385–395.

Dhakal D. et al. Marine rare actinobacteria: Isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds // Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. – No. JUN.

Redgrave L.S. et al. Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success // Trends Microbiol. – 2014. – V. 22, No. 8. – P. 438–445.

Wright G.D. Opportunities for natural products in 21 st century antibiotic discovery // Nat. Prod. Rep. – 2017. – V. 34, No. 7. – P. 694–701.

BIOSYNTHETIC POTENTIAL OF ACTINOBACTERIA ASSOCIATED WITH LAKE BAIKAL ENDEMIC AMPHIPOD-PHYTOPHAGES FROM DIFFERENT LAKE'S ECOTOPES

E.S. Protasov¹, D.V. Axenov-Gribanov^{1, 2}, M.E. Krasnova¹, I.A. Dmitriev¹, V.A. Emshanova¹, E.V. Madyarova^{1, 2}, M.A. Timofeyev¹

¹Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, protasov.evgenii@gmail.com

¹Baikal Research Center, Irkutsk, Russia

Abstract. The biosynthetic potential of actinobacteria isolated from two groups of endemic crustaceans of Lake Baikal, littoral and deep-water, were studied. It was shown the predominance of the specimens from the genus *Streptomyces* for both groups of amphipods. The test of biosynthetic activity was conducted by means of disk-diffusion method against a number of model microorganisms, *E. coli*, *P. putida*, *B. subtilis*, *S. carnosus*, *S. cerevisiae*. The conducted study revealed the strains with both targeted activity against specific type of microorganisms (Gram negative, Gram positive, or fungi) and a wide range of activity.

Keywords: *actinobacteria, amphipods, endemics, Baikal*

О СПОСОБАХ ИНТЕНСИФИКАЦИИ СИНТЕЗА АНТИГЕННЫХ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ИННОВАЦИОННЫХ ВАКЦИН НА БАЗЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСПРЕССИОННЫХ СИСТЕМ

Н.И. Рекославская^{1,2}, Р.К. Саляев¹, А.С. Столбиков¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Россия

Аннотация. Растительная экспрессионная система на основе плодов трансгенного томата была использована для усиления синтеза антигенного белка HPV16 L1 наиболее онкогенного типа 16 папилломавируса человека. Для создания стабильно трансформированных растений томата была использована генетическая конструкция рVINHPV16 L1 Ω 5' НТО ВТМ, которая обеспечивала продукцию HPV16 L1 до 2330 нг/мг общего растворимого белка (ОРБ). Для транзientной экспрессии была разработана генетическая конструкция с репликазой РНК2а CMV (RdRP), которая включала белок антисайленсер РНК2b CMV. В этом случае выход антигенного белка достигал 200000 нг/мг ОРБ.

Ключевые слова: высокоонкогенный папилломавирус тип 16, HPV16 L1, омега лидер ВТМ, RdRP CMV

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1348-1352

Растительные экспрессионные системы имеют значительные преимущества по сравнению с другими экспрессионными системами на основе бактерий, бакуловирусов, дрожжей, микроводорослей, так как осуществляют гликозилирование антигенных белков, сопоставимое с млекопитающими, не несут скрытых опасных генетических элементов, достаточно дешевы, довольно легко переводимы на крупномасштабное производство антигенных белков или других биофармацевтиков, а антигенные белки, синтезированные в растениях, способны достаточно долго (до года и более) храниться без потери иммуногенности. Но стабильно трансформированные с помощью агробактериального вектора растения обеспечивают недостаточно высокий выход синтеза антигенных белков в пределах нескольких десятков нг на мг ОРБ, что значительно препятствует их масштабированному производству при создании инновационных вакцин на базе растений. Поэтому для интенсификации синтеза применяют различные вирусные регуляторные элементы и гены, которые в природе позволяют вирусам довольно быстро синтезировать свои структурные белки, необходимые для организации генома, репликации, транспорта и ассамблирования. При этом необходимым условием является помещение генетической конструкции в пределы ТДНК агробактерии, обеспечивающей стабильную инсерцию в геном растительной клетки и наследование в поколениях.

Нами был использован лидерный (с 1 по 68 пн) генетический элемент ВТМ Ω (омега) 5' НТО ВТМ для создания растительной продукционной системы для синтеза антигенного белка папилломавируса высокоонкогенного типа HPV16 L1. Ген *hpv16 L1* помещали под контроль промотора р35S вируса мозаики цветной капусты и последовательности омега лидера (трансляционного энхансера) вируса мозаики табака (Ω 5'НТО ВТМ) (рис. 1). Последовательность Ω 5'НТО ВТМ состоит из 68 пн: GUAUUUUACAACAUAUACCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAUAUACAUAUA CUAUUUACAUAUACA [Agalarov et al., 2011]. Омега лидер Ω 5'НТО ВТМ является

высокоэффективным усилителем (энхансером) трансляции вследствие уникальности своей структуры, отличающейся следующими особенностями: 1 – центральная (коровая) часть состоит из 11 повторов цитидиловых и адениловых остатков САА, составляющих примерно половину всей последовательности лидера; 2 – повторяющиеся САА остатки формируют стабильную тройную спираль, отличающуюся от канонического спаривания по Уотсону и Крику, так как в ней почти отсутствуют гуаниловые остатки, а вместо этого С:А и А:А связаны одной водородной связью; 3 – лидерная последовательность с помощью тройной спирали и АУ-обогащенной 3'концевой части может связываться с 80S и 40S рибосомами и усиливать трансляцию. Омега лидер ВТМ способен усиливать трансляцию с гомологичных или гетерологичных РНК в клетках различного типа (в том числе, как животных, так и растительных), а также в бесклеточных системах [Agalarov et al., 2011]. Исходя из структуры неканонической спирали с САА повторами можно предполагать, что таким образом создается эффект подавления замолкания вирусной РНК ВТМ, так как РНКазы Dicer (или AGO и др.) не способна разрезать омега последовательность ввиду отсутствия соответствующих сайтов рестрикции, а сам омега лидер представляет собой антисайленсерный элемент. К тому же, других подобных регуляторных элементов у РНК ВТМ нет, хотя, как известно [Hao et al., 2011], многие РНК+вирусы снабжены последовательностями белков антисайленсеров, функцией которых является сохранение популяции РНК. Омега лидер, как реликтовый генетический элемент [Agalarov et al., 2011], по-видимому, в природе еще представляет собой праймер для синтеза ДНК по копии РНК, подобно РНК I и РНК II в плаزمиде Col E2 *E.coli* при регуляции репликации и инициации синтеза ДНК, хорошо известным в литературе [Sugiyama, Itoh, 1993]. В ранних работах [Goelet et al., 1982] САА обогащенные последовательности омега лидера были успешно использованы как праймеры в синтезе амплификатов ДНК на первоначальных этапах секвенирования ВТМ.

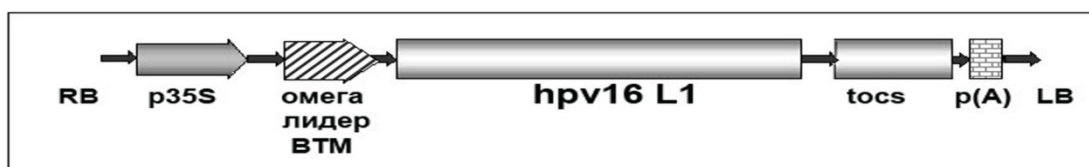


Рис. 1. Схема генетической конструкции рVINHPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ. RB и LB - правая и левая пограничные последовательности гДНК *A. tumefaciens* EHA105, p35S - промотор 35S РНК вируса СаMV, Ω 5'НТО ВТМ - Ω лидер в 5' нетранслируемой области ВТМ, *hpv16 L1* - ген, кодирующий основной белок L1 оболочки папилломавируса человека высокоонкогенного типа 16, *tocs* - терминатор гена октопинсинтазы *A. tumefaciens*, поли(А) сигнал - сигнал полиаденилирования мРНК.

Генетическую конструкцию рVINHPV16 L1 помещали в *A. tumefaciens* EHA105 и трансформировали плоды томата уколом суспензии *A. tumefaciens* в растворе 1 мг/мл ацетосирингона в 5% глюкозе. Для трансформации плоды выдерживали при 6-8 °С в течение 15-20 суток в темноте. Препараты общей РНК из трансформированных плодов томата получали с помощью набора Triagent (MolBiol. Scientific Research, США). При изготовлении зонда для нозерн-дот-блот-гибридизации использовали плазмиду рUC57 HPV16 L1 Ω 5' НТО ВТМ, клонируемую в *E.coli* DH5α, и набор DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Diagnostics, США).

На рис. 2 представлена нозерн-дот-блот-гибридизация РНК из экстрактов плодов трансгенного томата, нанесенная по 5 мкл в пятно на мембрану Nucleobond N+, с зондом DIG-11-dUTP рUC57 HPV16 L1 Ω 5' НТО ВТМ. Можно видеть, что в плодах трансгенного по гену *hpv16 L1* томата присутствует РНК в достаточных количествах

для гибридизации с зондом DIG-11-dUTP pUC57 HPV16 L1 Ω 5' НТО ВТМ. В образцах контрольных томатов такой гибридизации не обнаружили.



Рис. 2. Присутствие РНК HPV16 L1 Ω 5' НТО ВТМ в экстрактах общей РНК из трансгенных плодов томата. Первичные антитела - моноклональные антитела к HPV16 L1 (Santa Cruz Biotechnology, США), вторичные антитела - анти-DIG-POL (Roche Diagnostics, США), субстрат - 3',3',5',5'-тетраметилбензидин (ТМБ). Контроль – нетрансформированные плоды.

Электрофоретический анализ буферных экстрактов лиофильно высушенных плодов трансгенного томата выявил наличие 1 полосы, совпадающей по подвижности с маркером белка с молекулярной массой 55 кДа (рис. 3). При этом, судя по плотности окрашивания пятен, количество стандарта HPV16 L1 в 2,5 мкг в пятно (рис. 3, 1), нанесенное на пластинки PhastGel Native Buffer 4-15 % (Amersham, UK), значительно уступало по содержанию антигенного белка HPV16 L1 в экстрактах плодов томата (рис. 3, 2-5).

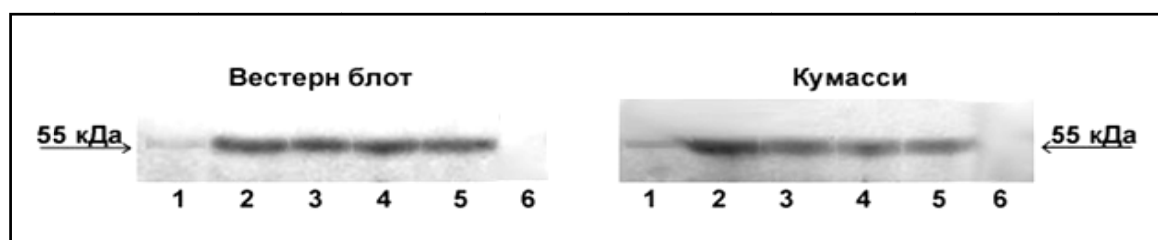


Рис. 3. Хроматографическое разделение экстрактов плодов томата после генетической трансформации суспензией *A. tumefaciens* ЕНА105 с рVINHPV16 L1 Ω 5' НТО ВТМ в течение 15 суток (справа) и вестерн-блот-гибридизация по данной электрофореграмме (слева). 1 - 2,5 мкг стандартного белка HPV16 L1 (Genway Bio, США), 2, 3, 4 и 5 - 0,5 мкл экстрактов лиофильно высушенных плодов томата с HPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ, 6 - экстракт из нетрансформированных плодов. Указана молекулярная масса HPV16 L1 в 55 кДа. Для электрофореза использовали прибор Phastsystem и пластинки PhastGel (Amersham, UK) с градиентом ПААГ 4-15% в нативном буфере, которые проявляли по Кумасси. Для вестерн-блоттинга пластинки инкубировали с первичными антителами к HPV16 L1 (Santa Cruz Biotechnology, США), обрабатывали вторичными антителами с привитой пероксидазой, в качестве субстратов использовали ортофенилендиамин (ОФД) и ТМБ в последовательной обработке.

Количественное определение содержания HPV16 L1 проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) в буферных экстрактах лиофильно высушенных трансгенных плодов томата (рис. 4), содержание общего растворимого белка (ОРБ) рассчитывали по Брэдфорд. Как можно видеть на рис. 4, содержание антигенного белка HPV16 L1 было достаточно велико во всех образцах высушенных плодов томата и значительно превосходило уровень 400 нг стандартного раствора HPV16 L1 (GenWayBio, США). Количество HPV16 L1 составило 2330 нг /мг ОРБ.

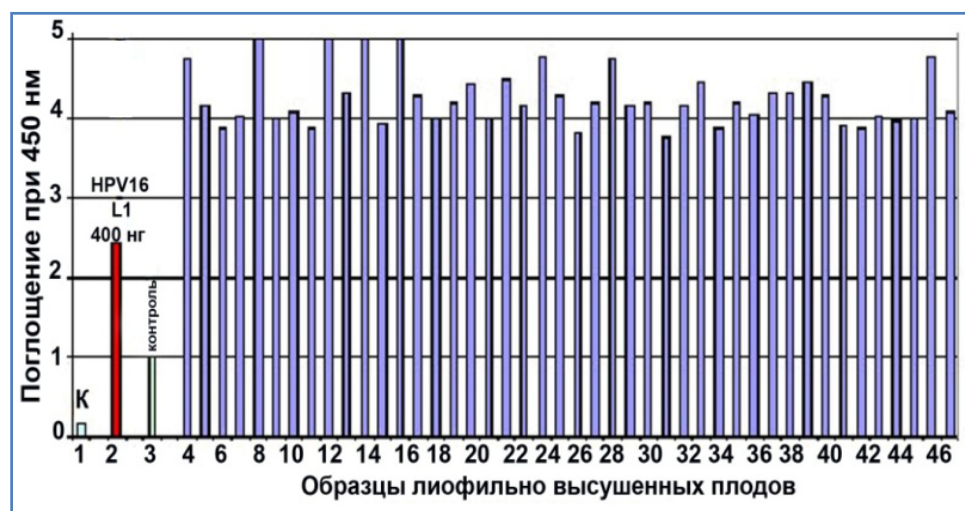


Рис. 4. ИФА содержания антигенного белка HPV16 L1 в экстрактах плодов трансгенного по гену *hpr16* L1 томата после трансформации суспензией *A. tumefaciens* ЕНА105 с рVINHPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ в течение 15 суток. К - отрицательный контроль, 2 - 400 нг стандарта HPV16 L1, 3 - контроль, нетрансформированные плоды, 4-47 - экстракты лиофильно высушенных плодов трансгенного томата.

Использование омега лидера ВТМ позволило нам увеличить выход антигенного белка примерно на 1,5-2 порядка по сравнению с нашими работами, в которых омега лидер не был включен в генетическую конструкцию [Salyaev et al., 2009]. С другой стороны, было получено поколение T₁, что может дать возможность получения стабильно экспрессирующих антигенный белок L1 в трансгенных по гену *hpr16* L1 растениях томата.

Второй путь интенсификации синтеза антигенного белка HPV16 L1 включал создание генетической конструкции с RdRP CMV (РНК2а репликазой вируса мозаики огурца), в состав которой входила последовательность белка РНК2b, который известен как: эффективный антисайленсер [Hao et al., 2011]. В этом случае продукция антигенного белка HPV16 L1 достигала 200000 нг/мг ОРБ. Но это была транзистная трансформация, и семена этих трансформированных плодов не давали всходов. Поэтому наследование в поколениях при участии RdRP элементов невозможно.

Таким образом, использование вирусных регуляторных элементов может быть перспективным для интенсификации синтеза гетерологичных белков в растительных экспрессионных системах.

Литература

Agalarov S.A., Sogorin E.A., Shirokikh N.E., Spirin A.S. In sight into structural organization of the omega leader of TMV RNA: the role of various regions of the sequence in the formation of a compact structure of the omega RNA // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – V. 404, No. 1. – P. 250–264.

Goelet P., Lomonosoff G.P., Butler P.J.C., Akam M.E., Gait M.J., Karn J. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – V. 79. – P. 5818–5822.

Hao X., Lu A., Sokal N., Bhagwat B., Leung E., Mao R., Reade R., Wu Y., Rochon D'A., Xiang Y. *Cucumber necrosis virus* p20 is a viral suppressor of RNA silencing // Virus Research. – 2011. – V. 155. – P. 423–432.

Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S., Hammond R.W., Shchelkunov S.N. Retention of the ability to synthesize HIV-1 and HBV antigens in generations of tomato plants transgenic for the TBI-HBS gene // Doklady Biochemistry Biophysics. – 2009. – V. 425, No. 1. – P. 120–123.

Sugiyama T., Itoh T. Control of ColE2 DNA replication: *in vitro* binding of the antisense RNA to the Rep mRNA // Nucleic Acid Res. – 1993. – V. 21, No. 25. – P. 5972–5977.

ABOUT THE METHODS OF THE INTENSIFICATION OF THE SYNTHESIS OF ANTIGENIC PROTEINS WITH USING PLANT VIRUS REGULATORY ELEMENTS AT THE DEVELOPMENT OF INNOVATIVE VACCINES ON THE BASE OF PLANT EXPRESSION SYSTEMS

N.I. Rekoslavskaya^{1,2}, R.K. Salyaev¹, A.S. Stolbikov¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

²Irkutsk Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

Abstract. To enhance the synthesis of antigenic protein HPV16 L1 of high-risk oncogenic type papillomavirus 16, the plant expression synthesis was used on the base of transgenic tomato fruit. To create stable transformation, the genetic construct pBINHPV16 L1 Ω 5'UTR TMV was used that provided the yield of HPV16 L1 up to 2330 ng per 1 mg of total soluble protein (TSP). For transient expression, the genetic construct pBIN p35S RdRP CMV (RNA 2 a,b) HPV16 L1 was developed that included the antisilencing protein 2b. In this case the yield of antigenic protein HPV16 L1 was risen to 200000 ng per mg TSP.

Keywords: *high-risk oncogenic type 16 of papillomavirus, HPV16 L1, omega leader TMV, RdRP CMV*

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ МИНДАЛЯ ТРЕХЛОПАСТНОГО (*PRUNUS TRILOBA* LINDL.)

А.В. Рудиковский, К.З. Гамбург

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, rudikovallex@mail.ru, gamburg@sifibr.irk.ru

Аннотация. Разработан протокол клонального микроразмножения высоко декоративного растения – миндаля трехлопастного. Успешное размножение было достигнуто с использованием питательной среды, содержащей ½ минеральных солей МС, 2% сахарозы, тиамин 1, пиридоксин 0.5, никотиновая кислота 0.5, БАП 0.5, ИМК 0.1, агар 6000 мг/л. Укорененные стебельки адаптировали к условиям теплицы в стерильных контейнерах со стерильными торфяными таблетками в течение двух недель, а затем подращивали в теплице. Рассадку выращивали в открытом грунте в течение двух лет, после чего они были пригодны для озеленения.

Ключевые слова: *Prunus triloba* Lindl., клональное микроразмножение

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1353-1357

Луизеания трехлопастная (*Prunus triloba* Lindl.) – это декоративное кустовое растение, которое обильно цветет в течение двух недель до распускания листьев. Махровая форма (*Louiseania triloba* (Lindl.) Pachom. f. plena) еще более декоративна (рисунок). Она была впервые обнаружена в Китае в 1851 году [Lu, Bartolomew, 2003]. Произрастает в Китае и Северной Корее в горных лесах на высоте 600-2000 м. В настоящее время она широко используется как высоко декоративное растение во многих странах [Kalinina, Brown, 2007; Глаз и др., 2014].



Рисунок. Цветущая луизеания.

Луизеанию размножают семенами, зелеными черенками, отводками и прививками [Kalinina, Brown, 2007; Глаз и др., 2014]. Однако такое размножение требует больших

трудовых затрат и много времени. Кроме того, махровая форма не образует семян, и ее черенки практически не способны к укоренению. Клональное микроразмножение можно было бы использовать вместо способов, указанных выше, но оно было описано только в одной публикации [Kalina, Brown, 2007], и неизвестно, годится ли этот протокол для махровой формы и для условий нашего региона.

Исходные растения были доставлены в Иркутск из Ботанического Сада–Института Дальневосточного Научного Центра РАН (Владивосток) и распространились на частных участках путем прививки на песчаную вишню (*Prunus tomentosa* (Thunb.) Wall)).

Исходные вегетативные ветки были взяты в июне 2014 года с растения, показанного на рисунке. Апикальные отрезки длиной 5 см с удаленными листьями промывали водопроводной водой в течение 30 минут, инкубировали в 70%-ном этаноле 30 сек и затем в 0.5% растворе NaOCl с Твин 20 15 мин. После 4-х кратной отмывки стерильной водой апексы длиной 1 см высаживали в пробирки 20×150 мм с 10 мл среды для интродукции (таблица). Пробирки находились 3 дня в темноте и затем переносились в ростовую комнату с 23 °С и освещением 16 часов в сутки люминесцентными лампами с интенсивностью 25 μmol photons m⁻² s⁻¹. Появляющиеся конгломераты, состоящие из каллуса и побегов, разделяли на 3-4 части и пересаживали в стеклянные банки для детского питания объемом 200 см³ с 30 см³ питательной среды для размножения (таблица) и культивировали 25-30 дней. После этого проводили следующий цикл размножения.

Для того, чтобы получить достаточно длинные побеги, культивирование, предшествующее укоренению, проводили на среде без БАП. Отделенные побеги длиной 1.5-2 см укореняли на среде для укоренения (таблица).

Таблица.

Питательные среды для культивирования луизеани *in vitro*

Компоненты (мг дм ⁻³)	Интродукция	Размножение	Укоренение
МС*	1	1/2	WPM
Сахароза	30000	20000	30000
Тиамин	1	1	1
Пиридоксин	0.5	0.5	0.5
Никот. к-та	0.5	0.5	0.5
БА**	0.25	0.5,	0
ИМК**	0.25	0.05	0.5
ГК**	0.1	0	0
ДТТ	5	0	0
ДЭДТК**	0	5	5
Агар	7000	6000	6000

*минеральные соли среды Мурашиге и Скуга [Murashige, Skoog, 1962; Lloyd, McCown, 1980]; **БА – N6-бензиладенин, ДТТ – дитиотреитол (вносили после автоклавирования), ИМК – 3-индолилмасляная кислота, ГК – гибберелловая кислота, ДЭДТК – диэтилдитиокарбамат натрия – антиоксидант.

Укорененные побеги высаживали в стерилизованные торфяные таблетки (“gi-fi”, диаметр 24 мм), увлажненные солевой средой ½ WPM, помещали в стерильные сосуды “Magenta-G7” (Sigma-Aldrich) и культивировали в ростовой комнате 10-15 дней. Растения адаптировали к наружному воздуху, открывая крышки сосудов, постепенно увеличивая продолжительность открывания. Адаптированные растения пересаживали в пластиковые стаканы с грунтом объемом 200 см³ и культивировали в теплице при

естественном освещении. Через 15-20 дней полученную рассаду переносили в открытый грунт.

При размножении луизеании *in vitro* происходило образование и увеличение размеров конгломератов, состоящих из каллуса, множества мелких регенерантов и некоторого числа регенерантов с удлинённым стеблем. При этом оказалось, что уменьшение концентрации солей среды МС в 2 раза способствует лучшему образованию одиночных удлинённых стеблей. Некоторая часть конгломерата отмирала в ходе культивирования и приобретала бурю окраску. Новые регенеранты возникали в основном на той части конгломерата, которая была погружена в питательную среду. Иногда на этой же части появлялись корни, которые не были связаны напрямую со стеблевыми регенерантами.

Показано что в отсутствие БА у конгломератов имелось некоторое число удлинённых стеблей, значительная часть конгломератов была некротизирована (до 80%), регенеранты в агаре отсутствовали, и в 8 культуральных сосудах, в которые было высажено по 2-3 эксплантата, появился лишь один корень. Это позволяет считать, что в отсутствие БА размножение луизеании не может происходить.

При введении БА в питательную среду число удлинённых регенерантов увеличивалось, а отмирание в конгломератах уменьшалось, и происходило новообразование регенерантов в агаре. Значимое различие между концентрациями БА наблюдалось в отношении новообразования регенерантов, которое было выше при 0.5 мг/л. При 0.25 мг/л БА происходило образование 3-х корней на 9 сосудов, а при 0.5 мг/л БА корни не появлялись. Можно сделать вывод, что для размножения луизеании 0.5 мг/л БА предпочтительнее по сравнению с 0.25 мг/л. Более высокая концентрация БА (1 мг/л) подавляла удлинение одиночных стеблей в конгломератах и не использовалась в дальнейшем для размножения луизеании.

Оптимизация среды для укоренения. Для получения корней стебли длиной 1 см и более, образовавшиеся на среде для размножения, срезали и высаживали по 4-5 штук в банки с 30 мл среды для укоренения, в которую была включена ИМК (0.5 и 1 мг дм⁻³), а БА был исключен (таблица). На среде без ИМК на стеблях корни не появлялись. Через 16 дней после высадки на эти среды более 60% стеблей образовывали корни при обеих концентрациях ИМК. Это несколько слабее, чем у других растений, где % укоренения достигал 95-100%. Отчетливая разница наблюдалась по числу корней на 1 стебель, где преимущество концентрации ИМК 0.5 мг/л было статистически значимым при $p < 0.05$. Разница по длине корней также была в пользу концентрации 0.5 мг/л, но она была недостаточно значимой.

Оптимизация условий для акклиматизации. Неоднократные попытки провести акклиматизацию укоренённых *in vitro* стеблей в нестерильном грунте оказались неудачными, потому что большинство высаженных растений заплесневали и погибали. Kalinina, Brown [2007], по-видимому, тоже столкнулись с этой проблемой. Вероятно, поэтому они проводили адаптацию выращенных *in vitro* растений в стерильных условиях в сосудах "Magenta" с вермикулитом. Мы тоже решили применить такой способ адаптации. Акклиматизированные растения продолжали вегетировать и в дальнейшем при пересадке в нестерильный грунт и пересадки в открытый грунт. Особенностью полученных растений явилось то, что они долго не удлинялись и с трудом осуществляли новообразование листьев. Лишь к концу вегетационного периода они превращались в одностебельные растения со стеблями длиной 25-40 см. Следует отметить, что конечный выход стеблевых грунтовых растений составлял 25-30% от числа стеблей, использованных для укоренения. Тем не менее, и этот результат можно считать удовлетворительным. Возможно, в дальнейшем можно будет подобрать условия для более эффективного укоренения и акклиматизации.

Большинство растений успешно перезимовали и продолжили расти на следующий год. Весной 2017 года были высажены на постоянное место.

В результате проведенного изучения мы установили, что луизеанию махровой формы можно размножать на среде, содержащей $\frac{1}{2}$ минеральных солей МС, 2% сахарозы, тиамин 1, пиридоксин 0.5, никотиновая кислота 0.5, БАП 0.5, ИМК 0.1, агар 6000 мг/л. Укоренение образовавшихся стеблевых регенерантов происходило успешно на среде WPM с ИМК 0.5 мг/л. Первоначальный этап акклиматизации необходимо было проводить в стерильных контейнерах со стерильными торфяными таблеткам (“gifi”), увлажненными половинной дозой солей WPM в течение двух недель. После этого адаптированные растения превращались в рассаду, пригодную для высадки в открытый грунт. Растения успешно пережили зиму 2016-2017 гг. и некоторые из них даже зацвели весной.

Особенностью луизеании явилось то, что при превращении культивируемых *in vitro* укорененных стебельков в рассаду они долго оставались в виде розетки листьев, и стебли не удлинялись. Удлинение стебля начиналось лишь после высадки в открытый грунт во второй половине лета. Выдерживание рассады, полученной в сентябре, в холодном погребе в течение зимы приводило к появлению способности к удлинению стебля весной. Можно полагать, что получаемые в культуре *in vitro* растения не получают полноценных условий для выхода апикальной меристемы из состояния покоя. Отсюда следует вывод, что проводить укоренение *in vitro* и получать рассаду в горшках желательно ближе к осени. Это позволит дать растениям холод в течении зимы и выйти из состояния покоя к весне. Тогда они будут активно расти в течение лета.

Известно, что зеленые и одревесневшие черенки луизеании плохо укореняются [Reighard et al., 1990]. Особенно это характерно для ее махровой формы. Поэтому в большинстве случаев ее прививают на различные подвои, в частности на войлочную вишню (*Prunus tomentosa*). Кроме того, прививка на этот подвой придает растениям устойчивость к вымоканию, которой луизеания не обладает. Однако в случае гибели надземной части возобновление растения происходит за счет подвоя, и его приходится удалять. Укоренение луизеании *in vitro* позволяет получать корнесобственные растения, а устойчивость к вымоканию можно обеспечивать другими методами. Важно отметить, что уже сейчас описанный в этой статье метод применим для промышленного размножения луизеании для зеленого строительства в населенных пунктах страны.

Литература

Глаз Н.В., Раздобреева В.А., Рязанцева А.А. Изучение развития луизеании в Ботаническом саду ТОГУ// Ученые заметки ТОГУ – 2014.– Т. 5, № 2. – С. 58–65.

Kalinina A., Brown C.W. Micropropagation of ornamental *Prunus* spp. and GF305 peach, a *Prunus* viral indicator // Plant Cell Reports. – 2007. – V. 26, No. 7. – P. 927–935.

Lu L.T., Bartolomew B. 3. *Amygdalus triloba* (Lindley) Ricker // Flora of China. — 2003. – V. 9. – P. 392–393.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. – 1962. – V. 15. – P. 473–497.

Reighard G.L., Cain D.W., Newall, Jr.W.C. Rooting and survival potential of hardwood cuttings of 406 species, cultivars, and hybrids of *Prunus* // Hortscience. – 1990. – V. 25, No. 5. – P. 517–518.

CLONAL MICROPROPAGATION OF *PRUNUS TRILOBA* LINDL. (FLOWERING ALMOND)

A.V. Rudikovskii, K.Z. Gamburg

Siberian institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, rudikovalex@mail.ru, gamburg@sifibr.irk.ru

Abstract. The protocol for clonal micropropagation of one very attractively flowering representative of almond species – *Prunus triloba* Lindl was elaborated. Successful micropropagation was achieved on the medium containing half-dose MS salts, 2% sucrose, thiamin 1, pyridoxine 0.5, nicotinic acid 0.5, N⁶-benzylaminopurin (BAP) 0.5, 3-indolylbutyric acid (IBA) 0.1 mg·dm⁻³. Single shootlets were rooted with the use of the medium containing half-dose WPM salts, 2% sucrose, thiamin 1, pyridoxine 0.5, nicotinic acid 0.5 and IBA 0.5 mg·dm⁻³. Rooted shootlets were weaned in sterile containers with sterilized peat tablets (“gi-fi”) watered with half-dose WPM salts for two weeks and then transformed to transplants by growing them in 200 cm³ pots in the greenhouse. The transplants were grown in the field during following two years and they were ready for greening after that.

Keywords: *Prunus triloba* Lindl, clonal micropropagation

СЕКРЕТОМЫ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР ГРЕЧИХИ С РАЗНОЙ МОРФОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Н.И. Румянцева¹, А.Н. Акулов^{1,2}, А.В. Лайков², Е.А. Гумерова¹, Ю.А. Костюкова¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, Россия

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия, alexander.laykov@yandex.ru

Аннотация. Проведен сравнительный анализ секретомов морфогенной (МСК) и неморфогенной (НСК) суспензионных культур *Fagopyrum tataricum*. Сделан вывод о том, что состав белков секретомы зависит от степени дифференцированности суспензионной культуры и, в целом, отражает ее физиолого-биохимические особенности.

Ключевые слова: гречиха татарская, морфогенная и неморфогенная суспензионная культура, экстраклеточные белки, идентификация белков, классификация белков

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1358-1362

Основная стратегия, позволяющая растениям адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды, заключается в изменении метаболизма, активации или синтезе защитных соединений различной природы, локализуемых в основном апопластно, т.е. в периплазматическом пространстве, клеточных стенках и на поверхности клеток. Белки, секретируемые в апопласт, могут формировать первую линию защиты в ответ на действие биотических и абиотических стрессоров, поэтому секреторные процессы обуславливают одну из важнейших функций при взаимодействии растений с окружающей средой. Цель работы состояла в сравнительном изучении секретомов морфогенной (МСК) и неморфогенной (НСК) суспензионных культур *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn – дикого вида гречихи, отличающегося высоким содержанием биологически активных флавоноидов. Сведения о секретоме сем. *Polygonaceae* в литературе отсутствуют.

Суспензионные культуры гречихи татарской были получены из морфогенного и неморфогенного каллусов как описано ранее [Румянцева и др., 2004; Гумерова и др., 2015]. Экстраклеточные белки выделяли на четвертые сутки пассажа, в фазу наиболее активного деления клеток. Среду культивирования отделяли от клеток и их обломков фильтрацией через Miracloth, центрифугировали и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, а затем лиофильно высушивали. Лиофилизат использовали для выделения белков фенольным методом, белки трипсинолизировали и анализировали с помощью HPLC-MS/MS. Для получения масс-листов масс-спектры обрабатывали в программе DataAnalysis 4.1. Белки идентифицировали по масс-листам с помощью программы Mascot 2.4.0, используя базу данных белковых последовательностей, полученную на основе полногеномного РНК-секвенирования *F. tataricum* (предоставлена М.Д. Логачёвой, МГУ). Белки считали достоверно идентифицированными при score выше 28. Переидентификацию белков и аннотирование делали по протеомной базе UniProtKB и литературным данным. Белки анализировали на присутствие С- и N- концевых гидрофобных доменов, а также трансмембранных доменов, используя следующие информационные ресурсы SignalP, Phobius, PrediSi, PredGPI, GPI-SOM, TMHMM; для анализа субклеточной локализации: TargetP 1.1, WoLF PSORT; белки классифицировали по биологическим и молекулярным функциям.

Нами показано, что МСК секретирует в 8-9 раз больше белков по сравнению с НСК. Ранее было установлено, что морфогенные культуры содержат в 2-2,5 раза больше внутриклеточных растворимых белков по сравнению с неморфогенными [Румянцева и др., 2004; Акулов и др., 2010]. При использовании проточной цитофлуометрии выявлено, что содержание ДНК в большинстве ядер морфогенных культур гречихи татарской преимущественно соответствует диплоидному числу хромосом, в то время как в неморфогенных оно варьирует от 4С до 64С, что соответствует полиплоидным наборам хромосом [Betekhtin et al., 2017]. Тем не менее, несмотря на увеличение числа хромосом и, соответственно, содержания ДНК в ядре, НСК секретирует гораздо меньше белков по сравнению с МСК. Нами идентифицировано 226 экстраклеточных белков МСК и 136 экстраклеточных белков НСК. Установлено, что содержание белков с N-концевым сигнальным пептидом в секретах МСК и НСК составляет 40,3% и 52,2%, соответственно. В обеих культурах значительную часть экстраклеточных белков, не имеющих N-концевого сигнального пептида, представляют многофункциональные (moonlighting) белки. Это наиболее “древний” класс белков, которые помимо энзиматической функции, выполняемой в одних компартментах, могут осуществлять другие, неэнзиматические функции (например, функции шаперонов, рецепторов, адгезинов) при перемещении в другие компартменты клетки, в том числе и экстраклеточный матрикс [Jeffery et al., 2016]. К ним относятся белки, вовлеченные в гликолиз (например, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, енолаза, пируваткиназа), цикл трикарбоновых кислот (аконитаза, изоцитратдегидрогеназа), факторы элонгации, некоторые антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза). Кроме того, среди белков, не имеющих N-концевого сигнального пептида, были выявлены антиоксидантные ферменты (глутатион-S-трансферазы, каталаза, глутатионредуктаза), шапероны (белки теплового шока, 14-3-3 белки, калретикулин, кальмодулин), а также сериновые и аспарагиновые эндопептидазы, ингибиторы сериновых протеаз. Ортологи этих белков были обнаружены в секретах других растений [Pechanova et al., 2010, Gupta et al., 2011; Hafidh et al., 2016]. Полученные результаты указывают на вклад неклассической секреции белков в формирование секрета суспензионных культур *F. tataricum*.

Отмечено, что неклассически секретируемые белки присутствуют во всех изученных секретах растений [Krause et al., 2013; Delaunoy et al., 2014]. В секрете пыльцевых трубок [Hafidh et al., 2016] и в экссудатах кончиков корней [Wen et al., 2007] их содержание достигает 80%. Большее содержание белков без сигнального пептида в МСК по сравнению с НСК может свидетельствовать о том, что процессы дифференцировки в растениях (в случае МСК – формирование проэмбриональных клеточных комплексов-ПЭКК), так же как и в животных, сопряжены с неклассической секрецией белков.

Согласно классификации по биологическим функциям, наибольшую долю в секретах как МСК, так и НСК формируют белки, вовлеченные в углеводный метаболизм (с преобладанием белков клеточной стенки) (рис.1). Отличительной чертой секрета МСК по сравнению с секретом НСК является большая доля белков, участвующих в метаболизме белков и поддержании редокс гомеостаза (рис. 1). При этом основную часть защитных белков секрета НСК составляют шапероны (белки теплового шока), а МСК – протеазы, а также ингибиторы протеаз и полигалактуроназ. Высокое содержание протеаз в секрете МСК может быть обусловлено их разнообразной активностью, связанной не только с защитой клеток хозяина от чужеродных белков, но и вовлечением в процессинг белков, выделение биоактивных пептидов, шеддинг белков с поверхности клеток [Guerra-Guimarães et al., 2016]. Преобладающую часть класса белков с сигнальными функциями в секрете НСК

составляют шапероны, в то время как в классе сигнальных белков МСК шапероны и протеинкиназы представлены одинаково. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о том, что морфогенные культуры гречихи татарской имеют более активный белковый метаболизм и содержат больше внутриклеточных белков по сравнению с неморфогенными культурами [Румянцева и др., 2004; Акулов и др., 2010]. Нами было также показано, что морфогенные культуры более устойчивы к различным стрессовым воздействиям по сравнению с неморфогенными, что объясняется высокой активностью антиоксидантных ферментов, а также большим содержанием ферментативных антиоксидантов, таких как фенольные соединения и восстановленный глутатион [Нигматуллина и др., 2014; Akulov et al., 2018]. Согласно классификации по молекулярным функциям основу секретомов в обеих культурах составляют ферменты, из них гидролазы и оксидоредуктазы представляют наиболее крупные классы (рис. 2). Основное отличие состоит в том, что класс связывающих белков в секретоме НСК более значителен, чем в МСК и представлен, в основном, шаперонами.

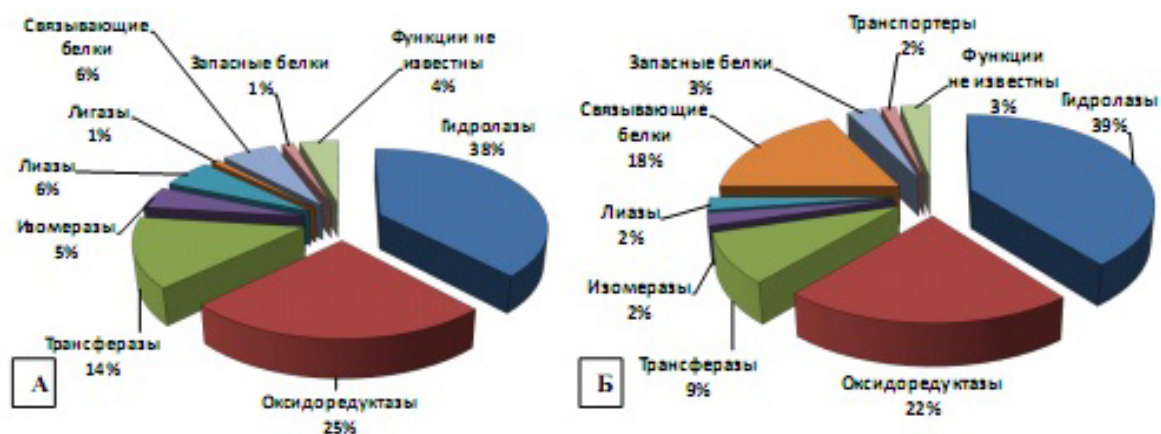


Рис. 1. Классификация экстраклеточных белков суспензионных культур *Fagopyrum tataricum* по биологическим функциям. А – морфогенная суспензионная культура; Б – неморфогенная суспензионная культура.

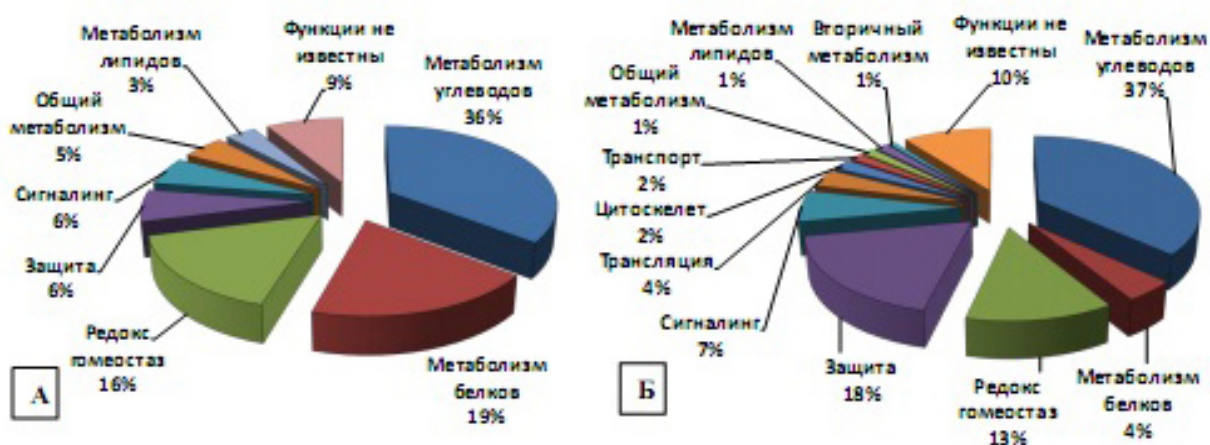


Рис. 2. Классификация экстраклеточных белков суспензионных культур *Fagopyrum tataricum* по молекулярным функциям. А – морфогенная суспензионная культура; Б – неморфогенная суспензионная культура.

Таким образом, нами впервые проведено изучение секретомы гречихи татарской. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что состав секретомы зависит от степени дифференцированности суспензионной культуры и, в целом, отражает ее физиолого-биохимические особенности. Изучение состава и динамики экстраклеточных белков в норме и при определенных стрессовых нагрузках может способствовать выявлению новых механизмов защиты растений, а также биомаркеров для создания или отбора форм растений, устойчивых к стрессорам различной природы.

Литература

Акулов А.Н., Скрипников А.Ю., Румянцева Н.И. Экспрессия 1-цис пероксиредоксина в морфогенных и неморфогенных каллусах гречихи татарской // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – С. 433–440.

Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Румянцева Н.И. Влияние метилжасмоната на ростовые характеристики суспензионной культуры гречихи татарской и накопление в ней фенольных соединений // Физиология растений. – 2015. – Т. 62. – С. 212–221.

Нигматуллина Л.Р., Румянцева Н.И., Костюкова Ю.А. Влияние D,L-бутионин-S,R-сульфоксимины на соотношение форм глутатиона и рост каллусов гречихи татарской // Онтогенез. – 2014. – Т. 45. – С. 50–62.

Румянцева, Н.И., Акулов А.Н., Мухитов А.Р. Экстраклеточные полимеры в каллусных культурах *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. с разной морфогенной активностью: динамика в ходе культурального цикла // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40 – С. 571–578.

Akulov A.N., Gumerova E.A., Rumyantseva N.I. Cell cultures of *Fagopyrum tataricum* as a source of biologically active phenolic compounds // Buckwheat Germplasms in the (eds. World. M. Zhou, I. Kreft, G. Suvorova et al.). – Elsevier: Academic press, 2018. – P. 259–270.

Betekhtin A., Rojek M., Jaskowiak J., Milewska-Hendel A., Kwasniewska J., Kostyukova Y., Kurczynska E., Rumyantseva N., Hasterok R. Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. // PLoS One. – 2017. – V. 12. – doi.org/10.1371/journal.pone.0173537.

Delaunoy B., Colby T., Belloy N., Conreux A., Harzen A., Baillieul F., Clément C., Schmidt J., Jeandet P., Cordelier S. Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes // Plant Biol. – 2013. – V. 8 – P. 13–24.

Guerra-Guimarães L., Pinheiro P., Chaves I., Barros D.R., Ricardo C.P. Protein dynamics in the plant extracellular space // Proteomes. – 2016. – V. 4. – doi:10.3390/proteomes4030022.

Gupta S., Wardhan V., Verma S., Gayali S., Rajamani U., Datta A., Chakraborty S., Chakraborty N. Characterization of the secretome of chickpea suspension culture reveals pathway abundance and the expected and unexpected secreted proteins // J. Proteome Res. – 2011. – V. 10. – P. 5006–5015.

Hafidh S., Potěšil D., Fíla J., Čapková V., Zdráhal Z., Honys D. Quantitative proteomics of the tobacco pollen tube secretome identifies novel pollen tube guidance proteins important for fertilization // Genome Biology. – 2016. – V. 17. – P. 1–29.

Jeffery C.J. Protein species and moonlighting proteins: Very small changes in a protein's covalent structure can change its biochemical function // J. Proteomics. – 2016. – V. 134. – P. 19–24.

Krause C., Richter S., Knöll C., Jürgens G. Plant secretome - from cellular process to biological activity // Biochimica et Biophysica Acta. – 2013 – V. 1834. – P. 2429–2441.

Pechanova O., Hsu C.Y., Adams J.P., Pechan T, Vandervelde L., Drnevich J., Jawdy S., Adeli A., Suttle J.C., Lawrence A.M., Tschaplinski T.J., Séguin A., Yuceer C. Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar // BMC Genomics. – 2010. – V. 11. – P. 674.

Wen F., VanEtten H.D, Tsaprailis G., Hawes M.C. Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates // Plant Physiol. – 2007. – V. 143. – P. 773–783.

SECRETOMES OF BUCKWHEAT SUSPENSION CULTURES WITH DIFFERENT MORPHOGENIC ACTIVITY

N.I. Rumyantseva¹, A.N. Akulov^{1,2}, A.V. Laykov², E.A. Gumerova¹, Yu.A. Kostyukova¹

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia, nat_rumyantseva@mail.ru

²Kazan University, Kazan, Russia, alexander.laykov@yandex.ru

Abstract. Secretomes of morphogenic (MSC) and non-morphogenic (NSC) suspension cultures of *Fagopyrum tataricum* were compared. We concluded that the composition of secretomes depend on the degree of differentiation of cells and reflect their physiological and biochemical characteristics.

Keywords: *tartary buckwheat, morphogenic and non-morphogenic suspension cultures, extracellular proteins, protein identification, protein classification*

ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ *IN VITRO* У ЯЧМЕНЯ

О.А. Сельдимирова, Н.Н. Круглова, И.Р. Галин, Д.С. Веселов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уфимский Институт биологии Российской академии наук, Уфа, Россия, o_seldimirova@mail.ru

Аннотация. Изучено влияние концентраций эндогенных фитогормонов (ИУК, АБК и цитокининов) на соматический эмбриогенез *in vitro* в каллусах ячменя сорта Steptoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34. Установлено, что каллусы, способные к соматическому эмбриогенезу *in vitro*, характеризовались повышенным уровнем содержания эндогенной ИУК по отношению к другим гормонам. Показана определяющая роль баланса эндогенных ИУК и АБК в эмбриогенной способности каллусов.

Ключевые слова: ячмень *Hordeum vulgare L.*, каллус, соматический эмбриогенез *in vitro*, эндогенные фитогормоны

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1363-1366

Способность каллусов *in vitro* к регенерации растений посредством соматического эмбриогенеза в значительной степени определяет практическую значимость растительных биотехнологий. Известно, что способность каллусов к соматическому эмбриогенезу (СЭ) зависит от многих факторов, важнейший из которых – гормональный. Роль подбора оптимальных концентраций экзогенных фитогормонов в индукции СЭ и повышении эмбриогенной способности каллусов хорошо изучена [Jiménez, Thomas, 2006; Сельдимирова, Круглова, 2015; Nic-Can, Loyola-Vargas, 2016]. В то же время роль эндогенных гормонов в способности клеток каллуса дифференцироваться по пути СЭ исследована недостаточно [Jiménez, Thomas, 2006]. Высказано мнение, что компетентность клеток к СЭ в значительной степени обусловлена количеством и соотношением эндогенных регуляторов роста, однако данные об участии эндогенных фитогормонов в этих процессах весьма ограничены [Dolgikh et al., 2003; Jiménez, Thomas, 2006]. В то же время, выявление взаимосвязи между концентрациями эндогенных гормонов в клетках каллусов с их компетентностью к СЭ позволит расширить диапазон генотипов растений, клонирование которых в культуре *in vitro* основано на феномене эмбриоидогении – формировании зародышеподобных структур – эмбриоидов (соматических зародышей). В связи с этим цель работы заключалась в изучение содержания в каллусах ячменя эндогенных фитогормонов (АБК, ИУК, и цитокининов (ЦК)) и влияния соотношения их концентраций на способность каллусов к СЭ.

Материалом для исследования послужил ячмень сорта Steptoe и его АБК-дефицитный мутант AZ34. Донорные растения выращивали в полевых условиях на экспериментальных участках научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район). В качестве эксплантов для индукции каллуса использовали незрелые зародыши на 13-15 сутки после массового цветения. Для индукции каллусогенеза использовали питательную среду, содержащую макро- и микросоли и витамины по прописи Мурасиге-Скуга [Murashige, Skoog, 1962], дополненную 2.0 мг/л 2,4-Д, а также 0.5 мг/л 6-БАП и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ или 0.5 мг/л 6-БАП, 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ и 0.5 мг/л АБК [Сельдимирова и др., 2017]. Каллусы культивировали в темноте при 26 °С в течение 4 недель. Часть каллусов для индукции СЭ переносили на среду того же состава, но без добавления регуляторов роста и культивировали при 26 °С, 16-часовом фотопериоде, освещении 16000 люкс. Постоянные препараты каллусов, подготовленные по [Световой микроскоп ..., 2013],

анализировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Germany). Оставшуюся часть каллусов анализировали на содержание эндогенных гормонов, которое определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа [Веселов, 1998]. При расчете относительного соотношения количества гормонов за единицу принимали абсолютное значение содержания в каллусах АБК. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программы Microsoft Office Excel 2010. В таблице представлены средние арифметические значения и ошибки средних.

Согласно данным, полученным нами ранее [Сельдимирова и др., 2017], способные к регенерации каллусы ячменя сорта Steptoe были получены при культивировании незрелых зародышей *in vitro* на среде МС, дополненной 0.5 мг/л 6-БАП и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Каллусы АБК-дефицитного мутанта ячменя AZ34, полученные на той же среде характеризовались очень низкой способностью к регенерации, которая значительно повышалась при добавлении в среду для индукции каллусогенеза 0.5 мг/л АБК. Проведенный нами гистологический анализ показал, что регенерация в каллусах ячменя сорта Steptoe осуществляется посредством СЭ (рисунок, а). В каллусах АБК-дефицитного мутанта ячменя AZ34, полученных на среде без добавления экзогенной АБК наблюдается «затухание» процесса СЭ – происходит остановка развития эмбриоидов или формирование эмбриоидов с аномальным строением (рисунок, б). Включение экзогенной АБК в среду для индукции каллусогенеза у AZ34 ведет к нормальному развитию в каллусах эмбриоидов (рисунок, в) и последующей регенерации из них растений.

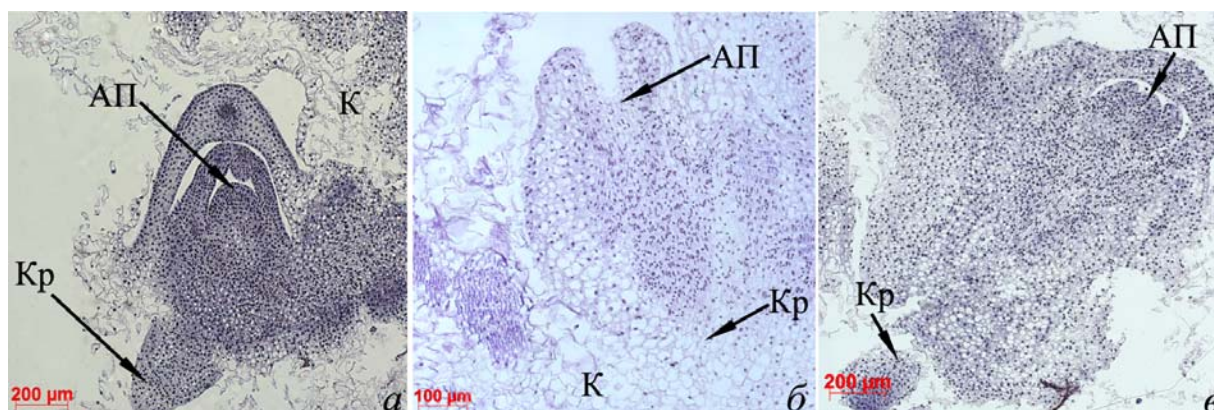


Рисунок. Эмбриониды в каллусах ячменя на 14 сутки культивирования *in vitro* на среде для индукции эмбриоидогенеза. а – сформированный эмбрионид в каллусе ячменя сорта Steptoe; б – эмбрионид в каллусе ячменя AZ34, полученном на среде без добавления экзогенной АБК (видны нарушения в развития корня и апекса побега); в – сформированный эмбрионид в каллусе ячменя AZ34, полученном на среде, дополненной экзогенной АБК. Условные обозначения: АП – апекс побега, К – каллус, Кр – корень.

Данные по содержанию эндогенных фитогормонов в каллусах ячменя приведены в таблице. Из приведенных в таблице данных видно, что ЭК ячменя сорта Steptoe характеризуются относительно высоким уровнем содержания ИУК и низкими уровнями содержания АБК и ЦК (относительное соотношение количества АБК : ИУК : ЦК составило приблизительно 1:7:3). У НЭК АБК-дефицитного мутанта ячменя AZ34, полученных при тех же условиях, что и ЭК родительской формы, но характеризующихся торможением процесса СЭ, было отмечено увеличение содержания ИУК (значительное) и ЦК по отношению к АБК (соотношение АБК : ИУК : ЦК составило приблизительно 1:22:6). ЭК AZ34, полученные на среде с добавлением

АБК, формировали полноценные эмбриониды, а относительное содержание в них АБК:ИУК:ЦК составило приблизительно 1:2:1.

Таблица.

Содержание эндогенных фитогормонов в каллусах ячменя

Тип каллуса	Содержание эндогенных фитогормонов, нг/г сырой массы			Относительное содержание эндогенных фитогормонов		
	АБК	ИУК	ЦК	АБК	ИУК	ЦК
ЭК (Stephoe)	2.7±0.5	19.8±2.4	7.8±1.1	1	7.3	2.9
ЭК (AZ34)*	9.1±1.2	16.0±1.3	6.2±0.8	1	1.8	0.7
НЭК (AZ34)**	1.2±0.2	26.4±2.3	7.7±0.5	1	22	6.4

Условные обозначения: ЭК – эмбриогенный каллус, НЭК – неэмбриогенный каллус, *среда, дополненная экзогенной АБК в концентрации 0.5 мг/л, **среда без добавления экзогенной АБК

Таким образом, полученные нами данные позволяют подтвердить предположение, что ИУК – ключевой эндогенный гормон при индукции СЭ. ЭК, характеризуются более низким соотношением концентраций эндогенных ИУК:АБК по сравнению с НЭК, что совпадает с результатами, полученными другими исследователями [Dolgikh et al., 2003; Jiménez, Thomas, 2006; Zhou et al., 2017]. Такое мнение подтверждается результатами исследований [Dolgikh et al., 2003], показавшими возможность усиления эмбриогенной способности каллусов кукурузы, путем культивирования зародышей на среде для индукции каллусогенеза, содержащей ко-факторы ИУК-оксидазы – пара-кумаровую кислоту или 2,4-дихлорфенол, или в результате обработки зародышей экзогенной АБК.

Увеличение содержания ИУК и ЦК по отношению к АБК в НЭК AZ34 можно также объяснить антагонистическими взаимодействиями АБК и ауксинов/цитокининов [Sun, Li, 2014]. Кроме того, отличия в содержании эндогенной АБК в каллусах AZ34, культивируемых *in vitro* на средах с внесением и без экзогенной АБК наглядно демонстрирует важную роль эндогенной АБК в процессе СЭ, которая достаточно хорошо изучена [Alwael et al., 2017; Zhou et al., 2017 и мн. др.]. Таким образом, в условиях выполненных экспериментов эмбриогенная способность каллусов определяется балансом эндогенных ИУК и АБК. Полученные данные дают возможность искусственного повышения способности к индукции СЭ и в целом к регенерации растений в каллусной культуре *in vitro* злаков.

В работе использовано оборудование ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН. Работа выполнена при частичной поддержке грантом РФФИ №17-04-01477.

Литература

Веселов С.Ю. Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста. – Уфа: БашГУ. – 1998. – 138 с.

Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Н.Н. Круглова, О.В. Егорова, О.А. Сельдиминова, Д.Ю. Зайцев, А.Е. Зинатуллина. – Уфа: Гилем. – 2013. – 128 с.

Сельдиминова О.А., Круглова Н.Н. Баланс эндогенных и экзогенных гормонов и пути морфогенеза в андроклиных каллусах пшеницы *in vitro* // Известия Уфимского НЦ РАН. – 2015. – № 1. – С. 33–39.

Сельдиминова О.А., Круглова Н.Н., Веселов Д.С., Яновская А.А. Оптимизация состава питательной среды для индукции каллусообразования у ячменя сорта Steptoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34 // Биомика. – 2017. – Т. 9, № 4. – С. 298–303.

Alwael H.A., Naik P.M., Al-Khayri J.M. Synchronization of somatic embryogenesis in

date palm suspension culture using abscisic acid // Date Palm Biotechnology Protocols: Volume I. Methods in Molecular Biology (Eds. Al-Khayri J., Jain S., Johnson D.). – Humana Press, New York, 2017. – P. 215–226.

Dolgikh Y.I., Pustovoitova T.N., Zhdanova N.E. Hormonal regulation of somatic embryogenesis on maize // Phytohormones in Plant Biotechnology and Agriculture (Eds. Macháčková I., Romanov G.A.). – Dordrecht: Springer, 2003. – P. 243–247.

Jiménez V.M., Thomas C. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis // Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs: V. 2 (Eds. Mujib A., Šamaj J.). – Berlin, Heidelberg: Springer, 2006. – P. 103–118.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol Plant.* – 1962. – V. 15, No. 3. – P. 473–497.

Nic-Can G.I., Loyola-Vargas V.M. The role of the auxins during somatic embryogenesis // Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications (Eds. Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N.). – Cham: Springer, 2016. – P. 171–182.

Sun J., Li C. Cross talk of signaling pathways between ABA and other phytohormones // *Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling* (Ed. Zhang D.P.). – Dordrecht: Springer, 2014. – P. 243–253.

Zhou X., Zheng R., Liu G., Xu Y., Zhou Y., Laux T., Zhen Y., Harding S.A., Shi J., Chen J. Desiccation treatment and endogenous IAA levels are key factors influencing high frequency somatic embryogenesis in *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook // *Front. Plant Sci.* – 2017. – V. 8. – P. 2054.

INFLUENCE OF ENDOGENOUS PHYTOGORMONOMES ON SOMATIC EMBRYOGENESIS *IN VITRO* IN BARLEY

O.A. Seldimirova, N.N. Kruglova, I.R. Galin, D.S. Veselov

Ufa Institute of Biology of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia,
o_seldimirova@mail.ru

Abstract. The influence of the balance of endogenous phytohormones (IAA, ABA and cytokinins) on somatic embryogenesis *in vitro* in barley cv. Steptoe barley and its ABA-deficient mutant AZ34 was studied. It was established that calli able of somatic embryogenesis *in vitro* were characterized by an increased level of endogenous IAA in relation to other hormones. The determining role of the balance of endogenous IAA and ABA in the embryogenic ability of calli is shown.

Keywords: *barley Hordeum vulgare L., callus, somatic embryogenesis in vitro, endogenous phytohormones*

НЕЙТРАЛЬНЫЕ ЛИПИДЫ ЭМБРИОГЕННЫХ И НЕЭМБРИОГЕННЫХ КАЛЛУСНЫХ ЛИНИЙ *LARIX SIBIRICA* LEDEB.

Н.В. Семёнова, В.Н. Шмаков, Л.В. Дударева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *tashasemyonova@mail.ru*

Аннотация. Показано, что содержание и состав НЛ каллусов лиственницы сибирской с разным эмбрионным потенциалом закономерно различается. Установлено, что для эмбрионных каллусов характерно высокое относительное содержание ТГ и СЖК. Обнаруженные различия в составе и содержании стеридов между разными типами эмбрионных каллусов позволяют предположить, что кампестерин и β -ситостерин участвуют в процессах роста и развития у эмбрионных каллусов, способных к регенерации.

Ключевые слова: Каллусы, нейтральные липиды, *Larix sibirica*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1367-1371

Липиды являются важнейшим структурным, запасным и функциональным компонентом растительных клеток, который обеспечивает работу мембран всех органоидов и дает информацию об активности разных клеточных структур. Содержание липидов и их жирнокислотный состав варьирует в зависимости от вида, внутри вида и в онтогенезе растений. Степень этого варьирования определяется генотипом и зависит от факторов среды [Лось, 2001; Ширшова, 2012]. Известно, что нейтральные липиды и жирные кислоты играют важную роль в росте и развитии культуры *in vitro* [Feirer et al., 1989]. Глицериды являются наиболее доступными запасными источниками энергии, обеспечивающими обменные процессы в растительных организмах. В то же время, физиологическая роль глицеридов не ограничивается функцией резерва энергии. Запасы этих веществ могут служить источником структурных элементов – глицерина, жирных кислот, являющихся исходными продуктами при биосинтезе различных соединений [Алаудинова, 2009]. Так, триглицериды являются запасными липидами, которые легко могут быть вовлечены в катаболизм для получения необходимой клетке для роста и развития энергии, а также для участия жирных кислот в клеточной сигнализации. Поэтому количество и состав жирных кислот и липидов и динамика изменений этих показателей в процессе культивирования оказываются зачастую источником информации к пониманию многих процессов, происходящих в клетке или ткани. Например, β -ситостерин и кампестерин - участвуют в упорядочивании жирнокислотных цепей в мембране, что может влиять на ее проницаемость для воды и ионов. Известно также, что β -ситостерин и стигмастерин играют ключевую роль в клеточной дифференциации и пролиферации [Diener et al., 2000; Carland et al., 2002]. Для выяснения возможного участия нейтральных липидов в процессах дифференциации и последующей регенерации каллусных тканей лиственницы сибирской была предпринята попытка сравнительного анализа содержания нейтральных липидов в клеточных линиях с разным эмбрионным потенциалом. В качестве материала для индукции соматического эмбриогенеза были взяты изолированные зиготические зародыши на стадии инициации семядолей из семян. Полученные в результате индукции клеточные линии лиственницы отличались между собой по пролиферативной активности, по количеству незрелых соматических зародышей внутри эмбриональной массы, а также по возможности получения регенерантов [Третьякова, 2012, 2013]: эмбрионные каллусы – Кл2, Кл6 (зародыши вызревают, получены регенеранты), Кл4, Кл5, Кл10

(зародыши не вызревают) и неэмбриогенные – Кл23 клеточные линии. Липиды экстрагировали по модифицированному методу Фолча. Методом колоночной хроматографии получали фракцию нейтральных липидов. Профиль нейтральных липидов получали методом ТСХ, система гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (80:20:1 v/v/v). Стерины выделяли и идентифицировали с помощью метода ТСХ (Rf, стерин – 0.19). Зону стеринов элюировали хлороформом и дериватизировали их с помощью BSA (Bis(trimethylsilyl)acetamide) и HMDS (Hexamethyldisilazane). Полученные производные анализировали с использованием хромато-масс-спектрометра 5973/6890N MSD/DS Agilent Technologies (США). Относительное содержание ЖК определяли методом внутренней нормализации – в весовых процентах (% вес.) от общего их содержания в исследуемом образце, с учетом коэффициента отклика ЖК.

Ранее нами было установлено, что в ЖК-составе суммарных липидов эмбриогенных и неэмбриогенных каллусов главными насыщенными кислотами были: пальмитиновая (16:0), стеариновая (18:0), арахиновая (C20:0) и бегеновая (22:0). В составе главных ненасыщенных ЖК идентифицированы: олеиновая (C18:1Δ9), линолевая (C18:2Δ9,12), линоленовая (C18:Δ9,12,15) [Макаренко и др., 2016]. Кроме того, были обнаружены необычные ЖК Δ5-серии (таксолеиновая, пиноленовая и скиадоновая (C20:3Δ5,11,14), характерные для хвойных и некоторых других таксонов [Wolff et al., 1998]. Между эмбриогенными и неэмбриогенными линиями выявлены существенные различия по ЖК-составу суммарных липидов. Так, при анализе относительного содержания мононенасыщенных ЖК установлено, что для липидов неэмбриогенных каллусов относительное содержание олеиновой кислоты составляло 12.0–14.8%, в то время как для эмбриогенных, особенно способных к регенерации этот показатель составлял более 50% от суммы кислот [Макаренко и др., 2016]. Возможно, эта кислота выполняет важную метаболическую и/или регуляторную роль при соматическом эмбриогенезе в процессе образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре клеток и тканей. Известно, например, что эта ЖК служит

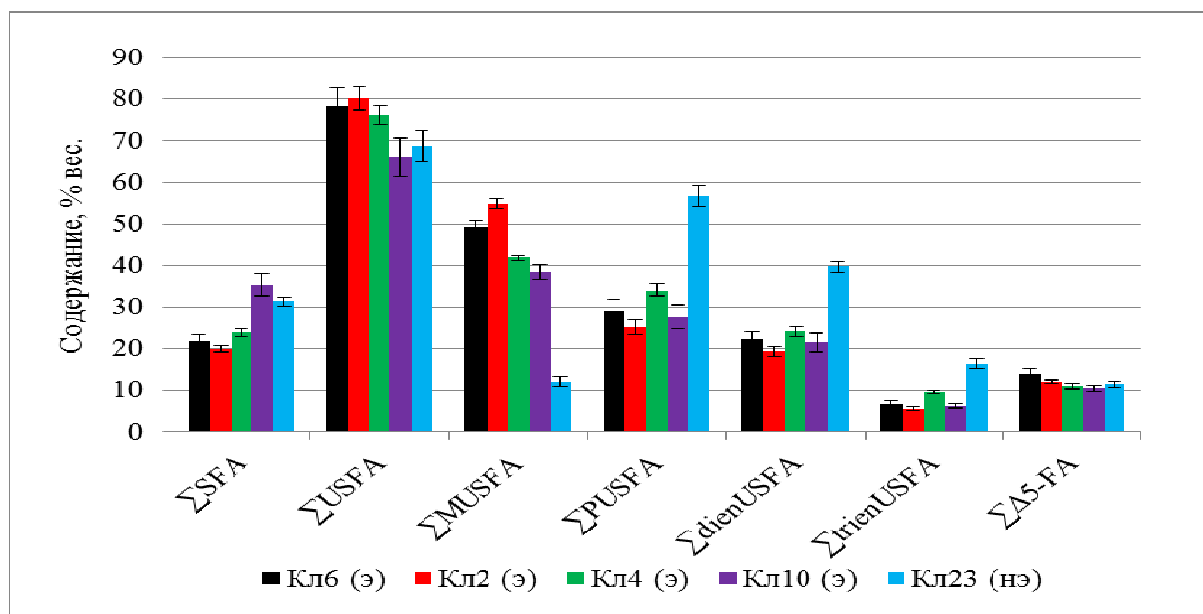


Рисунок. Интегральные параметры ЖК-состава каллусов *Larix sibirica* с разным эмбриогенным потенциалом. Σ_{SFA} – сумма насыщенных ЖК, Σ_{USFA} – сумма ненасыщенных ЖК, Σ_{MUSFA} – сумма мононенасыщенных ЖК, Σ_{PUSFA} – сумма полиненасыщенных ЖК, $\Sigma_{dienUSFA}$ – сумма диеновых ЖК, $\Sigma_{trienUSFA}$ – сумма триеновых ЖК, $\Sigma_{\Delta 5-FA}$ – сумма кислот Δ5-серии.

посредником в передаче сигналов, в том числе в процессах клеточной дифференцировки. Интегральные параметры ЖК-состава каллусов листовницы, которые выявляют роль разных по насыщенности групп ЖК, представлены на рисунке.

В представляемой работе установлено, что в нейтральных липидах каллусов *L. sibirica* высокое содержание мононенасыщенных кислот характерно для эмбриогенных линий, в то время как у неэмбриогенных относительное содержание главной мононенасыщенной олеиновой кислоты было значительно ниже (40-53% отн. против 23% отн., соответственно). Для кислот Δ-5 серии в нейтральных липидах наблюдали в два-три раза более высокое суммарное их содержание у эмбриогенных линий, потенциально способных образовывать регенеранты, по сравнению с неэмбриогенными. Методом ТСХ определили состав нейтральных липидов (таблица).

Таблица.

Состав нейтральных липидов эмбриогенных (э) и неэмбриогенных (нэ) каллусов *Larix sibirica* Ledeb. в мкг на 50 мкг общих липидов

НЛ	Кл2 (э)	Кл6 (э)	Кл4 (э)	Кл10 (э)	Кл23 (нэ)
МГ	1,4±0,6	2,0±0,3	1,5±0,0	1,4±0,0	2,1±0,2
1,2-ДГ	3,2±0,8	2,9±0,2	3,9±0,2	3,3±0,7	2,8±0,7
Стерины	7,6±0,6	7,2±0,1	7,3±0,2	6,8±0,4	7,1±0,0
1,3-ДГ	2,2±0,5	2,6±0,3	2,2±0,2	2,5±0,3	2,0±0,0
СЖК	9,3±2,9	10,3±1,9	8,7±0,2	9,9±1,2	7,1±1,2
ТГ	6,3±1,3	5,4±1,9	6,7±0,8	7,1±0,5	4,6±0,6
МЭЖК	3,1±1,6	3,7±0,0	1,5±0,0	-	3,5±0,5
Эф. Стеринов	2,8±0,2	3,2±0,3	3,3±1,2	2,0±1,3	3,8±0,8
Воска	8,5±1,0	7,0±0,2	8,4±2,3	8,7±1,6	9,5±1,8

Примечание. НЛ – нейтральные липиды, МГ – моноглицериды, ДГ – диглицериды, СЖК – свободные жирные кислоты, ТГ – триглицериды, МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот. В таблице приведены средние арифметические величины трех повторностей и их стандартные отклонения

Как видно из таблицы, для эмбриогенных каллусов характерно высокое относительное содержание триглицеридов (ТГ) и свободных жирных кислот (СЖК), по сравнению с неэмбриогенными. При этом неэмбриогенные каллусы отличались довольно высоким содержанием моноглицеридов (МГ), эфиров стеринов и восков. В рамках представляемой работы был изучен профиль стеринов в каллусах с разным потенциалом эмбриогенности. Показано, что в состав стеринов всех типов каллусов входят: холестерин, кампестерин, стигмастерин и β-ситостерин. β-ситостерин является доминирующим компонентом для клеточных линий всех типов, что является характерным для растительных объектов. В нашем исследовании содержание этого фитостерина в ряде случаев превышало 80%. Обычно, соотношение преобладающих стеринов растений составляет примерно 70% β-ситостерина, 5% стигмастерина и 20% кампестерина [Валитова, 2016]. Нашими экспериментами установлено, что эмбриогенные каллусы, дающие регенеранты, отличались меньшим содержанием стигмастерина, но большим содержанием кампестерина, что указывает на его участие в эмбриогенезе в каллусной ткани *L. sibirica*. Известно, что кампестерин участвует в процессах роста и развития у растений, поскольку снижение его содержания влечет за собой снижение содержания brassinosteroidов, что в свою очередь вызывает торможение роста и развития [Валитова, 2016].

Анализ полученных результатов показывает, что содержание и качественный состав липидов культуры *in vitro* закономерно различается между каллусами с разным эмбриогенным потенциалом. Обнаруженное нами более высокое содержание мононенасыщенных кислот у эмбриогенных каллусов позволяет предположить, что, возможно, они выполняют важную метаболическую и/или регуляторную роль при соматическом эмбриогенезе в процессе образования зародышеподобных структур в культуре клеток и тканей. Известно, что эти ЖК, в первую очередь олеиновая кислота, служат посредниками в передаче сигналов, в том числе в процессах клеточной дифференцировки. Вполне закономерным является и высокое содержание ТГ для эмбриогенных каллусов, так как триглицериды являются запасными липидами, которые легко могут быть вовлечены в катаболизм для получения необходимой клетке для роста и развития энергии, а также для участия жирных кислот в клеточной сигнализации. Различия в стеринном составе указывают на то, что у эмбриогенных каллусов дающих регенеранты активное участие в процессах роста и развития, по-видимому, играют кампестерин и β -ситостерин. Дальнейшее изучение закономерностей изменений липидного состава в ходе эмбриогенеза в культуре *in vitro* позволит выяснить биологическую роль перестроек липидного метаболизма на начальных стадиях формирования зон вторичной дифференцировки.

Литература

Алаудинова Е.В., Миронов П.В. Особенности обмена глицеридов меристем почек *Larix sibirica* Ledeb. // Хвойные бореальной зоны. – 2009. – Т.26 (2). – С. 291–293.

Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минибаева Ф.В. Растительные стерины: многообразие, биосинтез, физиологические функции // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 8. – С. 1050–1068.

Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 163–198.

Макаренко С.П., Шмаков В.Н., Дударева Л.В., Столбикова А.В., Семёнова Н.В., Третьякова И.Н., Константинов Ю.М. Жирнокислотный состав суммарных липидов эмбриогенных и неэмбриогенных каллусных линий лиственницы // Физиология растений. – 2016. – Т. 63, № 2. – С. 267–274.

Третьякова И.Н. Эмбриогенные клеточные линии и соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у лиственницы сибирской // Доклады АН. – 2013. – Т. 450, № 1. – С. 122–125.

Третьякова И.Н., Барсукова А.В. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // Онтогенез. – 2012. – Т. 43, № 6. – С. 1–11.

Ширшова Т.И., Матистов Н.В., Саакян Н.Ж., Петросян М.Т., Попов Ю.Г., Володин В.В. Содержание нейтральных липидов и жирных кислот в листьях интактных растений и каллусных культурах *Ajuga chia* и *A. genevensis* (Lamiaceae) // Раст. ресурсы. – 2012. – Вып. 3. – С. 389–395.

Carland F.M., Fujioka Sh., Takatsuto S., Yoshida Sh., Nelson T. The identification of *CVPI* reveals a role for sterols in vascular patterning // The plant cell. – 2002. – V. 14. – P. 2045–2058.

Diener C.A., Li H., Zhou W., Whoriskey J.W., Nes D.W., Fink. G.R. Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants // The plant cell. – 2000. – V. 12. – P. 853–870.

Feirer R.P., Conkey J.H., Verhagen S.A. Triglycerides in embryogenic conifer calli: a comparison with zygotic embryos // Plant cell reports. – 1989. – V. 8. – P. 207–209.

Wolff R.L., Comps B., Deluc L.G., and Marpeau A.M. Fatty acids of the seeds from pine species of the ponderosa-banksiana and halepensis sections. The peculiar taxonomic position of *Pinus pinaster* // JAOCS. – 1998. – V. 75, No. 1. – P. 45–50.

NEUTRAL LIPIDS OF EMBRYOGENIC AND NON-EMBRYOGENIC CALLUS LINES OF *LARIX SIBIRICA* LEDEB.

N.V. Semenova, V.N. Shmakov, L.V. Dudareva

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *tashasemyonova@mail.ru*

Abstract. The results obtained show that the neutral lipids content and composition of Siberian larch calluses, different by embryogenic potential, naturally differs. It was found that embryogenic callus is characterized by a high relative content of TG and FFA. Differences in the sterols composition and content between different types of embryogenic calluses suggests that campesterol and β -sitosterol are involved in growth and development processes of embryogenic calluses capable of regeneration.

Keywords: *callus, neutral lipids, Larix sibirica*

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ ПОЛЫНИ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ЯКУТИИ

С.В. Сивцева, Ж.М. Охлопкова

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», Якутск, Россия, SV.Sivtseva@mail.ru

Аннотация. Работа посвящена получению и исследованию количественного состава и оценке антибактериальной активности экстракта *Artemisia yacutica*, произрастающей на территории Якутии, по воздействию на рост и развитие некоторых тест-культур. Установлена антибактериальная активность по отношению к кокковой и палочковидной микрофлоре: 1) *A. yacutica* (ЦЯ) в следующем убывающем порядке: *Kl. pneumoniae* 19,7% – *Ps. aeruginosa* 17,66% – *E. coli* 16,4% – *St. aureus* 16,2%; 2) *A. yacutica* (ЮЯ) в следующем убывающем порядке: *E. coli* 18,5% – *Kl. pneumoniae* 17,39% – *St. aureus* на 17,35% – *Ps. aeruginosa* 15,9% по отношению с контролем ДМСО.

Ключевые слова: экстракт, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1372-1374

Введение. Неуклонное расширение спектра внутрибольничных инфекций, рост резистентности болезнетворных микроорганизмов к антибиотикам, высокий уровень заболеваемости способствуют поиску альтернативных средств, обладающих широким спектром антимикробного действия [Макарчук и др., 1990]. Большой интерес для изучения антимикробных свойств представляют экстракты растений. Целебные свойства растений зависят от содержания БАВ, которые разнообразны по своей химической природе и физиологическим действиям [Блинова и др., 1990]. Вторичные метаболиты обладают широким спектром действия, обусловленным различными свойствами. Вторичные метаболиты растений Якутии и их химические свойства активно изучали в начале XX века с целью их выявления региональных особенностей, но эти работы в основном носили поисковый характер [Егоров, 1960; Макаров, 1989; Михайлова и др., 1969; Таран и др., 1989]. В процессе поиска новых перспективных биопрепаратов важным этапом является изучение антибактериальной активности и количественного состава лекарственных растений. В этом плане большой интерес представляют растения из семейства *Asteraceae*, используемые в народной медицине Якутии. Виды *Artemisia* обладают антимикробной и антибактериальной активностью [Михайлова и др., 1969; Шарпапов, 1962; Bauer, Kirby, 1966; Benli et al., 2007].

Цель исследования: установление качественного состава и оценка антибактериальной активности экстракта *Artemisia yacutica*, произрастающей на территории Якутии, по воздействию на рост и развитие некоторых тест-культур кокковой и палочковидной микрофлоры. Для выполнения этой цели ставились следующие задачи: 1) сбор надземной фитомассы объектов исследования на территории Якутии; 2) получение извлечений из надземной фитомассы *A. yacutica* метанольным экстрагированием; 3) анализ экстрактов объектов исследования на содержание основных групп БАВ; 4) апробация биологической активности экстрактов *A. yacutica* по отношению к росту и развитию тест-культур.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись надземные фитомассы *A. Yacutica*, собранные с соблюдением стандарта ГФ в течение периода с июня по август на территории Центральной и Южной Якутии. Экстрагирование проводили в течение 48 часов при периодическом перемешивании. По истечении времени экстракты фильтровали через антибактериальный бумажный фильтр в колбу роторного

испарителя. Концентрирование экстрактов проводили с помощью роторного испарителя «Eyela SA-111 2 cl» в течение 3–4 часов. Сушку концентрированных экстрактов проводили на лиофилизаторе «ModulSpin» в течение 3–4 часов. Для определения качественного состава экстрактов использовали метод ТСХ. На пластины наносили по 3 мкл высушенного и растворенного в малом объеме метанола экстракты.

Результаты исследования. Оценка компонентного состава показывает наличие: флаваноидов, алкалоидов, терпеноидов, сапонинов, кумаринов и коричных кислот, которые установлены качественными реакциями. Экстракт *A. yacutica* представляет собой жидкость коричневого цвета с сильным приятным запахом. Фармакологические свойства *Artemisia* обуславливают содержание эфирных масел и других БАВ, которые обуславливают антибактериальные свойства [Таран и др., 1989; Naq et al., 2011]. Эти данные подтверждаются и в наших исследованиях. Антибактериальную активность экстрактов *A. yacutica* исследовали в отношении кокковой и палочковидной микрофлоры методом культивирования микроорганизмов на среде методом Кирби-Бауэра с модификациями [Ahameethunisa, Hopper, 2010]. В качестве тест-культур использовали: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* BL21 и *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1003. Оценка результатов проводили по наличию или отсутствию зон роста бактерий. Установлена антибактериальная активность по отношению к кокковой и палочковидной микрофлоре: 1) *A. yacutica* (ЦЯ) в следующем убывающем порядке: *Kl. pneumoniae* 19,7% – *Ps. aeruginosa* 17,66% – *E. coli* 16,4% – *St. aureus* 16,2%; 2) *A. yacutica* (ЮЯ) в следующем убывающем порядке: *E. coli* 18,5% – *Kl. pneumoniae* 17,39% – *St. aureus* на 17,35% – *Ps. aeruginosa* 15,9% по отношению с контролем ДМСО.

Таким образом, приведенные выше сведения о качественном анализе компонентного состава и антибактериальной активности вторичных метаболитов на основе экстрактов свидетельствуют о перспективности этих растений в качестве источников новых эффективных лекарственных средств. Эти данные позволят создать достаточную базу для дальнейшего расширения и углубления исследований в этой области наряду с известными данными в настоящее время.

Литература

Блинова К.Ф. и др. Ботанико-фармакогностический словарь: Справ. пособие / Под ред. К.Ф. Блиновой, Г.П. Яковлева. – М.: Высш. шк., 1990.

Егоров А.Д. Химический состав кормовых растений Якутии. – М.: Изд-во АН СССР, 1960.

Макаров А.А. Биологически активные вещества в растениях Якутии. – Якутск: ЯНЦ СО РАН, 1989.

Макарчук Н.М., Лещинская Я.С., Акимов Ю.А. Фитонциды в медицине. – Киев, 1990. – 171 с.

Михайлова Т.Н., Березовская Т.П., Усынина Р.В., Данилевич Л.С. Антимикробные свойства эфирных масел некоторых видов полыней сибирской флоры // Некоторые вопросы фармакогнозии дикорастущих и культивируемых растений Сибири. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1969.

Таран Д.Д. и др. Ранозаживляющие свойства эфирных масел тысячелистника, полыни якутской и хамазулена при напалмовом ожоге // Военно-мед. журн. – 1989. – № 8. – С. 50–52.

Шарапов Н.И. Закономерности химизма растений. – М., Л.: Изд-во АН СССР, 1962.

Ahameethunisa R., Hopper W. Antibacterial activity of *Artemisia nilagirica* leaf extracts against clinical and phytopathogenic bacteria // Complement. Altern. Med. – 2010. – No. 10 (6). – P. 1–9.

Bauer A.W., Kirby W.M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method // Am. J. Clin. Pathol. – 1966. – No. 45 (4). – P. 493–496.

Benli M., Kaya I., Yigit N. Screening antimicrobial activity of various extracts of *Artemisia dracunculus* L. // Cell Biochem. Funct. – 2007. – No. 25 (6). – P. 681–687.

Haq A., Mannan I., Ahmed I., Hussain I., Jamil M., Miza B. Antibacterial activity and brine shrimp toxicity of *Artemisia dubia* extract // Pak. J. Bot. – 2012. – No. 44 (4). – P. 1487–1490.

Kelsey R.G., Shatizadex F. Sesquiterpene lactones and systematics of the systematics of the genus *Artemisia* // Photochemistry. – 1979. – No. 10. – P. 1591–1611.

OBTAINING AND STUDY ACTIVITY EXTRACTS WORMWOOD GROWING ON TERRITORY YAKUTIA

S.V. Sivtseva, Zh.M. Okhlopkova

M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia,
SV.Sivtseva@mail.ru

Abstract. The work is devoted to obtaining and studying the quantitative composition and evaluation of the antibacterial activity of *Artemisia yacutica* extract growing in the territory of Yakutia on the effects on growth and development of some test cultures. Antibacterial activity against coccoid and rod-like microflora has been established: 1) *A. yacutica* (CY) in the following descending order: *Kl. pneumoniae* 19.7% – *Ps. aeruginosa* 17.66% – *E. coli* 16.4% – *St. aureus* 16.2%; 2) *A. yacutica* (SW) in the following descending order: *E. coli* 18.5% – *Kl. pneumoniae* 17.39% – *St. aureus* at 17.35% – *Ps. aeruginosa* 15.9% with respect to DMSO control.

Keywords: *extract, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia*

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ *ELSHOLTZIA CILIATA IN VITRO*

Н.В. Солодухина, М.Ю. Чередниченко

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва, Россия, michael.tsch@gmail.com

Аннотация. Изучено действие различных веществ ауксиновой природы на динамику роста и эффективность укоренения асептических растений эльсгольции реснитчатой (*Elsholtzia ciliata*). По высоте побега большая часть опытных вариантов не отличалась от контроля, однако присутствовали различия по частоте укоренения. Исходя из полученных данных, для клонального микроразмножения можно рекомендовать питательную среду МС с добавлением 1 мг/л индолил-3-масляной кислоты.

Ключевые слова: *Elsholtzia ciliata*, *in vitro*, клональное микроразмножение, динамика роста, укоренение

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1375-1377

Эльсгольция реснитчатая (*Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Nyl.) относится к семейству Яснотковые (Lamiaceae Mart.). Изучение данной культуры *in vitro* связано в основном с анализом биологической активности эфирного масла или экстрактов. При этом мало внимания уделяется получению асептических растений эльсгольции, анализу морфогенеза *in vitro*, а также накоплению ценных вторичных метаболитов в различных системах культивирования.

Фармакологические исследования экстрактов и чистых соединений из *Elsholtzia* охватывают противовирусную, антибактериальную, противовоспалительную, антиоксидантную, а также другие виды активности. Исследователи все чаще касаются фармакологической активности рода Эльсгольция [Lai et al., 2006; Chen et al., 2007; Liu et al., 2008].

Лечебные свойства *E. ciliata* обусловлены ее химическим составом. Наличие витамина С объясняет противовоспалительное, жаропонижающее и регенеративное действие растения, дубильные вещества способствуют вяжущим свойствам эльсгольции, эфирные масла помогают пищеварению и делают растение хорошим ветрогонным средством. Богатый комплекс других биологически активных веществ отвечает за мочегонное, антибактериальное и антимикотическое действие.

Эфирное масло из эльсгольции показало значительное ингибирующее действие против различных групп вируса гриппа (A/PR/8/34 (H1N1), A/Jinan/15/90 (H3N2) and B/Jiangsu/10/2003) [Liu et al., 2007, 2008].

В работе [Liu et al., 2012] была изучена антиоксидантная активность экстрактов и фракций из различных частей *E. ciliata* (соцветия, листья, стебли и корни). Антиоксидантную активность водных экстрактов и фракций *E. ciliata* исследовали с использованием различных модельных систем анализа *in vitro*. На основании полученных результатов экстракты *E. ciliata* могут быть потенциально использованы как готовый доступный и ценный биоактивный источник природных антиоксидантов.

В нашей работе были использованы семена *Elsholtzia ciliata*, любезно предоставленные ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР). После поверхностной стерилизации семян их помещали на питательную среду Мурасиге и Скуга (МС), не содержащую фитогормонов и регуляторов роста. Стерилизация 0,1%-ным раствором хлорида ртути (II) при различных экспозициях оказывала более угнетающее действие на энергию прорастания семян на обеих питательных средах по сравнению со

стерилизацией 5%-ным раствором гипохлорита натрия. По влиянию на всхожесть между двумя стерилизующими агентами различия были меньше, чем в случае энергии прорастания, но всё-таки отмечалась схожая тенденция: стерилизация 5%-ным раствором гипохлорита натрия позволила получить, в среднем, более высокий выход асептических растений *E. ciliata*. При этом всхожесть семян была очень высокая – ок. 99% [Solodukhina, Cherednichenko, 2017].

Асептические растения получали в условиях световой комнаты (21 °С, 16-часовой световой день, освещенность 3000 лк). Микрорастения, образовавшие 3-ю пару настоящих листьев, подвергали клональному микроразмножению и помещали на пять вариантов гормонального состава питательных сред (минеральная основа и витамины во всех вариантах были по прописи МС): (1) без добавления фитогормонов и регуляторов роста, (2) 0,5 мг/л ИУК, (3) 1,0 мг/л ИУК, (4) 0,5 мг/л ИМК, (5) 1,0 мг/л ИМК.

Динамика роста и укоренения асептических растений *E. ciliata* на питательной среде МС с добавлением веществ ауксиновой природы представлена в таблице.

Таблица.

Динамика роста и укоренения растений *E. ciliata* на питательной среде МС с добавлением веществ ауксиновой природы

Гормональный состав питательной среды	Продолжительность культивирования, сут.	Высота побегов (см)	Эффективность укоренения, %
Без гормонов (контроль)	14	1,6 ± 0,5	13,5...14,5
	28	3,1 ± 0,4	18,0 ± 0,7
	42	4,1 ± 0,5	22,0 ± 0,3
0,5 мг/л ИУК	14	1,4 ± 0,2	8,5...9,5
	28	2,5 ± 0,9	12,4...13,6
	42	3,1 ± 1,3	18,0 ± 0,4
1,0 мг/л ИУК	14	1,9 ± 1,2	10,2...11,8
	28	2,8 ± 2,3	16,0 ± 0,7
	42	3,5 ± 2,1	21,0 ± 1,3
0,5 мг/л ИМК	14	1,2 ± 0,6	21,0 ± 1,2
	28	2,0 ± 1,9	38,0 ± 1,0
	42	2,6 ± 0,7	59,0 ± 1,6
1,0 мг/л ИМК	14	1,5 ± 1,0	28,0 ± 1,5
	28	2,6 ± 2,3	46,0 ± 1,3
	42	3,2 ± 1,8	64,0 ± 1,5

Как следует из таблицы, эффективность укоренения выше 50% была получена только на питательной среде МС с добавлением ИМК, при этом добавление 1 мг/л данного вещества приводило к лучшему эффекту, чем добавление 0,5 мг/л ИМК. При добавлении 0,5 мг/л ИУК укоренение происходило хуже, чем на безгормональной среде, вариант с 1 мг/л ИУК существенного не отличался от контрольного варианта.

По высоте побега большая часть опытных вариантов не отличалась от контроля (выращивание на питательной среде МС без добавления фитогормонов и регуляторов роста), а вариант с добавлением 0,5 мг/л ИУК даже уступил контролю по этому показателю.

Исходя из изложенного выше, для клонального микроразмножения *E. ciliata* можно рекомендовать питательную среду МС с добавлением 1 мг/л ИМК.

Литература

Chen H.Y., Fan J., Cao J.X. Determination of flavones in *Elsholtzia bodinieri* by HPLC // China Journal of Chinese Materia Medica. – 2007. – V. 32. – P. 2385–2387.

Lai Y.G., Xu J.H., Jiang H.D., Zeng S., Zhao Y. HPLC simultaneous determination of three flavonoid aglycones in *Elsholtzia blanda* Benth // Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2006. – V. 26 (10). – P. 1404–1407.

Liu A.L., Lee S.M.Y., Wang Y.T., Du G.H. Elsholtzia: review traditional uses chemistry and pharmacology // Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences. – 2007. – V. 16. – P. 73–78.

Liu A.L., Liu B., Qin H.L., Lee S.M., Wang Y.T., Du G.H. Anti-influenza virus activities of flavonoids from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa* // Planta Medica. – 2008. – V. 74. – P. 847–851.

Liu X., Jia J., Yang L., Yang F., Ge H., Zhao C., Zhang L., Zu Y. Evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts and fractionation of different parts of *Elsholtzia ciliata* // Molecules. – 2012. – V. 7. – P. 5430–5441.

Solodukhina N.V., Cherednichenko M.Yu. *In vitro* introduction of medicinal herb *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyl. // The 3rd International Symposium on Euroasian Biodiversity, Abstract e-Book (Eds. Semiz G., Akyldiz G.K.). – July 05-08, 2017. Minsk, Belarus. – 410 p.

CLONAL MICROPROPAGATION OF *ELSHOLTZIA CILIATA* IN VITRO

N.V. Solodukhina, M.Yu. Cherednichenko

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Russian Timiryazev State Agrarian University”, Moscow, Russia, michael.tsch@gmail.com

Abstract. The effect of various auxin substances on the growth dynamics and the rooting effectiveness of aseptic *Elsholtzia ciliata* plants have been studied. By the shoot height, most of the experimental variants did not differ from the control, but there were differences in the rooting frequency. Based on the obtained data, for the clonal micropropagation the MS nutrient medium supplemented with 1 mg/l indole-3-butyric acid can be recommended.

Keywords: *Elsholtzia ciliata*, *in vitro*, clonal micropropagation, growth dynamics, rooting

ПЛАСТИДНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КАЛЛУСОВ РАСТЕНИЙ ТОМАТА БИОБАЛЛИСТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИН ПРОТИВ ОНКОГЕННОЙ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ

А.С. Столбиков^{1,2}, Р.К. Салаяев¹, Н.И. Рекославская^{1,3}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия, valkir5@yandex.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

Аннотация. Проведена пластидная трансформация каллусов растений томата генетической конструкцией, содержащей целевой ген *hrv16 L1*, кодирующий синтез основного антигенного белка папилломавируса высокоонкогенного типа HPV16 L1. Трансформация была осуществлена биобаллистическим методом. В результате удалось получить опытные растения способные синтезировать антигенный белок HPV16 L1 в количестве до 5300 нг/мг общего растворимого белка (ОРБ).

Ключевые слова: каллусы, биобаллистическая трансформация

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1378-1380

Использование генно-инженерных методов в создании вакцин на основе растительных экспрессионных систем является относительно новым и в то же время перспективным направлением биологии. Для получения модифицированных растений в более ранних работах нами чаще всего применялся метод трансформации *in planta* [Салаяев и др., 2010]. В итоге удалось получить генетически модифицированные растения, синтезирующие ряд целевых антигенных белков в количествах до 200 нг/мг ОРБ [Салаяев и др., 2012].

Анализ литературных данных показывает, что биобаллистическая трансформация в сочетании с использованием целевых генов с пластидной адресацией дает возможность получить растительный материал с большим содержанием целевых антигенов. Главным преимуществом данного метода является высокая эффективность встройки векторной ДНК.

Эти данные, свидетельствуют также о том, что при пластидной трансформации удаётся получать достаточно высокий уровень целевых белков [Dresen et al., 2010; Oey et al., 2009; Fernandes-San Millan et al., 2008; Lossl, Waheed, 2011; Ruhlman et al., 2010]. Особенностью пластид является то, что они передаются только по материнской линии и, следовательно, не содержатся в пыльце. Поэтому пластидная трансформация по сравнению с обычными способами генетической модификации растений считается более безопасной для окружающей среды, так как не происходит неконтролируемого распространения трансгена. Поскольку интеграция в пластиды происходит в результате гомологичной рекомбинации, отсутствует эффект случайной встройки гена, который наблюдается при ядерной трансформации растений. В пластидах практически не происходит сайленсинг трансгена, поэтому его экспрессия стабильно сохраняется в последующих поколениях [Щелкунов и др., 2011]. Однако при пластидной трансформации растений могут возникать проблемы с достаточно продолжительным периодом культивирования тканей из-за их низкого регенерационного потенциала. Низкий регенерационный потенциал связан с тем, что в работах зачастую в качестве

объекта используют фрагменты листовой пластинки растений. Поэтому для получения растений, которые продуцируют целевые белки, по нашему мнению, целесообразней использовать для биобаллистической трансформации каллусы, зародыши или меристематические зоны эксплантов.

Целью данной работы было использование биобаллистической трансформации каллусов растений томата для получения кандидатных вакцин. Для трансформации каллусов использовался ген высокоонкогенного вируса папилломы человека hrv16 L1 с пластидной адресацией, кодирующий синтез основного антигенного белка L1.

Материалы и методы. Каллусы для трансформации получали из зародышей семян томата (*Lycopersicon esculentum*) сорта Вентура.

Зародыши растений извлекали путём препарирования стерильным лезвием или скальпелем набухших семян томата. Культивацию зародышей осуществляли на питательной среде (MS + кинетин, индолилуксусная кислота) в течение 1–3 недель вплоть до образования каллусов. Полученные каллусы помещали на среду с повышенной осмотической силой PAGAR (диск фильтровальной бумаги, покрытый слоем среды следующего состава: 1/2 MS, 0,125 М маннитола, 0,125 М сорбитола, 3% сахарозы).

Генетическую трансформацию проводили в стерильных условиях посредством использования пневматической генной пушки конструкции Салаяева [Жимулёв, 2003]. В качестве «микроснарядов» использовали вольфрамовый порошок M17 (Bio-Rad) с диаметром 1,1–1,2 мкм. Ген hrv16 L1 был помещен в векторную систему pUC57, клонируемую в *E. coli*. Препаративное выделение плазмидной ДНК осуществляли методом щелочного лизиса с очисткой полиэтиленгликолем 6000. Полученную плазмидную ДНК после выделения осаждали на микрочастицы путём добавления к 25 мкл (3 мг) суспензии вольфрамовых частиц 5 мкл (5 мкг) плазмидной ДНК, 25 мкл 2,5 М стерильного CaCl₂ и 10 мкл 0,1 М стерильного спермидина. Суспензию объёмом 2 мкл наносили в углубление на фронтальной поверхности тефлоновых макроснарядов.

После трансформации для уменьшения повреждений, нанесённых клеткам «микроснарядами», контрольные и опытные образцы оставляли на среде PAGAR на 1–2 ч. Затем PAGAR с каллусами переносили на среду с более низкой осмотической концентрацией (без сорбитола и маннитола) и оставляли в темноте на 2–3 суток. Далее контрольные и трансформированные каллусы проращивали в герметичных сосудах на среде MS с добавлением фитогормонов и 3% сахарозы.

Эффективность трансформации геном hrv16 L1 определяли с помощью методов ИФА и ПЦР.

Результаты. Из каллусов, прошедших процедуру биобаллистической трансформации, были получены зрелые растения томата. ПЦР-анализ генетического материала тканей растений, подвергшихся биобаллистической трансформации, показал успешную инсерцию целевого гена hrv16 L1 в геном растений. Иммуноферментный анализ выявил присутствие в листьях и плодах опытных растений целевого белка HPV 16 L1, количество которого доходило до 5300 нг/мг общего растворимого белка (ОРБ), что было сопоставимо с показателями других работ по пластидной трансформации и приближалось к результатам, получаемым при генетической трансформации растений методом *in fruto* [Салаяев и др., 2016].

Заключение. По результатам ПЦР и ИФА растений, прошедших биобаллистическую трансформацию геном hrv16 L1, включенным в генетическую конструкцию, имеющую пластидную адресацию, можно заключить, что биобаллистический метод, с использованием каллусов томата, позволил получить растения с увеличенным содержанием целевого антигенного белка L1.

Литература

Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика. – Новосибирск: Сиб. ун-т., 2003. – 479 с.

Саляев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С., Третьякова А.В. Использование последовательности омега-лидера вируса табачной мозаики для трансформации плодов томата геном папилломавируса *hpv16* L1 с целью увеличения продукции антигенного белка HPV16 L1 // ДАН. – 2016. – Т. 468, № 2. – С. 225–227.

Саляев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С., Третьякова А.В. Мукозальная кандидатная вакцина против гепатита В на основе плодов томата, трансгенного по гену *preS2-S* // ДАН. – 2012. – Т. 446, № 5. – С. 583–586.

Саляев Р.К., Столбиков А.С., Рекославская Н.И., Щелкунов С.Н., Поздняков С.Г., Чепинога А.В., Хэммонд Р.В. Получение растений томата, трансгенных по гену *preS2-S-HDEL*, синтезирующих основной антигенный белок поверхностной оболочки вируса гепатита В // ДАН. – 2010. – Т. 433, № 3. – С. 419–422.

Щелкунов С.Н., Константинов Ю.М., Дейнеко Е.В. Транспластомные растения // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15, № 4. – С. 808–817.

Dresen I., Hamri G., Fussenegger M. Heat-stable oral-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection // J. of Biotechnology. – 2010. – V. 145, No. 3. – P. 273–280.

Fernandes-San Millan A., Ortigosa S.M, Hervás-Stubbs S., Corral-Martínez P., Seguí-Simarro J.M, Gaétan J., Coursaget P., Veramendi J. Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic // Plant Biotechnology J. – 2008. – V. 6, No. 5. – P. 427–441.

Lossl A., Waheed M. Chloroplast-derived vaccines against human diseases: achievements, challenges and scopes // Plant Biotechnology J. – 2011. – V. 9, No. 5. – P. 527–539.

Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B., Bock R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic // The Plant J. – 2009. – V. 57, No. 3. – P. 436–445.

Ruhlman T., Verma D., Samson N., Daniell N. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression // Plant Physiology. – 2010. – V. 152. – P. 2088–2104.

BIOLISTIC PLASTID TRANSFORMATION OF TOMATO CALLUS CELLS IN THE DEVELOPMENT OF VACCINES BASED ON THE PLANT EXPRESSION SYSTEM AGAINST THE ONCOGENE HUMAN PAPILLOMA

A.S. Stolbikov^{1,2}, R.K. Salyaev¹, N.I. Rekoslavskaya^{1,3}

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia, valkir5@yandex.ru

²Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

³Irkutsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

Abstract. The plastid transformation of tomato callus cells with a genetic construct containing the target gene *hpv16* L1 coding the synthesis of the main antigenic papillomavirus protein HPV16 L1 was conducted. The transformation was carried out by the biolistic method. As a result, the transgenic plants expressing the antigenic protein HPV16 L1 in amount up to 5300 ng/mg total soluble protein (TSP) were obtained.

Keywords: calluses, biolistic transformation

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА С БИОГЕННЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Е.В. Столповская, Н.Н. Трофимова, В.А. Бабкин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, stel@irioch.irk.ru

Аннотация. На основе изучения биологической активности медь- и цинксодержащих комплексных соединений (КС) дигидрокверцетина (ДКВ) получены предварительные данные о перспективах их использования в разработках эффективных препаратов для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ, и в комбустиологии. В настоящее время продолжается исследование реакций комплексообразования ДКВ с ионами биогенных металлов для расширения ряда потенциальных кандидатов в лекарственные средства.

Ключевые слова: дигидрокверцетин, флавоноиды, комплексные соединения

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1381-1384

Исследование биологических объектов и производство на их основе ценных для человека продуктов является важнейшей задачей биотехнологии. Одним из перспективных направлений фармацевтической промышленности является производство лекарственных и лечебно-профилактических средств, разработанных на основе растительного сырья. Известно, что использование лекарственных средств на основе продуктов растительного происхождения имеет ряд преимуществ перед их синтетическими аналогами, благодаря более мягкому, но достаточно выраженному лечебному эффекту комплекса биологически активных веществ лекарственных растений [Решетников, 2010].

Флавоноиды представляют собой полифенольные соединения, широко распространенные в растительном мире. Комплексные соединения ионов различных металлов с флавоноидами во многих случаях проявляют усиленную биологическую и фармакологическую активность по сравнению с активностью исходных соединений и заключают в себе огромный терапевтический потенциал для разработки новых эффективных и безопасных лекарственных препаратов [Selvaraj et al., 2013].

Среди многообразия флавоноидов особый интерес исследователей привлекает дигидрокверцетин благодаря сочетанию высокой и разнообразной биологической активности и значительному содержанию в древесине лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) – основной лесообразующей породы Сибири (более 80% от суммарной флавоноидной фракции, которая составляет около 4,5% от массы абсолютно сухой древесины) [Бабкин и др., 2011]. Теоретический и практический интерес представляет получение и исследование комплексных производных на основе биогенных металлов с ДКВ.

Выбор металлов в качестве комплексообразователей в реакциях с флавоноидами, как правило, обусловлен их зачастую ключевой ролью в биологических процессах. Широко исследуются комплексные соединения флавоноидов, содержащие ионы Fe^{2+} и Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и др. Все эти металлы входят в состав многих ферментов, выполняющих важнейшие функции. Для железосодержащих ферментов это транспорт электронов, транспорт и депонирование кислорода и железа, участие в формировании активных центров окислительно-восстановительных ферментов. Медьсодержащие ферменты играют важную роль в окислительно-восстановительных процессах, участвуют в реакциях окисления органических субстратов молекулярным кислородом. Медь обладает выраженным противовоспалительным свойством и смягчает проявление

аутоиммунных заболеваний. Цинк входит в состав более чем 200 металлоферментов, участвующих в различных метаболических процессах. Важную роль играет цинк в синтезе белка и нуклеиновых кислот, он необходим для стабилизации структуры ДНК, РНК и рибосом, участвует в процессах клеточного дыхания, заживления ран, воспроизведения потомства и иммунного ответа, влияет на обмен железа, меди, магния и кальция и на активность более чем 300 ферментов.

Ранее в лаборатории химии древесины Иркутского института химии были разработаны методы синтеза и исследованы комплексные соединения ДКВ с ионами биогенных двухвалентных металлов – цинка, меди и кальция. В качестве исходных реагентов использовали ДКВ производства ООО ИНПФ «Химия древесины», выделенный из древесины лиственницы по технологии [Бабкин и др., 2000], предполагающей максимальное сохранение биологически активного *транс*-2*R*,3*R*-изомера флавоноида, и водорастворимые соли. С использованием комплекса физико-химических методов доказано, что в структурах комплексов сохранены фрагменты молекулы флавоноида, отвечающие за антиоксидантную активность, и *транс*-2*R*,3*R*-конфигурация асимметрических центров молекулы ДКВ [Трофимова и др., 2014].

Выявлена высокая антиоксидантная активность КС в экспериментах *in vitro* на сливной плазме крови здоровых доноров [Столповская и др., 2016], выраженная антирадикальная активность, превосходящая активность ДКВ, в реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом [Столповская и др., 2017]. В ФГБУ «НИИ гриппа» Министерства здравоохранения РФ (Санкт-Петербург) на стандартной модели летальной гриппозной инфекции белых мышей установлена непосредственная активность КС цинка и меди (II) с ДКВ в отношении вирусов гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) и прямая вирулицидная активность медьсодержащего комплекса ДКВ по отношению к вирусу А/Duck/Potsdam (H5N2) [Трофимова и др., 2015]. В ФГБНУ Иркутском научном центре хирургии и травматологии на базе научного отдела экспериментальной хирургии исследована оригинальная фармацевтическая композиция, разработанная на основе КС цинка с ДКВ. В экспериментах *in vivo* на модели термического ожога 2 и 3А степени выявлены высокая ранозаживляющая активность, выраженная противовоспалительная активность и положительное влияние композиции на микрофлору ожоговой раны. Доказано, что по эффективности средство не уступает препарату сравнения Куриозину[®] (гиалуронат цинка, производство Gedeon Richter (Венгрия): гель 0,103 %) [Костыро и др., 2017].

Результаты предварительных исследований биологической активности медь- и цинксодержащих комплексных соединений ДКВ свидетельствуют о перспективах их дальнейшего исследования с целью разработки эффективных препаратов для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ. КС цинка с ДКВ хорошо зарекомендовало себя в составе фармацевтической композиции для лечения различных видов ран, в том числе ожоговых.

В лаборатории продолжается работа по созданию и исследованию новых производных дигидрокверцетина с биогенными металлами, перспективных для использования в медицине. В настоящее время проводится исследование реакции ДКВ с ионами кобальта. Являясь одним из важнейших микроэлементов, кобальт участвует в процессах белкового, углеводного, минерального и жирового обмена, кроветворения, стимулирует образование гемоглобина и эритроцитов, поддерживает тканевое дыхание. Кобальт входит в состав ряда ферментов и молекулы витамина В₁₂, обеспечивает метаболизм фолиевой кислоты, катехоламинов, активирует деятельность центральной нервной системы, регулирует функцию вегетативной нервной системы, щитовидной железы [Бахтина и др., 2007]. Для оптимизации реакции дигидрокверцетина с Co²⁺ в водной среде исследовали влияние на выход продукта и селективность реакции

следующих параметров: рН реакционного раствора, температуры раствора, продолжительности реакции, мольного соотношения исходных компонентов и их начальных концентраций, состава аниона кобальтовой соли. Полученные результаты позволят разработать условия для наработки экспериментальных партий для дальнейших исследований, в частности, для определения различных видов биологической активности нового соединения.

Таким образом, исследование химических превращений продуктов переработки биомассы растительного сырья представляет собой перспективное направление в области биотехнологии. Создание эффективных медицинских препаратов на основе производных ДКВ позволит более полно использовать экстрактивные вещества древесины лиственницы для расширения спектра импортозамещающих лекарственных средств и повысить эффективность химической переработки биомассы хвойных пород Сибири.

Основные результаты получены с использованием оборудования Байкальского аналитического центра коллективного пользования СО РАН.

Литература

Бабкин В.А., Остроухова Л.А., Бабкин Д.В., Малков Ю.А. Способ получения дигидрокверцетина. Патент 2158598 (РФ) // БИ. – 2000. – № 31.

Бабкин В.А., Остроухова Л.А., Трофимова Н.Н. Биомасса лиственницы: от химического состава до инновационных продуктов. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011. – 236 с.

Бахтина Г.Г., Ленъко О.А., Суханова С.Е. Микроэлементозы человека и пути коррекции их дефицита // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2007. – № 4. – С. 82–89.

Костыро Я.А., Гоголь Е.С., Лепехова С.А. [и др.] Средство для лечения ран и ожогов. Патент 2637440 (РФ) // БИ. – 2017. – № 34.

Решетников В.Н. Производство фитопрепаратов – важная задача науки и производства // Труды БГУ. – 2010. – Т. 5, ч. 2. – С. 7–9.

Столповская Е.В., Трофимова Н.Н., Бабкин В.А. Оценка антирадикальной активности комплексов дигидрокверцетина с использованием ДФПГ // Тез. докл. X Всеросс. науч. конф. и школы молодых ученых «Химия и технология растительных веществ». – Казань, 2017. – С. 278–279.

Столповская Е.В., Трофимова Н.Н., Бабкин В.А. Оценка антиоксидантной активности комплексных соединений дигидрокверцетина с ионами биогенных металлов // Химия растительного сырья. – 2016. – № 4. – С. 65–70.

Трофимова Н.Н., Бабкин В.А., Киселев О.И. Комплексные соединения ионов цинка и меди (II) с дигидрокверцетином и их противовирусная активность // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2015. – № 6. – С. 1430–1436.

Трофимова Н.Н., Столповская Е.В., Бабкин В.А. и др. Строение и электрохимические свойства комплексных соединений металлов с дигидрокверцетином // Химия растительного сырья. – 2014. – № 3. – С. 121–131.

Selvaraj S., Krishnaswamy S., Devashya V., Sethuraman S., Krishnan U.M. Flavonoid-Metal Ion Complexes: A Novel Class of Therapeutic Agents // Medicinal Research Reviews. – 2013. – V. 33 (5). – P. 1–26.

THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF DIHYDROQUERCETIN COMPLEXES WITH BIOGENIC METALS

E.V. Stolpovskaya, N.N. Trofimova, V.A. Babkin

A.E. Favorsky Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk, Russia, *stel@irioch.irk.ru*

Abstract. Preliminary data on the prospects for the use of copper- and zinc-containing dihydroquercetin complexes in the development of effective drugs for the treatment and prevention of influenza and acute respiratory viral infections, and in combustingology are obtained on the basis of a study of their biological activity. At present, we continue to investigate the reactions of dihydroquercetin complexation with biogenic metals for the expansion of a number of potential candidates for medicines.

Keywords: *dihydroquercetin, flavonoids, complexes*

ИССЛЕДОВАНИЕ ИМПОРТА ДНК В МИТОХОНДРИИ *IN VIVO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОПЛАСТОВ АРАБИДОПСИСА

В.И. Тарасенко, Т.А. Болотова, М.В. Кулинченко, Ю.М. Константинов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский Институт Физиологии и Биохимии Растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, vslav@inbox.ru

Аннотация. Известно, что митохондрии, изолированные из различных растительных объектов, способны импортировать ДНК. Однако все исследования в области импорта ДНК проводились в системе *in organello*, и подтверждение существования феномена транслокации ДНК в митохондрии *in vivo* представляется чрезвычайно важной задачей. Нами разработан метод детекции импорта ДНК в митохондрии с использованием протопластов арабидопсиса. Показано, что находящаяся в цитоплазме растительной клетки ДНК активно поступает в митохондрии. Отмечена схожесть ряда характеристик импорта *in vivo* и *in organello*.

Ключевые слова: импорт ДНК, протопласты, порин, *Arabidopsis thaliana*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1385-1387

Известно, что митохондрии, изолированные из различных растительных объектов, способны импортировать двухцепочную линейную ДНК небольшого размера (<10 т.п.н.) путем активного, не зависящего от последовательности ДНК транспорта [Константинов и др., 2016]. Показано, что чужеродный генетический материал, импортируемый в органеллы в составе вектора, созданного на основе кукурузного плазмидного репликона, контролируемый митохондриальными регуляторными последовательностями, может экспрессироваться, а также служить матрицей для синтеза ДНК [Koulintchenko et al., 2003]. Получены доказательства интеграции чужеродной ДНК в митохондриальный геном картофеля, осуществляемой по механизму гомологичной рекомбинации [Mileshina et al., 2011]. В более поздних исследованиях обнаружено, что импорт ДНК-субстратов больших размеров зависит от наличия в их последовательности определенных элементов, а именно, инвертированных повторов на 5'- и 3'-концах молекулы: известно, что внутри органелл ИП вовлечены в связывание с белками, участвующими в репликации и стабилизации плазмиды [Ibrahim et al., 2011]. Наличие природного механизма переноса ДНК в митохондрии открывает принципиально новые возможности как для фундаментальных исследований, так и разработки методов трансформации митохондриального генома в биотехнологии сельскохозяйственных растений. Однако, все описанные выше исследования проводились с использованием изолированных митохондрий (*in organello*), и подтверждение существования импорта ДНК в митохондрии *in vivo* представляется чрезвычайно важной задачей.

В процессе разработки подходов к детекции импорта ДНК в митохондрии, происходящего *in vivo*, нами были использованы протопласты из листьев арабидопсиса. Для трансформации протопластов экзогенной ДНК был применен метод ПЭГ-опосредованной трансфекции [Yoo et al., 2007]. С помощью ПЦР в реальном времени показано, что существенное количество ДНК проникает в клетку и сохраняется там в течение как минимум 20 ч. Разработан подход к детекции импорта ДНК в митохондрии на уровне целых клеток. Данный подход включает: (а) трансформацию протопластов тем или иным ДНК-субстратом; (б) инкубацию клеток в течение 2-20 ч; (в) лизис протопластов и выделение митохондрий из протопластов микрометодом; (г) обработку изолированных митохондрий ДНКазой с целью избавления от возможного загрязнения фракцией ДНК, связавшейся с наружной мембраной митохондрий; (д) лизис

митохондрий и выделение митохондриальной ДНК; (е) оценку количества импортированной в митохондрии ДНК с помощью ПЦР в реальном времени. Преимуществом этого подхода является высокая чувствительность метода детекции и возможность дифференцировать ДНК, связавшуюся с наружной мембраной митохондрий, от ДНК, проникшей внутрь органелл.

С помощью данного метода было установлено, что находящаяся в цитоплазме растительной клетки ДНК активно поступает в митохондрии. Для трансформации протопластов был использован ряд ДНК-субстратов разной длины, аналогичных применявшимся в экспериментах по импорту *in organello*. После инкубации протопластов в течение 20 ч, выделения митохондрий и экстракции мтДНК, детекция с помощью ПЦР в реальном времени показала достаточно высокий уровень сигнала с праймеров, специфичных к последовательностям использованных субстратов. На следующем этапе работы было проведено сравнение интенсивности импорта ДНК-субстратов трех размеров – 269 п.н., 852 п.н. и 2,7 т.п.н. Для трансфекции протопластов использовалось равное количество ДНК каждого из трех субстратов. Количество молекул ДНК, импортировавшихся в митохондрии в условиях *in vivo*, уменьшалось с увеличением размера импортируемого субстрата. Схожая зависимость была отмечена ранее для импорта ДНК разного размера в изолированные митохондрии, что свидетельствует в пользу того, что обнаруженные нами закономерности импорта ДНК *in organello* отражают процессы, протекающие *in vivo*.

Разработанный подход мы использовали далее для трансформации субстратом размером 2,7 т.п.н. протопластов, изолированных из листьев растений дикого типа (*Col-0*) и двух мутантных линий *vdac1* и *vdac3*, у которых инактивирована одна из изоформ митохондриального порина, VDAC1 или VDAC3.

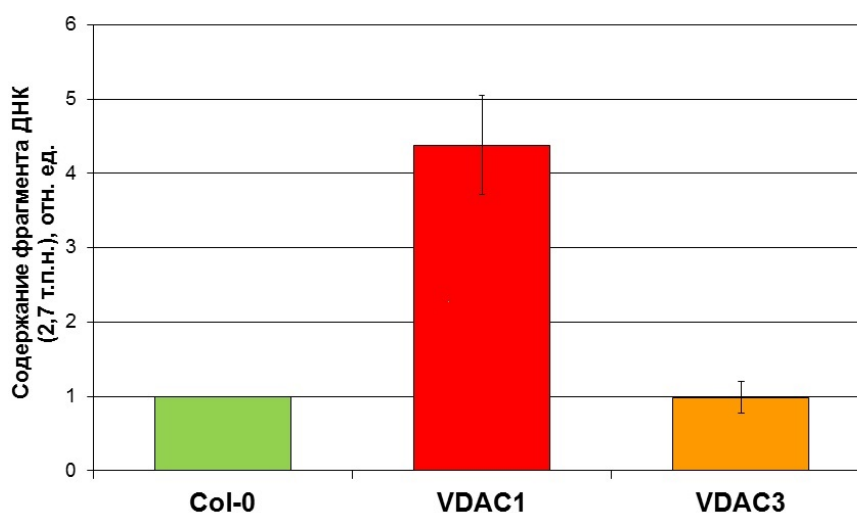


Рисунок. Анализ эффективности импорта ДНК в митохондрии протопластов (*in vivo*) арабидопсиса дикого типа (*Col-0*) и мутантов *vdac1* и *vdac3*. На рисунке показано относительное количество импортированной ДНК фрагмента размером 2,7 т.п.н., нормированное к содержанию фрагмента гена *nad4* (митохондриальная ДНК), выявленное при анализе проб после импорта в митохондрии протопластов (*in vivo*).

Как следует из представленной на рисунке диаграммы, интенсивность транслокации ДНК в митохондрии в протопластах мутанта *vdac1* была выше более чем в 4 раза по сравнению с уровнем митохондриального импорта в протопластах дикого типа. Импорт в митохондрии протопластов *vdac3* оставался на уровне, показанном для дикого типа. Эти данные согласуются с результатом, полученным нами в

экспериментах по импорту ДНК в изолированные митохондрии в системе *in organello*. В этих экспериментах мы наблюдали повышенную активность импорта ДНК в митохондрии, выделенные из мутантов по VDAC, сравнительно с растениями дикого типа. Следует отметить, что отличия в интенсивности импорта в митохондрии мутанта *vdac1* были заметно более выраженными по сравнению с митохондриями *vdac3*.

Таким образом, нами впервые разработана система, позволяющая детектировать транслокацию ДНК, происходящую на уровне живой растительной клетки. Отмечено, что ряд показанных с использованием этой системы закономерностей импорта сходен с таковыми, продемонстрированными ранее для импорта в изолированные митохондрии, что свидетельствует в пользу того, что оба подхода отражают процессы, происходящие в целом растении.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №18-04-00603), с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

Константинов Ю.М., Дитриш А., Вебер-Лотфи Ф., Ибрагим Н., Клименко Е.С., Тарасенко В.И., Болотова Т.А., Кулинченко М.В. Импорт ДНК в митохондрии // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 10. – С. 1307–1321.

Ibrahim N., Handa H., Cosset A., Koulintchenko M., Konstantinov Y., Lightowlers R.N., Dietrich A., Weber-Lotfi F. DNA delivery to mitochondria: sequence specificity and energy enhancement // Pharm. Res. – 2011. – V. 28. – P. 2871–2882.

Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // EMBO J. – 2003. – V. 22. – P. 1245–1254.

Mileshina D., Koulintchenko M., Konstantinov Yu., Dietrich A. Transfection of plant mitochondria and *in organello* gene integration // Nucleic Acids Research. – 2011. – V. 39 (17). – e115.

Yoo S.D., Cho Y.H., Sheen J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis // Nature Protoc. – 2007. – V. 2 (7). – P. 1565–1572.

STUDY OF DNA IMPORT INTO MITOCHONDRIA IN VIVO USING ARABIDOPSIS PROTOPLASTS

V.I. Tarasenko, T.A. Bolotova, M.V. Koulintchenko, Y.M. Konstantinov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia,
vslav@inbox.ru

Abstract. It is known that mitochondria isolated from different plants are able to import DNA. However, all studies in the field of DNA import have been conducted using *in organello* system, and the confirmation of the existence of DNA import into the mitochondria *in vivo* seems to be an extremely important task. We have developed a method for detecting DNA import into mitochondria using Arabidopsis protoplasts. It is shown that the DNA located in the cytoplasm of the plant cell actively enters the mitochondria. The similarity of a number of import characteristics *in vivo* and *in organello* was noted.

Keywords: DNA import, protoplasts, VDAC, *Arabidopsis thaliana*

РОЛЬ АВР1 В РЕГУЛЯЦИИ ПРОТОН-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ H^+ -АТФазы ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ТАБАКА ВУ-2 ДИКОГО ТИПА И NAS

С.Б. Теплякова, Т. Чэнь, А.А. Кирпичникова, В.В. Емельянов, М.Ф. Шишова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет", Санкт-Петербург, Россия, serafima.teplyakova@mail.ru

Аннотация. На модельном объекте, представляющем суспензионную культуру клеток табака линии ВУ-2 дикого типа Wt и NAS, изучали ацидофицирующую активность H^+ -АТФазы плазмалеммы по изменению окрашивания индикатора бромкрезолового пурпурового. Впервые показана роль АВР1 в регуляции работы протонной помпы плазмалеммы в ходе роста растяжением.

Ключевые слова: *рост растяжением, H^+ -АТФаза, плазмалемма, АВР1*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1388-1391

Ауксин-связывающий белок1 (АВР1) длительное время рассматривался в качестве одного из доменов рецептора ауксина на плазмалемме. Однако ряд современных данных (создание мутантов *abr1-c1*) поставило под сомнение физиологическое значение АВР1 в механизмах рецепции и трансдукции ауксинового сигнала [Gao, 2015]. Однако накоплены данные о том, что внесение извне АВР1 приводит к увеличению чувствительности протопластов и клеток к ауксину [Barbier-Brygoo et al., 1991], увеличивает амплитуду гиперполяризации [Venis et al., 1992]. Также было выявлено, что АВР1 участвует в регуляции экспрессии генов, кодирующих белки, определяющие пластичность клеточной стенки [Raque et al., 2014]. Показано, что АВР1 принимает участие в реорганизации цитоскелета в процессе роста, регулирует везикулярную секрецию и, посредством этого процесса, определяет перераспределение белков-переносчиков ауксина PIN [Robert et al., 2010; Murphy, Peer, 2012]. Кроме того, АВР1 оказывает влияние на рост клеток, а недостаток АВР1 приводит к нарушениям роста [Braun et al., 2008]. Эти данные косвенным образом указывают на возможность участия АВР1 в регуляции работы H^+ -АТФазы плазмалеммы.

H^+ -АТФаза плазмалеммы обеспечивает изменение концентрации протонов в клеточной стенке, что лежит в основе роста растяжением согласно теории кислотороста. Активность H^+ -АТФазы регулируется рядом факторов, в том числе, фитогормоном ауксином. Как именно сигнал передается от ауксина к H^+ -АТФазе плазмалеммы до сих пор не ясно. Согласно одной из гипотез, одним из звеньев в данной передаче сигнала может служить ауксин-связывающий белок1.

Цель работы: выявить роль белка АВР1 в регуляции работы H^+ -АТФазы плазмалеммы в ходе роста растяжением.

Задачи работы: 1) охарактеризовать интенсивность роста растяжением клеток суспензионных культур Ву2 дикого типа и NAS; 2) оценить изменение протон-транспортирующей активности H^+ -АТФазы плазмалеммы в ходе роста растяжением клеток суспензионных культур Ву2 дикого типа и NAS.

Материалы и методы. Исследование проходило на клетках суспензионной культуры табака ВУ-2 (*Nicotiana tabacum L. cv. Bright Yellow*) линии дикого типа и линии NAS (рис. 1), являющейся антисенс трансформантом по АВР1 и характеризующейся пониженной интенсивностью роста растяжением.

Развитие культуры Ву2 заключается в последовательной смене этапов деления, интенсивного роста растяжением и завершения роста. В работе были

проанализированы клетки в возрасте 7, 14 и 18 суток, характеризующим основные этапы роста клеток суспензионной культуры табака.

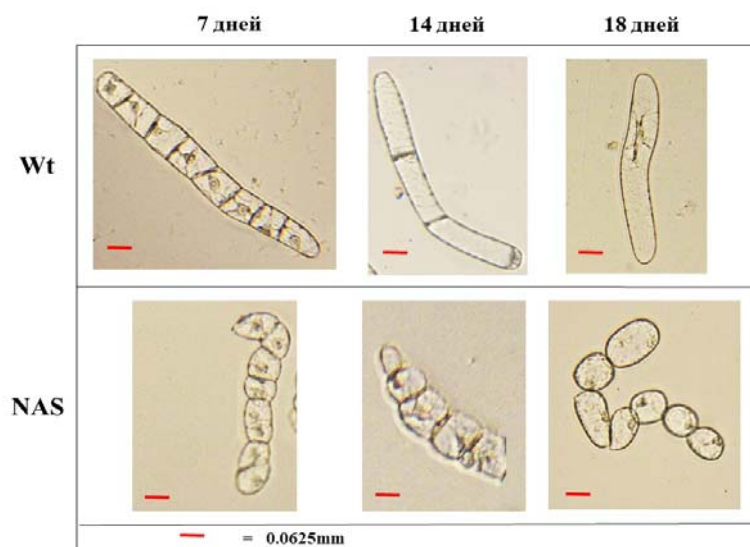


Рис. 1. Клетки суспензионной культуры Ву2 (WT и NAS) в ходе развития.

Для определения интенсивности подкисления экстраклеточного пространства протонными помпами плазмалеммы клеток суспензионной культуры табака был использован индикатор кислотности бромкрезоловый пурпуровый, диапазон использования которого составляет от pH 5,0 до pH 7,0. 100 мг красителя бромкрезолового пурпурового растворяли в 3,7 мл 0,05н NaOH. Затем доводили водой до 250 мл. Затем готовили необходимый объем 10% раствора бромкрезолового пурпурового в культуральной среде с добавлением 0,7% агара (pH 7,0). Конечный раствор с индикатором заливали по 4 мл в стерильные чашки Петри (диаметром 40 мм). Затем после остывания и затвердевания среды на поверхность добавляли по 3 гр. клеток (живых/мертвых/с ванадатом натрия). Клетки убивали нагреванием в микроволновой печи. Фиксацию изменение окраски чашек во времени производили путем сканирования чашек (HP ScanJet G2710) через каждые 15 минут в течение трех часов. Далее изображение конвертировали в черно-белое и определяли интенсивность окрашивания при помощи программы ImageJ. Пример изменения окрашивания индикатора приведен на рис. 2.

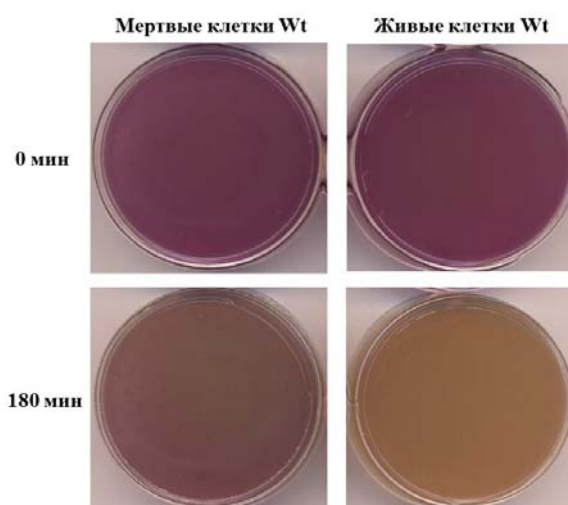


Рис. 2. Изменение протон-транспортирующей активности H^+ -АТФазы плазмалеммы живых и мертвых клеток (линии Wt) через 180 минут.

Результаты. В ходе наших экспериментов показано неравное изменение интенсивности ацидофицирующей активности клеток. Для клеток дикого типа максимум детектировали в фазу интенсивного роста растяжением на 14 день развития. Причем закисление продолжалось и на завершающем этапе измерений, через 3 часа после начала эксперимента (рис. 3). Клетки на 7 и 18 день, т.е. при инициации и торможении роста, отличались меньшей амплитудой закисления. Выявленное снижение pH инкубационной среды было свойственно только живым клеткам и опосредовано работой H^+ -АТФазы плазмалеммы, так как на всех проанализированных этапах развития клеток эта функция в значительной степени блокировалась ингибитором протонной помпы – ванадатом натрия.

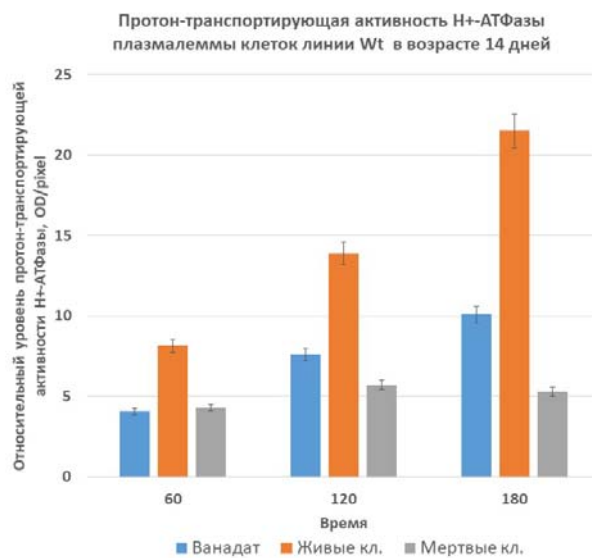


Рис. 3. Протон-транспортирующая активность H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток линии Wt в возрасте 14 дней.

Ацидофицирующая активности клеток линии NAS также менялась неравномерно. Ее амплитуда была значительно меньше, чем у клеток дикого типа. Однако максимальное значение достигалось на 14 день на этапе роста растяжением (рис. 3 и 4), как и у клеток дикого типа. Клетки сохраняли чувствительность к ванадату, что указывает на участие в развитии закисления H^+ -АТФазы плазмалеммы.

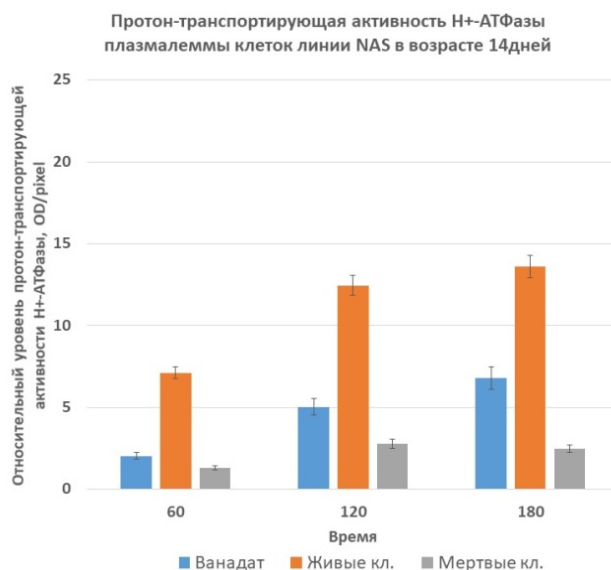


Рис. 4. Протон-транспортирующая активность H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток линии NAS в возрасте 14 дней.

Таким образом, на модельной системе, представленной синхронизированными клетками суспензионной культуры табака BY-2 (*Nicotiana tabacum L. cv. Bright Yellow*) дикого типа и NAS, выявлено нелинейное изменение протон-транспортирующей активности H⁺-АТФазы плазмалеммы в ходе развития. Показано, что снижение количества ABP1 приводит к понижению интенсивности роста, амплитуды закисляющей способности клеток, опосредованной работой протонной помпы плазмалеммы.

Работа финансируется из средств гранта РФФИ 16-04-00743-а и проводилась с использованием ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Литература

Barbier Brygoo H., Ephritikhine G., Klämbt D., Maurel C., Palme K., Schell J., Guern J. Perception of the auxin signal at the plasma membrane of tobacco mesophyll protoplasts // *The Plant Journal*. – 1991. – V. 1, No. 1. – P. 83–93.

Braun N., Wyrzykowska J., Muller P., David K., Couch D., Perrot-Rechenmann C., Fleming A.J. Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in *Arabidopsis* and tobacco // *The Plant Cell*. – 2008. – V. 20, No. 10. – P. 2746–2762.

Gao Y., Zhang Y., Zhang D., Dai X., Estelle M., Zhao Y. Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – V. 112, No. 7. – P. 2275–2280.

Murphy A.S., Peer W.A. Vesicle trafficking: ROP–RIC roundabout // *Current Biology*. – 2012. – V. 22, No. 14. – P. R576–R578.

Paque S., Mouille G., Grandont L., Alabadí D., Gaertner C., Goyallon A., Perrot-Rechenmann C. AUXIN BINDING PROTEIN1 links cell wall remodeling, auxin signaling, and cell expansion in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. – 2014. – V. 26, No. 1. – P. 280–295.

Robert S., Kleine-Vehn J., Barbez E., Sauer M., Paciorek T., Baste, P. & Hayashi K. ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis* // *Cell*. – 2010. – V. 143, No. 1. – P. 111–121.

Venis M.A., Napier R.M., Barbier-Brygoo H., Maurel C., Perrot-Rechenmann C., Guern, J. Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin agonist activity // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1992. – V. 89, No. 15. – P. 7208–7212.

THE ROLE OF ABP1 IN REGULATION OF PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPase PROTON-TRANSPORTING ACTIVITY OF SUSPENSION CULTURE OF TOBACCO By-2 CELLS WILD TYPE AND NAS

S.B. Teplyakova, T. Chen, A.A. Kirpichnikova, V.V. Emelyanov, M.F. Shishova

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Saint-Petersburg State University", St. Petersburg, Russia, serafima.teplyakova@mail.ru

Abstract. The model system represented by tobacco suspension cell culture By-2 wild type and line NAS was used for the investigation of H⁺-ATPase acidifying activity, detected with bromocresol purple. It is shown that ABP1 is important for regulation of plasma membrane proton pump activity during elongation growth.

Keywords: *elongation growth, H⁺-ATPase, plasma membrane, ABP1*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ И МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *TRICHODERMA* ДЛЯ ВЫХОДА ЭМБРИОГЕННЫХ КУЛЬТУР *LARIX SIBIRICA*

И.Н. Третьякова¹, М.Э. Пак¹, И.А. Лисецкая², А.А. Баранова³, Е.А. Рогожин^{3,4}, В.С. Садыкова³

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт леса им. В.Н.Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального исследовательский центр Красноярского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия, culture@ksc.krasn.ru

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

Аннотация. Проводили ряд экспериментов по выращиванию эмбрионных культур и регенерантов лиственницы сибирской на питательной среде АИ с различными концентрациями АМП грибов рода *Trichoderma* и белково-пептидных экстрактов следующих видов растений: щирицы запрокинутой (*Amarantus retroflexus*, семена), чернушки посевной (*Nigella sativa*, семена) и пырея удлиненного (*Elytrigia elongata*, колосья) для достижения прямого антимикробного эффекта, а также запуска механизмов индуцированной устойчивости, изучения морфогенеза и ростовой активности соматических зародышей и проростков.

Ключевые слова: *Larix sibirica*, эмбрионально-суспензорная масса, *Trichoderma*, антимикробные пептиды растений

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1392-1396

Соматический эмбриогенез является одним из перспективных направлений в создании сортового плантационного лесовыращивания. Технология соматического эмбриогенеза широко используется за рубежом в программе MVF, основанной на вводе в культуру улучшенных, генетически тестированных деревьев [Park et al., 2016]. В России биотехнология соматического эмбриогенеза была разработана нами у лиственницы сибирской в 2012 (Патент РФ № 2456344). В настоящее время у лиственницы получены длительно пролиферирующие эмбрионные клеточные линии (Кл), которые в течение 9 лет при регулярных пересадках продуцировали глобулярные зародыши от 2000 до 11000 штук на 1 г ЭСМ (эмбрионально-суспензорной массы) у разных Кл. Созревание зародышей происходило на среде АИ с АБК. Регенеранты адаптировали в ростовой камере, и затем сеянцы высаживались в теплицу и почву лесопитомника.

Для повышения выхода клонированных соматических сеянцев одним из ключевых моментов технологии соматического эмбриогенеза является получение полноценных регенерантов. В процессе морфогенеза соматических зародышей в период созревания происходит ряд нарушений в развитии доменов зародыша. Особенно часто мутации возникают в базальном домене, что выражается в образовании каллуса на месте корня, гипокотилия или в области корневой шейки [Пак и др., 2016].

Ранее нами проводились эксперименты по влиянию штаммов грибов рода *Trichoderma* в период инициации каллусных культур ряда хвойных видов [Третьякова и др., 2009]. При этом было установлено, что метаболиты штаммов способны увеличивать скорость роста каллусов и зародышей хвойных растений. Однако действие метаболита на растительный организм оказалось видоспецифично, что согласуется с данными других исследователей, показавших существенные различия по увеличению массы у разных видов и сортов злаковых растений и в ответных реакциях на воздействие отдельных видов *Trichoderma*. Стимуляция роста культур в этом случае, вероятно, связана с активацией механизма системной резистентности у растений. Кроме того, для повышения иммунитета растений к комплексу стрессовых факторов окружающей среды часто используют защитные пептиды. Большинство из них – антимикробные пептиды (АМП), которые синтезируются конститутивно и индуцировано для борьбы с патогенами и являются важнейшими эффекторными молекулами иммунной системы животных и растений. Обладая широким спектром антимикробной активности, пептиды представляют несомненный интерес для повышения устойчивости растений [Егоров, Одинцова, 2012]. В настоящее время десятки АМП выделены и охарактеризованы из семян растений, таких как ежовник обыкновенный, пшеница, чернушка посевная, звездчатка средняя и др. [Odintsova et al., 2009; Rogozhin et al., 2011; Slavokhotova et al., 2014]. Влияние АМП растительных пептидов на хвойные растения до сих пор не исследовалось.

Объектом исследования служили незрелые семена *L. sibirica*, произрастающей в дендрарии ИЛ СО РАН (дерево № 4А). Инициация эмбриогенных культур и эксперименты по созреванию и прорастанию соматических зародышей были описаны ранее [Пак и др., 2016; Третьякова и др., 2016]. Для оценки влияния активных пептидных комплексов грибов рода *Trichoderma* на эмбриогенные культуры *L. sibirica* были отобраны два штамма: *T. citrinoviride* ТУV1 4/11 ВКПМ F-1228 [запатентован как продуцент антибиотиков-пептабиолов с антигрибной и антибактериальной активностью. Патент РФ № 2564577, 2015] и штамм 346 *T. viride*. Для эксперимента были отобраны четыре клеточные линии: Кл4, Кл5 Кл6, Кл12. Варианты среды АИ: контроль, с добавлением комплекса пептидов ТУV1 4/11 и 346 (2 мкг/диск). Для проращивания соматических зародышей лиственницы сибирской в безгормональную среду ½АИ добавляли пептиды в концентрациях 2 мкг/диск, 7 мкг/диск, 15 мкг/диск, 30 мкг/диск, 60 мкг/диск.

Для оценки влияния указанных белково-пептидных растительных экстрактов на каллусные культуры *L. sibirica* на стадии инициации (из незрелых зародышей) в питательную среду АИ вводили пептиды в диапазоне концентраций 50–1600 мкг/л. Регенеранты, полученные из длительно пролиферирующих клеточных культур – Кл4 (9 лет пролиферации) помещали на безгормональную среду ½ АИ, в которую вводили белково-пептидные экстракты, полученные из семян щиряцы, чернушки и колосьев пырея в следующих концентрациях: 25 мкг/л, 50 мкг/л, 100 мкг/л, 200 мкг/л, 400 мкг/л и 800 мкг/л. Влияние комплекса пептидов на эмбриогенные культуры *L. sibirica* оценивали по динамике пролиферации ЭСМ, морфометрии глобулярных зародышей и динамике роста регенерантов. Статистическая обработка данных проводилась по стандартным методикам [Лакин, 1973] при помощи программы Microsoft Excel 2003.

При всех вариантах обработки активными пептидными комплексами грибов рода *Trichoderma* пролиферационная активность ЭСМ сохранялась в течение всего периода культивирования на средах с добавлением пептидов (4 недели). Мультипликация зародышей продолжалась. Интенсивность роста значительно варьировала у исследуемых Кл. Высокая пролиферативная активность отмечена у Кл4 как в контрольном варианте, так и под действием АМП. У Кл12 прирост ЭСМ еще более

усиливался: при обработке АМП штамма 346 сырая масса трансплантов увеличилась в 140 раз. Низкая пролиферативная активность отмечена у Кл6, однако прослеживается такая же тенденция увеличения интенсивности прироста ЭСМ в опытных вариантах, как у Кл4 и Кл12. После перемещения пролиферирующей ЭСМ, на питательную среду АИ с АБК, кливаж, почкообразование и мультипликация эмбриональных трубок суспензора прекращались в течение 2–3 недель, как в вариантах, обработанных пептидами, так и в контроле.

Наблюдалась стимуляция корнеообразования у регенерантов Кл4 на 21 сут прорастания. В то же время происходила и стимуляции образования каллусных наплывов на проростках. Сеянцы, обработанные пептидами триходермального происхождения, не отличались от контрольных вариантов. Достоверных различий по общей длине регенерантов не выявлено. Наблюдалась тенденция увеличения длины корня у вариантов, обработанных биопептидами по сравнению с контролем, однако у части проростков наблюдалось отмирание корня и происходило каллусообразование в области корешка (рис. 1).



Рис. 1. Регенеранты Кл4 *Larix sibirica* на стадии прорастания: А, Б – контрольная среда АИ; В, Г – проростки, обработанные АМП штамма ТУV1 4/11; Д, Е – проростки, обработанные АМП штамма 346. Каллусные наплывы обозначены стрелками.

При сокультивировании эксплантов лиственницы сибирской в культуре *in vitro* с белково-пептидными растительными экстрактами щиряцы, чернушки и пырея (стадия инициации) уже через 1 мес. культивирования наблюдались отличия в росте культур и при перенесении их на среду для пролиферации и через 6 недель культивирования (3 пересадки) можно было вычленить эмбриогенные культуры, представляющие собой ЭСМ. Белая и рыхлая ЭСМ была отмечена во всех опытных вариантах. Цитологические данные показали, что в варианте с использованием экстракта щиряцы было получено 8 Кл, представляющих собой ЭСМ, в варианте с использованием экстракта было получено только 2 Кл при концентрации 100 и 200 мкг/л. Наибольшее число Кл линий в опытных вариантах было получено у пырея – 10 Кл. Таким образом, в вариантах, обработанных пептидами, было получено 18 Кл, активно формирующих ЭСМ (2 Кл некротизировались в течение двух месяцев) и 52 Кл, у которых выявлена начальная стадия образования ЭСМ (образование эмбриональных трубок). У контрольного варианта (среда АИ без пептидов) было обнаружено 5 Кл с ЭСМ и 10 Кл с начальной стадией образования эмбриогенных культур.

Исследования влияния белково-пептидных экстрактов растительного происхождения проводились на прорастающих регенерантах, полученных из длительно пролиферирующей Кл4. Для экспериментов были использованы экстракты, полученные из семян щиряцы, чернушки, а также колосьев пырея в диапазоне концентраций 25–800 мкг/л. Обработка данными вариантами не оказывала заметного влияния на рост в длину регенерантов *L. sibirica*. Повышение концентрации

биопрепаратов до 200–800 мкг/л в большинстве случаев вызывало ингибирование роста соматических проростков (рис. 2).

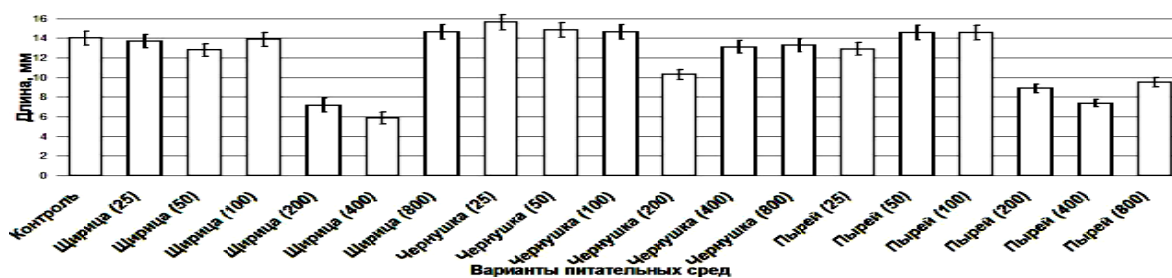


Рис. 2. Длина регенерантов *L. sibirica* на среде АИ с добавлением биопрепаратов растительного происхождения на 28 сутки культивирования.

Данный эксперимент показал, что как контрольные регенеранты, так и обработанные белково-пептидными экстрактами имеют утолщения и куллузы в области корня, гипокотилия и в области корневой шейки, как было показано нам ранее [Пак и др., 2016]. Однако ряд регенерантов формируют длинные прямые корни, такие соматические проростки способны укореняться. Дальнейшие наблюдения за ростом соматических сеянцев позволят определить устойчивость их к фитопатогенам при выращивании в теплице и в условиях лесопитомника. Разработка биотехнологии обработки антимикробными пептидами и пептидами растительного происхождения эмбрионных культур и регенерантов лиственницы *in vitro* имеет значение для решения фундаментальных и прикладных задач, изучения реализации морфогенетических программ и, особенно, для повышения иммунитета клонированных растений и устойчивости их к патогенам.

Литература

- Егоров Ц.А., Одинцова Т.И. Защитные пептиды иммунитета растений // Биоорганическая химия. – 2012. – Т. 38, № 1. – С. 7–17.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1973. – 343 с.
- Пак М.Э., Иваницкая А.С., Двойнина Л.М., Третьякова И.Н. Эмбрионный потенциал длительно пролиферирующих клеточных линий *Larix sibirica in vitro* // Сибирский лесной журнал. – 2016. – № 1. – С. 27–38.
- Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварина А.Е. Штамм микромицета *Trichoderma citrinoviride* Bissett ВКПМ F-1228 – продуцент мембраноактивных антибиотиков пептаиолов, обладающих антигрибной и антибактериальной активностью (патент РФ №2564577 от 07.09.2015).
- Третьякова И.Н., Пак М.Э., Иваницкая А.С., Орешкова Н.В. Особенности соматического эмбриогенеза длительно пролиферирующих эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica in vitro* // Физиология растений. – 2016. – Т. 63. – № 6. – С. 812–822.
- Odintsova T.I., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A. et al. A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif // FEBS J. – 2009. – V. 276, No. 15. – P. 4266–4275.
- Park Y.-S., Beaulieu J., Bousquet J. Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis. In: Vegetative Propagation of Forest Trees (eds. Park Y.-S., Bonga JM, Moon H.-K.). – Seoul: National Institute of Forest Science (NiFos), 2016. – P. 302–22.
- Rogozhin E.A., Oshchepkova Y.I., Odintsova et al. Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds // Plant Physiol Biochem. – 2011. – V. 49, No. 2. – P. 131–137.

Slavokhotova A.A., Odintsova T.I., Rogozhin E.A. et al. Isolation, molecular cloning and antimicrobial activity of novel defensins from common chickweed (*Stellaria media* L.) seeds // Biochimie. – 2011. – V. 93, No. 3. – P. 450–456.

**APPLICATION OF PLANT ANTIMICROBIAL PEPTIDES
AND FUNGI-MICROMYCETES OF THE GENUS *TRICHODERMA* PEPTIDES
TO PRODUCTION EMBRYOGENIC CULTURES OF *LARIX SIBIRICA***

I.N. Tretyakova¹, M.E. Park¹, I.A. Liseckaya², A.A. Baranova³, E.A. Rogozhin^{3,4},
V.S. Sadykova³

¹V.N. Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Krasnoyarsk, Russia,
culture@ksc.krasn.ru

²Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

³Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

⁴Shemyakin and Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia

Abstract. Experiments were conducted to grow embryogenic cultures and regenerants of Siberian larch on the nutrient medium AI with various concentrations of AMPs of fungi-micromycetes of the genus *Trichoderma* and plant antimicrobial peptides of the following species: *Amarantus retroflexus* (seeds), *Nigella sativa* (seeds), *Elytrigia elongata* (spikelets) to achieve a direct antimicrobial effect, as well as trigger the mechanisms of induced resistance, study morphogenesis and growth activity of somatic embryos and emblings.

Keywords: *Larix sibirica*, embryonal-suspensor mass, *Trichoderma*, plant antimicrobial peptides

ПРОТАТРАНЫ – СИНТЕТИЧЕСКИЕ БИОСТИМУЛЯТОРЫ РОСТА МИКРООРГАНИЗМА-НЕФТЕДЕСТРУКТОРА *RHODOCOCCUS SP.*

А.Л. Турская¹, Ю.А. Маркова¹, С.Н. Адамович², И.А. Ушаков², Е.Н. Оборина²,
М.С. Третьякова¹, Л.А. Беловежец²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *turskaya-anna@mail.ru*

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *mir@irioch.irk.ru*

Аннотация. Синтезирован ряд биологически активных арилхалькогенилацетатов трис(2-гидроксиэтил)-аммония – "протатранов" общей формулы $ArYCH_2CO_2^- \cdot HN^+(CH_2CH_2OH)_3$ (**A**), где Ar = арил; Y = O (**1**), S (**2**), SO₂(**3**). В присутствии протатрана 4-Cl-C₆H₄SO₂CH₂CO₂⁻HN⁺(CH₂CH₂OH)₃ (**3**) изучена динамика роста нефтеокисляющего микроорганизма *Rhodococcus sp.* Показано увеличение скорости роста (до 10 раз) бактериальных клеток. Сделан вывод о возможном использовании протатранов в технологии создания эффективного биопрепарата для ремедиации почв нефтезагрязненных территорий.

Ключевые слова: нефтедеструкторы, протатраны, биостимуляторы роста, *Rhodococcus sp.*, биоремедиация

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1397-1400

Для ускорения биодеструкции нефтяных загрязнений углеводородокисляющими микроорганизмами применяются различные стимулирующие препараты, такие как минеральные удобрения [Пунтус и др., 2015], органические удобрения [Марченко, 2011], а также поверхностно-активные вещества – сурфактанты [Hamdi et al., 2007; Каурри et al., 2011; Suja et al., 2014]. Вместе с тем, в состав ни одного из созданных и запатентованных препаратов, предназначенных для биоремедиации, не входят синтетические биостимуляторы.

В Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского реакцией биогенных гидроксиэтиламинов (триэаноламина) с биологически активными гет(арил)-халькогенилукусусными кислотами синтезирован широкий ряд химических соединений – «протатранов» (**A**), общей формулы $ArYCH_2CO_2^- \cdot HN^+(CH_2CH_2OH)_3$, где Ar=гет(арил); Y=O, S, SO, SO₂, Se.

Соединения **A** представляют собой порошки или ионные жидкости, устойчивые при хранении и хорошо растворимые в воде, спирте и других органических растворителях [Adamovich et al., 2017, 2018; Mirskova et al., 2014, 2015; Ushakov et al., 2016]. Среди протатранов **A** выявлены нетоксичные (LD₅₀ = 1300–6000 мг/кг) вещества, с антиоксидантным, иммуностропным, антиаллергенным, противораковым, анти-метастатическим, защитным, рост- и ферментстимулирующим действием. На основе протатранов и их аналогов разработаны эффективные биостимуляторы роста и развития таких микроорганизмов, как *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella typhi spermophil*, *E. coli.*, что сокращает время диагностики опасных заболеваний [Mirskova et al., 2014, 2015; Мирскова и др., 2016; Adamovich et al., 2017, 2018].

Целью данного исследования стало изучение динамики роста микроорганизма-нефтедеструктора *Rhodococcus sp.* в присутствии протатранов из ряда (**A**):

4-Cl-C₆H₄SO₂CH₂CO₂⁻ · HN⁺(CH₂CH₂OH)₃ (**3**).

Используемый штамм *Rhodococcus* sp. был выделен из ризосферы пырея ползучего (*Elytrigia repens*) на нефтезагрязненной территории Заларинского района Иркутской области. Рядом экспериментов установлена высокая нефтеразлагающая активность этого микроорганизма за счет синтеза биосурфактантов [Третьякова и др., 2017; Беловежец и др., 2017].

Для изучения скорости роста *Rhodococcus* sp. бактерии культивировали 2 суток при 26 °С на ГМФ-агаре («НИЦФ», С.-Петербург), затем делали смыв культуры в жидкую питательную среду – забуференный физиологический раствор (ЗФР) с добавлением 20 г/л глюкозы, рН 7,0. В опытные образцы добавляли раствор биостимулятора роста, в частности (3), в конечной концентрации 1, 10, 100 мг/л. Динамику роста культуры оценивали по изменению оптической плотности бактериальной суспензии с использованием микропланшетного фотометра при длине волны 595 нм («BioRad», США), а также методом прямого посева на ГМФ-агар с последующим подсчетом выросших колоний. Оценку достоверности различий полученных значений проводили с помощью критерия Манна-Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$ [Балдин, 2012].

Из всех исследованных концентраций протатрана наиболее стимулирующее действие на рост *Rhodococcus* sp. оказала концентрация 10 мг/л (рисунок). Уже с первых часов культивирования показатели оптической плотности были выше по сравнению с контролем.

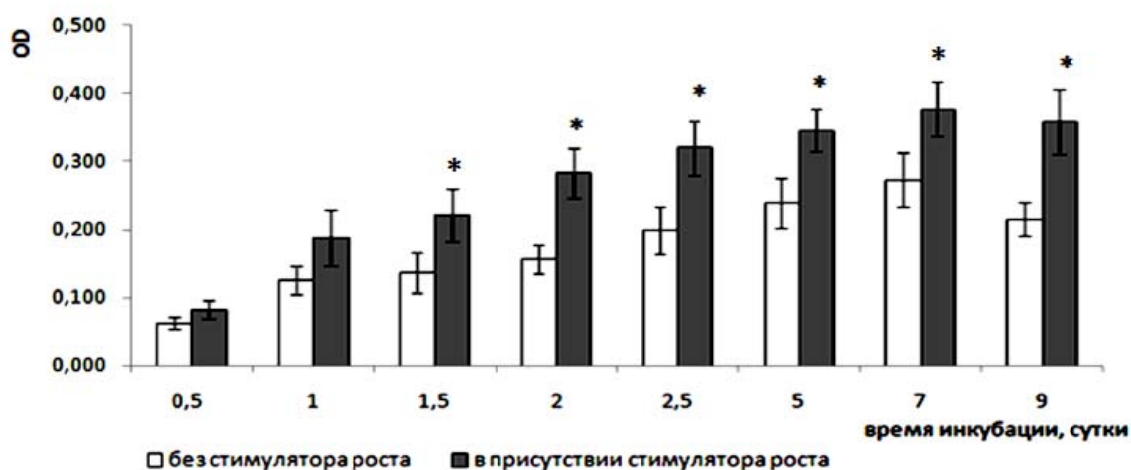


Рисунок. Динамика роста культуры *Rhodococcus* sp. в жидкой питательной среде с добавлением стимулятора роста (3) - 10 мг/л, оцениваемая по изменению оптической плотности суспензии. **Примечание:** звездочкой показаны достоверные различия показателя от контрольного (без стимулятора роста 3) при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Тот же эффект подтвердился методом прямого посева исследуемых образцов бактериальных суспензий на ГМФ-агар. На вторые сутки культивирования количество выросших колоний было практически вдвое больше по сравнению с контрольным вариантом (без добавления протатрана 3) (таблица). Через 5 суток культивирования разница в количестве выросших колоний в отсутствие стимулятора 3 (10^5 КОЕ/мл) и при добавлении стимулятора 3 (10^6 КОЕ/мл) составила 10 раз.

Таблица.

Динамика роста культуры *Rhodococcus* sp., оцениваемая методом прямого посева бактериальной суспензии на твердую питательную среду

Время, инкубации, сут	Без стимулятора роста (3), КОЕ/мл	В присутствии стимулятора роста (3), КОЕ/мл
2	$2,8 * 10^3 \pm 13$	$5,4 * 10^3 \pm 16$
3	$1,2 * 10^4 \pm 21$	$8,9 * 10^4 \pm 36$
5	$3,4 * 10^5 \pm 46$	$2,9 * 10^6 \pm 63$
7	$6,1 * 10^5 \pm 54$	$5,3 * 10^6 \pm 68$

Полученные результаты позволяют предположить, что синтезированные протатраны, в частности (3), могут применяться в качестве эффективных биостимуляторов для наращивания биомассы (до 10 раз) *Rhodococcus* sp. в технологии создания микробных биопрепаратов с целью ремедиации почв нефтезагрязненных территорий.

Литература

Балдин К.В. Общая теория статистики: Учебное пособие. – М.: Дашков и К, 2012. – 312 с.

Беловежец Л.А., Макарова Л.Е., Третьякова М.С., Маркова Ю.А., Дударева Л.В., Семенова Н.В. Возможные пути деструкции полиароматических углеводородов нефти некоторыми видами бактерий-нефтедеструкторов, выделенными из эндо- и ризосферы растений // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – № 1. – С. 76–81.

Марченко М.Ю. Биоремедиация нефтезагрязненных почв // Башкирский химический журнал. – 2011. – Т. 18, № 4. – С. 191–197.

Мирскова А.Н., Адамович С.Н., Мирсков Р.Ф. Протатраны – эффективные биостимуляторы для сельского хозяйства, биотехнологии и микробиологии // Химия в интересах устойчивого развития. – 2016. – Т. 24. – № 6. – С. 713–729.

Пунтус И.Ф., Рязанова Л.П., Звонарев А.Н., Фунтикова Т.В., Кулаковская Т.В. Роль минеральных фосфорных соединений в процессе биodeградации нафталина бактериями *Pseudomonas putida* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 2. – С. 198–205.

Третьякова М.С., Беловежец Л.А., Маркова Ю.А., Макарова Л.Е. Углеводородокисляющие микроорганизмы, выделенные из эндо- и ризосферы растений // Актуальная биотехнология. – 2017. – № 2 (21). – С. 134–135.

Adamovich S.N., Mirskova A.N., Kolesnikova O.P. Antitumor agent. – 2017. – Patent RU 2623034.

Adamovich S.N., Mirskova A.N., Mirskov R.G. Method for obtaining of 1-R-indole-3-yl-sulfanylacetates of (2-hydroxyethyl) ammonium. – 2018. – Patent RU 2642778.

Adamovich S.N., Ushakov I.A., Vashchenko A.V. Novel guanidinium salts of biologically active (het)arylchalcogenylacetic acids // Mendeleev Comm. – 2017. – V. 27. – P. 88–89.

Hamdi H., Benzarti S., Manusadžianas L., Aoyama I., Jedidi N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions // Soil Biology and Biochemistry. – 2007. – V. 39, No. 8. – P. 1926–1935.

Kauppi S., Sinkkonen A., Romantschuk M. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: comparison of biostimulation and bioaugmentation // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2011. – V. 65, No. 2. – P. 359–368.

Mirskova A.N., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Kolesnikova O.P., Schilde U. Immunoactive ionic liquids based on 2-hydroxyethylamines and 1-R-indol-3-ylsulfanylacetic

acids. Crystal and molecular structure of immunodepressant tris-(2-hydroxyethyl) ammonium indol-3-yl-sulfanylacetate // *Open Chem.* – 2015. – V. 13. – P. 149–155.

Mirskova A.N., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Voronkov M.G. Pharmacologically active salts and ionic liquids based on 2-hydroxyethylamines, arylchalcogenylacetic acids, and essential metals // *Russ. Chem. Bull.* – 2014. – V. 63. – P. 1869–1883.

Suja F., Rahim F., Taha M.R., Hambali N., Razali M.R., Khalid A. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations// *International Biodeterioration & Biodegradation.* – 2014. – V. 90. – P. 115–122.

Ushakov I.A., Voronov V.K., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Mirskova A.N. The NMR study of biologically active metallated alkanol ammonium ionic liquids // *J Mol. Struct.* – 2016. – V. 1103. – P. 125–131.

PROTATHRANES – SYNTHETIC GROWTH BIOSTIMULATORS OF MICROORGANISM-OIL DESTRUCTOR *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS*

A.L. Turskaya¹, Yu.A. Markova¹, S.N. Adamovich², I.A. Ushakov², E.N. Oborina², M.S. Tretyakova¹, L.A. Belovezhets²

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, turskaya-anna@mail.ru

²A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, mir@irioch.irk.ru

Abstract. A number of biologically active arylchalcogenylacetates of tris (2-hydroxyethyl) - ammonium – "protatrans" of the general formula $\text{ArYCH}_2\text{CO}_2^-$ was synthesized. $\text{HN}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$ (A), where Ar=aryl; Y=O (**1**), S (**2**), SO_2 (**3**). In the presence of protatran 4-Cl-C₆H₄SO₂CH₂CO₂⁻. $\text{HN}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$ (**3**) studied the growth dynamics of the oil-oxidizing microorganism *Rhodococcus* sp. An increase in the growth rate (up to 10 times) of bacterial cells is shown. A conclusion is made about the possible use of protatrans in the technology of creating an effective biopreparation for the remediation of soils in oil-polluted areas.

Keywords: oil destructors, protatrans, growth stimulators, *Rhodococcus* sp., bioremediation

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ

А.А. Тюрин¹, О.С. Павленко¹, К.В. Кабардаева¹, О.А. Гра¹, В.С. Фадеев¹,
О.Н. Мустафаев², И.В. Голденкова-Павлова¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, alexjofar@gmail.com

²Бакинский государственный университет, Баку, Азербайджан. orkhan@bioset.org

Аннотация. Диссонанс между уровнями мРНК и белка заботит исследователей с самого начала генно-инженерной эпохи. Однако ввиду ряда причин основной акцент в подобных исследованиях до последнего десятилетия делался лишь на анализе активности промоторов, изучении способов контроля транскрипции. Тем не менее, трансляция как этап предполагает более тонкий инструментарий для управления экспрессией гетерологичных генов. В представленной работе мы рассмотрим лишь небольшую группу подходов к конструированию тонко настраиваемых систем экспрессии чужеродных генов в растениях.

Ключевые слова: трансляция, трансгенные растения, мРНК, регуляторные элементы

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1401-1402

Как известно, инициация трансляции – критический момент, контролируемый целым спектром регуляторных элементов, было бы неразумным упускать такую возможность. Ключевым элементом, среди прочих, выступает 5'-нетранслируемая область (5'-НТО). 5'-НТО важна как сама по себе, т.е. огромное значение имеют её структурные характеристики (размер и нуклеотидный состав), так и являясь контейнером для разного рода функционально активных мотивов – регуляторных элементов: upstream открытых рамок считывания и стартовых кодонов, сайтов внутренней посадки рибосомы, G-квадруплексов, рибопереключателей и т.п. Непосредственное отношение к 5'-НТО в плане локализации имеет и окружение стартового кодона – консенсусная последовательность Козак.

В рамках представленной работы мы исследовали возможность улучшить экспрессию целевых генов в растениях путём модификации 5'-нетранслируемой области. Проведя элементарный статистический анализ, а также изучив опыт аналогичных исследований, мы выяснили следующие особенности 5'-НТО растений (на примере *A. thaliana*): размер этих элементов для большинства генов модельных растений лежит в пределах 70-120 н.о., содержание гуанина и цитозина – 37-40%. Однако, очевидно, что сами по себе эти параметры мало, что значат. Вторым этапом нашего исследования стал поиск определённых мотивов в массиве 5'-НТО генов с высоким уровнем экспрессии модельного организма. Результатом биоинформатического анализа стала консенсусная последовательность длиной 87 н.о. Далее для верификации гипотезы о том, что 5'-нетранслируемая область такого рода будет выступать в качестве трансляционного энхансера, мы клонировали полученную консенсусную последовательность в вектор (для транзientной экспрессии в растениях), содержащий ген репортерного белка лихеназы. Нами показано увеличение уровня экспрессии по сравнению с контролем (вектор без трансляционного энхансера) на 35%.

Следующим важным этапом трансляции является элонгация. В нашей работе мы рассматривали зависимость эффективности экспрессии от нуклеотидного состава кодирующей последовательности целевого гена. Подобные работы проводились и ранее, однако большинство из них было сфокусировано на оптимизации кодонового состава путём приведения его в соответствие с профилем кодонов высоко

экспрессируемых генов. Тем не менее, мы сочли важным тот факт, что кодоновый состав описанных выше генов может и не содержать превалирующих по концентрации триплетов, т.е. быть сугубо специфичным для генов домашнего хозяйства, и таким образом, проявлять своего рода негибкость в плане интеграции в этот профиль дополнительных единиц трансляции. Как решение этой гипотетической задачи нами было предложено использовать оптимизацию кодонового состава по полногеномному распределению частот встречаемости триплетов. В качестве модельных мы использовали гены лихеназы, эритропоэтина и интерферона- α -2A человека. Для верификации использовали метод транзientной экспрессии в растениях.

Трансляция, как отмечалось выше, – важный, ключевой процесс, но не единственный. Уже синтезированные протеины часто нуждаются в защите от протеолиза. Для выхода из сложившегося затруднения также предложен ряд приемлемых решений: компартментлизация, экскреция, ингибирование протеаз, слияние с белок-стабилизирующими партнёрами (БСП) и пр. Тут мы использовали последний подход, избрав в качестве БСП термостабильную лихеназу, о которой упоминалось выше. Особенностью данного фермента является его бифункциональность – наличие и репортерных свойств и возможность использовать его в качестве БСП. Лихеназа прекрасно выдерживает и транскрипционно-трансляционные слияния, и достройки небольших полипептидных последовательностей в область внутренних неструктурированных линкеров. Повышенная устойчивость к протеолизу и термостабильность также делают данный белок выгодным кандидатом на роль белок-стабилизирующего партнёра. В нашей работе выход модельного белка–интерферона увеличивался в полтора раза при слиянии его с лихеназой. Кроме этого, лихеназа предоставляет прекрасную возможность упростить процесс предварительной очистки путём прогревания тотальных лизатов с последующим удалением денатурированных белков.

Из сказанного выше можно сделать вывод о том, что транскрипция – не единственный этап, на котором возможна точная регулировка экспрессии генов. Последующие этапы дают не меньший, но даже больший инструментарий для достижения тонкой настройки экспрессионной машины клетки на синтез целевых гетерологичных полипептидов.

GENETIC DETERMINANTS FOR EFFICIENT EXPRESSION OF HETEROLOGOUS GENES IN PLANTS

A.A. Turin¹, O.S. Pavlenko¹, K.V. Kabardaeva¹, O.A. Gra¹, V.S. Fadeev¹,
O.N. Mustafaev², I.V. Goldenkova-Pavlova¹

¹K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia,
irengold58@gmail.com

²Baku State University, Baku, Azerbaijan; *orkhan@bioset.org*

Abstract. Since the dawn of genetic engineering epoche dissonance between mRNA and protein levels worries a lot of researchers. Due to a set of different reasons the main emphasis in the investigations was made only on analysis of promoters activity. However translation as a stage suggests more precision tools for heterologous genes control. In this paper we consider only little group of approaches for designing of fine tuning plant systems of heterologous gene expression.

Keywords: *translation, transgenic plants, mRNA, regulatory elements*

ПОЛУЧЕНИЕ МОРФОГЕННЫХ КАЛЛУСОВ РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

С.А. Файзиева¹, У.К. Алиев², Ф.Б. Худжамерова¹, К.А. Алиев²

¹Межгосударственное образовательное учреждение высшего образования «Российско-Таджикский (Славянский) университет», Душанбе, Республика Таджикистан, *fayz.sadaf@mail.ru*

²Институт ботаники, физиологии и генетики растений Академии наук Республики Таджикистан, Душанбе, Республика Таджикистан, *lab.gen@mail.ru*

Аннотация. Изучали соотношение цитокининов и ауксинов в различных культуральных средах при выращивании зародышей пшеницы *in vitro* и образование морфогенных структур. Процесс каллусообразования и появления морфогенных клеток являются независимыми процессами и контролируются различными группами генов.

Ключевые слова: зародыши пшеницы, морфогенные каллусы, фитогормоны

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1403-1406

Основной зерновой культурой сельского хозяйства является пшеница, с которой давно ведется селекционная работа с использованием традиционных подходов. В последнее время все более широкое применение находят биотехнологические приемы на основе селекции растительных клеток в условиях *in vitro* [Бутенко, 1999]. Такой подход существенно ускоряет селекционный процесс в силу реализации свойственной растительной клетке тотипотентности.

Сельскохозяйственные культуры нередко подвергаются действию таких повреждающих факторов как экстремально высокие и низкие температуры, дефицит или избыток влаги, повышенное содержание солей, закисленность почв.

Поэтому важнейшей задачей сельского хозяйства является увеличение производства продуктов высокого качества. Чтобы эффективно управлять ростом и развитием растений, получать высокие и устойчивые урожаи в условиях стресса (солевой, засуха, температура) все больше используют методы современной биотехнологии.

Быстрое развитие современной биотехнологии в последние годы определяется не только прогрессом идей, но и прогрессом в методах исследования и техническом оснащении биологического эксперимента. Для физиологии растений, как и для всей биологии в целом, характерно стремление к глубокому проникновению в сущность процессов, происходящих на клеточном уровне и определяющих закономерности реакций целого растительного организма. Благодаря такому свойству как тотипотентность (способность расти из отдельного органа, ткани, клетки) для растений можно использовать метод культуры *in vitro* [Глеба, 1998; Алиев и др., 2005; Просад, 2003].

На этой основе, создание устойчивых к засолению, особенно, зерновых культур, позволит вовлечь в сельскохозяйственную практику новые земли и снизить потери урожая от неблагоприятных климатических условий. Для этого необходимо развивать методы клеточной и генной технологии.

Пшеница – одна из важнейших зерновых культур в мире. В основном культурные сорта пшеницы (особенно твердой) не обладают устойчивостью к засолению. Поэтому изучение механизмов и повышение солеустойчивости пшеницы имеет не только теоретическое, но и практическое значение.

Одним из путей для решения данной проблемы связано с расширением арсенала методов повышения генетического разнообразия за счет применения культивируемых

клеток растений. Более надежным является использование культуры незрелых зародышей пшеницы *in vitro* с целью получения устойчивых растений пшеницы к неблагоприятным стрессорам, что и являлось задачей данной работы.

Объекты, методы и условия исследований. В качестве объектов исследований использовали такие сорта пшеницы, как Сомони, Навруз, широко используемые в Таджикистане, а также сорт Эритроспермум. Для культуры каллуса из зрелых зародышей использовали общепринятую методику с различными изменениями [Файзиева, 2009].

Выделение зародышей злаковых и приготовление среды. Незрелые зародыши пшеницы изолировали на стадии молочной спелости (на 5-8 день после образования завязей), промывали в дистиллированной воде и стерилизовали в растворе диацита в течение 7-10 минут. После стерилизации промывали дистиллированной водой 3-4 раза по 3-5 мин, затем извлеченные зародыши, помещали в пробирку на агаризованные (7%) культивируемые среды Мурасиге и Скуга (МС) с различным содержанием ауксинов и цитокининов. Освещенность – 600 лк, влажность – 80-85% в регулируемой комнате. Общая продолжительность каллусообразования составила 50-60 дней от начала посадки эксплантов на среду МС.

Результаты исследования и их обсуждения. Средой для культивирования служила среда Мурасиге и Скуга – МС с различными добавками фитогормонов, углеводов, амидов, аминокислот в различных сочетаниях (таблица).

Таблица.

Состав питательных сред для каллусогенеза для генотипов пшеницы (в колонке 1 указаны номера сред выращивания)

№	Компоненты среды						Сорта пшеницы		
	кинетин	2.4-Д	ИУК	НУК	6-БАП	аспарагин	Сомони	Навруз	Эритро сперму м
1	0.5						-	-	+
2		0.5				10	-	-	+
3			0.5			10	+	+	+
4				0.5			-	+	-
5					1.0		+	-	-
6		0.5				10	++	++	++
7	0.5	0.5				10	+	+	-
8	0.2		0.5			10	++	++	++
9	0.2		0.5			10	+	++	+
10	0.2			0.5		10	+++	+++	++
11	0.2	0.2	0.5			10	++	++	+++
12	0.2	0.2		0.5		10	++	+++	++

Как видно из таблицы, мы учитывали соотношение цитокининов и ауксинов в культуральных средах для выращивания зародышей злаковых растений.

Образование каллуса на средах, содержащих БАП, было не очень высоким, при этом каллус образовывался на поздних этапах культивирования зародышей (среда № 5).

Образование морфогенных структур наблюдалось на средах, содержащих НУК, ИУК, кинетин как в отдельности, так и в различных их сочетаниях (среды № 7-12).

Образование морфогенных структур (каллус, адвентивные почки, глобулы) отмечено на средах, содержащих ИУК и кинетин в сочетании с аспарагином (№ 8, 9).

Хорошо шел морфогенный процесс на среде, содержащей НУК и кинетин в сочетании с аспарагином (среда № 10).

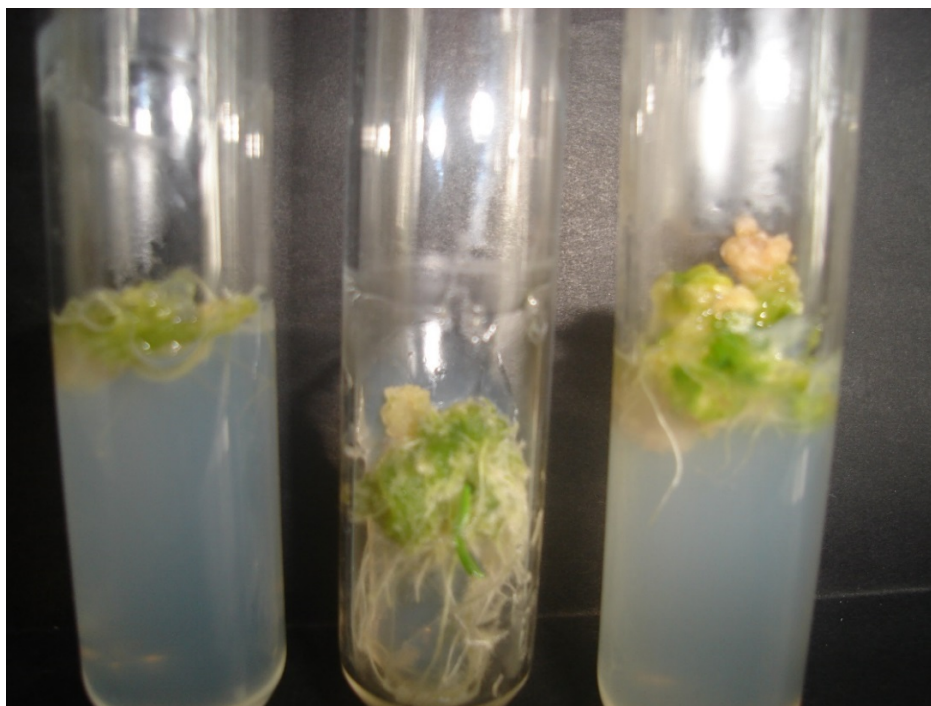


Рисунок. Образование морфогенных структур из незрелых зародышей пшеницы.

Анализ данных показал, что среду № 10 можно рекомендовать как основную для биотехнологии злаковых растений (возможно для клонального микроразмножения пшеницы).

На основе полученных результатов можно заключить, что зародыши культурных растений при их культивировании в определенных условиях формируют каллус. Процесс каллусообразования и появления морфогенных клеток являются независимыми процессами и контролируются различными группами генов. Органогенез и морфогенез злаковых растений тесно связаны с определенным соотношением фитогормонов и углеводов в культуральной среде. Также показано, что в процессе ускорения морфогенетических потенциалов злаковых растений значительную роль играет правильный подбор концентрации цитокининов и ауксинов и их дифференцированное применение для индукции морфогенеза. Обнаружено также некоторая сортоспецифичность ауксинов и цитокининов при культивировании незрелых зародышей пшеницы *in vitro*.

Таким образом, нам удалось отобрать состав питательных сред, способствующих интенсивному формированию морфогенных структур для различных генотипов злаковых растений. Данные результаты являются необходимыми для дальнейших исследований по получению стрессоустойчивых (засуха, засоление) растений пшеницы методами клеточной технологии.

Литература

Алиев К.А., Давлятназарова З.Б., Алиева С.К. Сельскохозяйственная биотехнология как основа продовольственной безопасности населения. – Мат-лы Республ. научн.-практ. конф. “Продовольственная безопасность Республики Таджикистан”. – Душанбе, 2005. – С. 209–213.

Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – Москва: ФБК Пресс, 1999. – 159 с.

Глеба Ю.Ю. Биотехнология растений. Сорровский образовательный журнал, 1998. – С. 3–8.

Просад М.Н. Практическое использование растений для восстановления экосистем, загрязненных метаболитами // Физиология растений. – 2003. – № 5. – С. 764–781.

Файзиева С.А. Регенерационная активность разных генотипов пшеницы и эгилопса в культуре *in vitro*. – Автореф. дисс... к.б.н. – Душанбе. – 2009.

MAKING MORPHOGENIC CALLI OF DIFFERENT WHEAT GENOTYPES TO *IN VITRO* CULTURE

S.A. Faizieva¹, U.K. Aliev², F.B. Hujamerova¹, K.A. Aliev²

¹Interstate educational institution of the higher education «Russian-Tajik (Slavonik)» university, Dushanbe, Tajikistan, *fayz.sadaf@mail.ru*

²Institute of botany, plant physiology and genetics of Academy of Sciences Republic of Tajikistan, Dushanbe, Tajikistan, *lab.gen@mail.ru*

Abstract. Studied the ratio of cytokinins and auxin in a variety of cultural mediums by the cultivation of wheat germ *in vitro* and the formation of morphogenic structures. The process of callus formation and morphogenic cells appearance are independent processes and controlled by different gene groups.

Keywords: *wheat germ, morphogenic calli, phytohormones*

ЦИТО-ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *ACONITUM BARBATUM* PATR. EX PERS

М.В. Филонова^{1,2}, С.В. Пулькина¹, Т.И. Фомина², А.А. Чурин^{1,2}

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

²Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия, Maria-Caurus7@yandex.ru

Аннотация. *Aconitum barbarum* ценное лекарственное растение, имеет невысокую численность и ограниченное распространение в Томской области. Изучены цитогистологические характеристики каллусной культуры аконита. Было выявлено несколько цитотипов: меристематического типа (меристемоподобных – М), паренхимного типа (паренхимоподобных: П1, П2, П3, П4, П5) и гигантских клеток (Г).

Ключевые слова: каллусная культура, *Aconitum barbarum* Patr. ex Pers., цито-гистология

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1407-1410

Введение. Культуры клеток растений представляют собой экспериментально созданную биологическую систему, физиологические, гистологические, цитологические и генетические особенности которой могут отличаться от интактного растения. Генетическое разнообразие каллусных клеток позволяет использовать их не только для разработки методов получения новых генотипов для селекционных исследований, но и для создания технологий получения веществ вторичного метаболизма. Для разработки большинства клеточных технологий необходимо иметь данные о характере ростовых процессов и цитогистологических изменениях, происходящих в каллусных тканях.

В работе использована каллусная культура, полученная из перспективного лекарственного растения *Aconitum barbarum* Patr. ex Pers. Акони́т борода́тый - многолетнее растение семейства Лютиковые (*Ranunculaceae* Juss) относится к редким видам, известен в народной медицине Китая, Тибета и Монголии [Kharina et al., 2017]. *A. barbarum* содержит дитерпеновые алкалоиды, флавоноиды и другие вещества, обладающие биологической активностью, и представляющие интерес для создания на их основе лекарств противоопухолевого [Wadaa et al., 2015] и антиноцицептивного [Li-Mei Sun et al., 2009] действия. Изучение морфологических параметров культуры, цитологических особенностей клеток с определением размера, морфологии и ядерно-цитоплазматического отношения, необходимо для того чтобы выявить особенности каллусной культуры аконита и подтвердить ее морфогенный статус. Что в дальнейшем позволит оценить возможность органогенеза и использования культуры в качестве источника для получения БАВ.

Культура аконита бородачатого получена на кафедре физиологии растений и биотехнологии НИ ТГУ, подобраны условия для индукции и длительного субкультивирования каллусной культуры [Филонова и др., 2017]. Цель настоящей работы - оценить цито-гистологические характеристики каллусной культуры *Aconitum barbatum* Patr. ex Pers.

Для более полной характеристики полученной каллусной культуры и определения направления ее пролиферации и цитодифференцировки провели анализ клеточного

состава на постоянных препаратах гистологических срезов каллусной культуры аконита бородатого.

Методы исследования. Для гистологического исследования использовали каллус аконита 15 пассажа на 20 сутки субкультивирования, его фиксировали в смеси 96% этилового спирта с ледяной уксусной кислотой (3:1), с последующим отмыванием 96% спиртом. Готовили гистологические препараты по стандартной методике. Гистологические срезы, изготовленные на микротоме толщиной 0,7 мкм, переносили на стекла, окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в бальзам [Коржевский, Гиляров, 2010].

На гистологических препаратах с помощью системы анализа изображения на базе микроскопа Axio Lab A1 (Carl Zeiss, Германия) проводили фотографирование клеток при увеличении 100x10, на каждый цитотип по 100 измерений. При помощи программы ZEN 2.3 (blue edition) измеряли площадь клетки и ядра, далее рассчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение, которое является важной морфологической характеристикой, позволяющей оценить уровень метаболизма в клетках.

Результаты и выводы. Каллус аконита бородатого представляет собой плотную гетерогенную массу светло-желтого цвета. В результате цито-гистологического исследования выявлено, что каллусная культура *A. barbarum* состоит из нескольких цитотипов: меристематического типа (меристемоподобных - М), паренхимного типа (паренхимоподобных: П1, П2, П3, П4, П5) и гигантских клеток (Г) (рисунок).

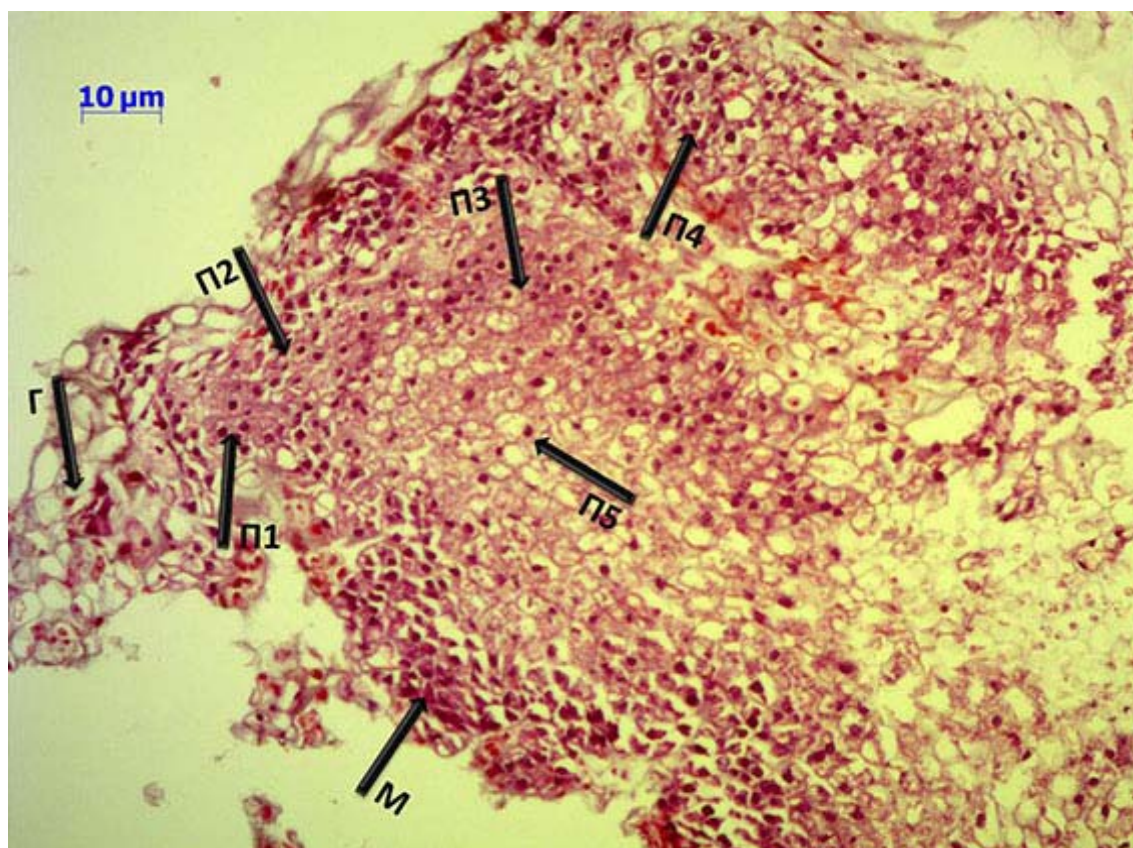


Рисунок. Гистологический срез каллуса *Aconitum barbarum* Patr. ex Pers. (увеличение 10x10). **Примечание:** стрелками указаны цитотипы: М (меристемоподобные), П1-П5 (паренхимоподобные), Г (гигантские).

Клетки меристематического типа – сравнительно мелкие: 130-150 мкм², с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением – более 0,3; полигональной

формы, плотно прилегающие друг к другу, с округлым ядром расположенным в центре клетки и несколькими ядрышками, неоднородно окрашенной кариоплазмой сетчатого типа и интенсивно окрашенной цитоплазмой. Некоторые из них находятся на разных стадиях митотического деления.

Клетки паренхимного типа – различные по форме и размерам от 180 и до 700 мкм², ядерно-цитоплазматическим соотношением от 0,08 до 0,3; что позволило условно разделить их на 5 типов:

П1 – клетки неправильной формы с крупным ядром, неоднородно окрашенной кариоплазмой с одним или несколькими ядрышками. Цитоплазма с мелкими вакуолями, интенсивно окрашена.

П2 – клетки крупные округлой формы с крупным ядром с одним или 2-3 ядрышками и интенсивно окрашенной кариоплазмой. Цитоплазма светлая неоднородно окрашенная, отмечается слияние мелких вакуолей в несколько более крупных.

П3 – клетки округлые с округлым ядром с 1-2 ядрышками и интенсивно окрашенной однородной кариоплазмой. Вакуоли в цитоплазме симметрично окружают ядро, оставляя небольшой пояс из цитоплазмы. Четко просматривается клеточная стенка.

П4 – Клетки крупные округлые или слегка вытянутые с интенсивно окрашенным небольшим ассиметрично расположенным ядром. Цитоплазма светлая, ограничивает 2-3 слабоокрашенные вакуоли.

П5 – Крупные клетки с ассиметрично расположенным ядром с крупным ядрышком, слабо окрашенной цитоплазмой, которая в ряде клеток смещена к клеточной стенке одной, двумя крупными вакуолями.

Кроме того, четко выделяется немногочисленная группа гигантских клеток площадью в среднем 2000 мкм² и ядерно-цитоплазматическим соотношением менее 0,05. Клетки с интенсивно окрашенным ядром, ассиметрично расположенным, крупной вакуолью, занимающей всю площадь клетки, слабо окрашенной цитоплазмой и хорошо выраженной клеточной стенкой. Иногда встречаются гигантские клетки с крупным ядром с интенсивно окрашенным ядрышком и зернистой цитоплазмой.

Так как предварительный цитогенетический анализ каллусной культуры 15 пассажа показал наличие клеток разной пloidности, возможно, данный тип связан с наличием полиплоидных ядер.

На гистологических срезах можно визуализировать группы клеток на разных стадиях деградации, что затрудняет их идентификацию и не позволяет отнести к какому-либо цитотипу, поэтому они не анализировались.

В результате цито-гистологического анализа показано, что каллусная культура аконита является морфогенной и имеет гетерогенный клеточный состав.

Литература

Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. – СПб.: Спец Лит, 2010. – 95 с.

Филонова М.В., Медведева Ю.В., Ефимова М.В., Чуринов А.А. Способ получения каллусной культуры борца борогатого (*Aconitum barbatum* Patr. ex Pers.). Патент РФ № 2631927, заявитель и патентообладатель НИ ТГУ – опубл.: 28.09.2017. – Бюл. Изобретения полезные модели. – № 28. – 8 с.

Kharina T.G., Prokopyev A.S., Pulkina S.V., Yamburov M.S., Kataeva T.N. Study of *Aconitum barbatum* in the southern Tomsk region in wild and horticultural conditions // International Journal of Green Pharmacy. – 2017. – V. 11, No. 4. – P. 726–729.

Li-Mei Sun, Ze-Dong Nan, Hong-Li Huang, Wen-Hai Li, Cheng-Shan Yuan. Chemical constituents of *Aconitum barbatum* var. *puberulum* // Chemistry of Natural Compounds. – 2009. – V. 45, No. 6. – P. 934.

Wadaa K., Ohkoshi E., Zhao Y., Goto M., Morris-Natschke S. L., Lee K.-H. Evaluation of *Aconitum* diterpenoid alkaloids as antiproliferative agents // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2015. – V. 25, No. 7. – P. 1525–1531.

CYTO-HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CALLUS CULTURE ACONITUM BARBATUM PATR. EX PERS.

M. V. Filonova^{1,2}, S. V. Pulkina¹, T. I. Fomina², A. A. Churin^{1,2}

¹National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

²Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia, *Maria-Caurus7@yandex.ru*

Abstract. *Aconitum barbarum* the valuable medicinal plant, has a low number and limited distribution in the Tomsk region. The cyto-histological characteristics of the callus culture of *Aconitum barbarum* were studied. Several cytotypes were identified: meristematic-type (meristem-like – M), parenchymal type (parenchymal-like: P1, P2, P3, P4, P5) and giant cells (G).

Keywords: *callus culture, Aconitum barbarum Patr. ex Pers., cyto-histology*

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ *CONIUM MACULATUM* L.

М.В. Филонова^{1,2}, И.В. Шилова², Ю.В. Медведева¹, А.А. Чурин^{1,2}

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

²Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия. *Maria-Caurus7@yandex.ru*

Аннотация. *Conium maculatum* - растение, содержащее большое количество разнообразных биологически активных веществ. Произведено извлечение образцов из суспензионной культуры болиголова пятнистого и их анализ с помощью метода ГХ/МС. В суспензионной культуре выявлено наличие разнообразных групп веществ обладающих биологической активностью: фуранокумарины (бергаптен, изопимпинеллин, мармезин) моноциклические циклогексановые монотерпеноиды и ациклические тритерпеноиды, эфиры органических и жирных кислот, насыщенные алифатические углеводороды.

Ключевые слова: клеточная культура, *Conium maculatum* L., газовая хромато-масс-спектрометрия

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1411-1413

Введение. Растения служат источником биологически активных веществ (БАВ) с незапамятных времен. На основе лекарственного растительного сырья производят более трети лекарственных препаратов. Структура большинства БАВ настолько сложна, что растения зачастую являются их единственным источником. Хотя в стране ежегодно заготавливается тысячи тонн растительного лекарственного сырья, полученное количество не обеспечивает возможности фармацевтической промышленности [Сотникова, 2006].

Клеточная культура в промышленности используется для извлечения БАВ, так как является возобновляемым источником вторичных метаболитов и выращивается в контролируемых условиях, что является большим преимуществом данного способа получения сырья.

Болиголов пятнистый (*Conium maculatum* L.) – растение семейства зонтичные, токсичные свойства которого известны со времен Гиппократ, широко используется в народной медицине многих стран. Болиголов содержит разнообразные группы БАВ (флавоноиды, фуранокумарины, полиацетилены, сапонины, эфирные масла и др. [Vetter et al., 2004], что обуславливает широкий спектр фармакологической активности [Madaan et al., 2012].

Изучение суспензионной культуры болиголова пятнистого, позволит обосновать ее использование в качестве источника БАВ, и возможность дальнейшего масштабирования.

Для анализа извлечения полученных из клеточных культур болиголова пятнистого был выбран метод газовой хроматографии—масс-спектрометрии (ГХ/МС), который позволяет селективно и с высокой чувствительностью определять различные типы соединений в пробах, как правило, являющихся сложными смесями [Гладилович, Подольская, 2010].

Цель: исследовать БАВ суспензионной культуры болиголова пятнистого с помощью метода газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС).

Материалы и методы. Суспензионную культуру болиголова пятнистого выращивали в жидкой питательной среде MS состава, заявленного ранее [Филонова, 2016], в колбах объемом 250 мл на шейкере (скорость – 100 об/мин.). Объем заполнения колб питательной средой составлял 1/5 от объема колбы. Культуру выращивали при температуре 26 ± 1 °С и отсутствии света. Сбор материала осуществляли на 10 сут, клеточную массу отделяли от культуральной жидкости с помощью капрона, питательную среду фильтровали дополнительно через бумажный фильтр.

Исследованию подвергали замороженную 10-суточную культуру болиголова пятнистого, а так же питательную среду, на которой она выращивалась. Сырье экстрагировали подкисленной водой с последующей последовательной рекстракцией БАВ хлороформом из кислой и щелочной среды. Полученное кислое и щелочное хлороформное извлечение выпаривали до сухого остатка, который далее растворяли в 1,5 мл хлороформа. Исследование осуществляли на приборе Trace DSQ (Thermoelectron corp., США) с программным обеспечением Xcalibur 1.4. В работе использовали колонку 30 м×0,25 мм×0,25 мкм с сорбентом HP-5MS (5% – дифенил, 95% – диметилсилоксан) и запрограммированной температурой (от 50 до 300 °С со скоростью 10 °С/мин, изотерма при 300 °С – 14 мин). В качестве инертного газа-носителя применяли гелий. Температура испарителя – 280 °С. Данные получены в режиме ТІС и записаны в диапазоне 33-650 а.е.м. (m/z) для идентификации.

Результаты и выводы. В результате ГХ/МС исследования культуры болиголова пятнистого в кислом и щелочном хлороформном извлечении обнаружены: эфиры фталево́й кислоты (дибутилфталат, диизооктилфталат), производные жирных кислот (этилстеарат), ациклические тритерпеноиды (сквален). Дополнительно в кислом извлечении идентифицированы насыщенные алифатические углеводороды и производное жирных кислот (олеамид).

С помощью ГХ/МС-анализа в кислом хлороформном извлечении питательной среды суспензионной культуры выявлены: эфир фосфорной кислоты (трис(2-хлорэтил) фосфат), моноциклические циклогексановые монотерпеноиды (дегидровомифолиол), эфиры органических кислот (октадецилацетат, дибутилфталат, диизобутилфталат, диизооктилфталат), фуранокумарины (бергаптен, изопимпинеллин, мармезин), производные жирных кислот (олеамид), насыщенные алифатические углеводороды (гептакозан и др.).

В щелочном хлороформном извлечении определены: моноциклические циклогексановые монотерпеноиды (дегидровомифолиол), производные фенола (2,2'-метилден-бис (6-трет-бутил-4-метилфенол)), эфиры органических кислот (октадецилацетат, диизобутилфталат), производные жирных кислот (олеамид), ациклические тритерпеноиды (сквален), насыщенные алифатические углеводороды (гептакозан и др.).

С помощью метода ГХ/МС анализа в культуре болиголова пятнистого обнаружены вещества, обладающие биологической активностью: фталаты, сквален, олеамид. В извлечении из питательной среды на которой выращивалась культура также обнаружены биологически активные вещества – фталаты, сквален, олеамид как и в извлечении из культуры клеток, а так же фуранокумарины. Из литературных источников известно, что фуранокумарины обладают фотосенсибилизирующей [Иманлы, Серкерев, 2015], противоопухолевой [Sumiyoshi et al., 2014], противосудорожной [Luszczki et al., 2010], противомикробной [Benkiki et al., 2002] и противогрибковой [Al-Barwani, Eltayeb, 2004] активностью.

Ранее фуранокумарины были обнаружены в каллусной культуре болиголова пятнистого [Филонова и др., 2017]. Присутствие фуранокумаринов в экстракте, полученном из питательной среды, говорит о том, что клетки суспензионной культуры болиголова пятнистого выделяют данные вещества в питательную среду.

Литература

Гладилович В.Д., Подольская Е.П. Возможности применения метода ГХ-МС (обзор) // Научное приборостроение. – 2010. – Т. 20, № 4. – С. 36–49.

Иманлы Г.А., Серкерев С.В. Кумариновые производные корней *Angelica sachokiana* (Karjagin) Pimen. et. V. Tikhomirov // Химия растительного сырья. – 2015. – № 4. – С. 165–168.

Сотникова И.Ю. Флора лекарственных растений Ставропольского края и её анализ // Автореф. дис. канд. биол. наук. – Ставрополь, 2006. – С. 184.

Филонова М.В., Медведева Ю.В., Чурин А.А., Карначук О.В. Питательная среда для культивирования каллусной культуры болиголова пятнистого (*Conium maculatum* L.). Патент РФ № 2596402, заявитель и патентообладатель НИ ТГУ – опубл.: 10.08.2016 г. – Бюл. Изобретения полезные модели. – № 25. – С. 7.

Филонова М.В., Шилова И.В., Медведева Ю.В., Карначук О.В., Чурин А.А., Суслов Н.И. Способ получения биологически активных веществ в клеточной культуре *Conium maculatum* L. (болиголова пятнистого). Патент РФ № 2619182, заявитель и патентообладатель НИ ТГУ – опубл.: 12.03.2017. – Бюл. Изобретения полезные модели. – № 14. – С. 10.

Al-Barwani F.M., Eltayeb E.A. Antifungal compounds from induced *Conium maculatum* L. // Plants Biochemical Systematics and Ecology. – 2004. – No. 32. – P. 1097–1108.

Benkiki N., Benkhaled M., Kabouche Z., Bruneau C. Heraclenol and Isopimpinellin: Two Rare Furocoumarins from *Ruta montan* // Biodiversity. – 2012. – P. 303–307.

Luszczki J.J., Andres-Mach M., Glensk M., Skalicka-Wozniak K. Anticonvulsant effects of four linear furanocoumarins, bergapten, imperatorin, oxypeucedanin, and xanthotoxin, in the mouse maximal electroshock-induced seizure model: a comparative study // Pharmacol. Rep. – 2010. – No. 62. – P.1231–1236.

Sumiyoshi M., Sakanaka M., Taniguchi M., Baba K., Kimura Y. Anti-tumor effects of various furocoumarins isolated from the roots, seeds and fruits of *Angelica* and *Cnidium* species under ultraviolet A irradiation // J. Nat. Med. – 2014. – V. 68, No. 1. – P. 83–94.

GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRIC STUDIES OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF *CONIUM MACULATUM* L. SUSPENSION CULTURE

M. V. Filonova^{1,2}, I. V. Shilova², Y.V. Medvedeva¹, A. A. Churin^{1,2}

¹National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

²Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia, *Maria-Caurus7@yandex.ru*

Abstract. *Conium maculatum* is a plant containing a large number of various biologically active substances. Samples were extracted from the suspension cell culture of hemlock spotted and their analysis was provided with GC/MS method. The presence of various groups of substances that show biological activity was detected in a suspension cell culture: furanocoumarins (bergapten, isopimpinellin, marmesin) monocyclic cyclohexane monoterpenoids and acyclic triterpenoids, esters of organic and fatty acids, saturated aliphatic hydrocarbons.

Keywords: cell culture, *Conium maculatum*, gas chromatography mass spectrometry

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ НА МОРФОГЕНЕЗ ПРОРОСТКОВ *CYMBIDIUM HYBRIDUM* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Л.В. Хоцкова, Г.Я. Степанюк, Т.П. Астафурова

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия, lyubava77kh@gmail.com

Аннотация. Изучено влияние питательных сред и спектрального состава света на морфогенез проростков *Cymbidium hybridum*, выращенных в условиях *in vitro*. Выявлено, что лучшей для роста и развития проростков, выращиваемых на белом свете, является питательная среда MS с добавлением 1 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК. Большинство морфометрических показателей проростков, выращиваемых на безгормональной среде MS, возрастают с увеличением длины волны света в смешанном светопотоке.

Ключевые слова: свет, питательные среды, регуляторы роста, морфогенез, *Cymbidium*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1414-1417

Последние десятилетия пристальное внимание сосредоточено на создании новых форм и сортов экономически важных растений и методах их ускоренного размножения. Представители семейства *Orchidaceae* Juss. являются важными хозяйственно-ценными растениями, занимающими лидерские позиции цветочной промышленности, широко используются как срезочная и горшечная культура [Xhee et al., 1999; Коломейцева, 2014]. Однако многочисленные представители орхидных характеризуются медленным циклом развития, вступая в генеративную фазу лишь на 7–10 год жизни, что затрудняет их размножение и выращивание традиционными методами, поэтому возникает необходимость регулирования их роста и развития. Методы ускоренного размножения орхидей в культуре *in vitro* с использованием питательных сред и искусственных источников освещения позволяют преодолеть эти трудности [Коломейцева, 2014].

Целью нашего исследования являлось выявление особенностей роста и развития проростков *Cymbidium hybridum* в культуре *in vitro* на начальных этапах онтогенеза в зависимости от состава питательной среды и света разного спектрального качества.

В работе использовали гибридные проростки субтропической орхидеи *Cymbidium Sw.* собственной репродукции. Методом искусственного опыления цветков материнских растений *C. hybridum* сортов ‘Showgirl’ и ‘Lilian Stewart’ из коллекционного фонда тропических и субтропических растений Сибирского ботанического сада Томского государственного университета нами были получены гибридные семена F1 *Cymbidium* ‘Showgirl’×*Cymbidium* ‘Lilian Stewart’ (далее – *C. hybridum* F1). Семенное размножение орхидей *in vitro* проводили по общепризнанной методике [Черевченко, Кушнир, 1986] с использованием питательной среды Мурасиге–Скуга (MS) [Murashige, Skoog, 1962] типовой, безгормональной, (M) и модифицированной нами добавлением в нее экзогенных регуляторов роста: среда MS с добавлением 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,5 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (НУК) (C1) и среда MS с добавлением 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л НУК (C10) [Степанюк, Хоцкова, 2012].

Через 15 месяцев выращивания проростки *C. hybridum* F1 имели развитые побеги с 4–5 ярусами листьев и 2–3 корней, что являлось достаточным для их высадки *ex vitro* в нестерильные условия.

Источником света в нашем эксперименте служили белые и «цветные» люминесцентные лампы (Philips, 30 W). В работе было испытано четыре световых режима: контроль – белый свет «БС» и три опытных варианта – белый свет с

добавлением красного «БС+КС», синего «БС+СС» или зеленого света «БС+ЗС». Интенсивность света люминесцентных ламп во всех вариантах на уровне культуры протокормов была выровнена и составила 9,7 Вт/м², плотность потока квантов для всех ламп равнялась 30 $\mu\text{моль/м}^2\text{с}$. Культуры содержались при температуре 23±2 °С и относительной влажности 65%, 16-часовом фотопериоде. Статистический анализ морфометрических показателей проростков *C. hybridum* F1 был проведен с помощью пакета Statistica 8.0. В таблицах данные представлены как в виде средних арифметических ± стандартная ошибка, так и в процентном отношении к контролю. Достоверными считали различия с вероятностью ошибки p , не превышающей 0,05.

Сравнительное изучение влияния состава питательных сред на рост и развитие *C. hybridum* F1 показало (табл. 1), что на белом свету у проростков, растущих на среде MS с добавлением 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л НУК (С10), наблюдалось достоверное увеличение длины стебля и корня, в то время как средняя площадь листа, средняя суммарная площадь листьев растения (СПЛР) и сырая масса проростка изменялись незначительно. У проростков, выращенных на питательной среде MS с добавлением 1 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК (С1), наоборот, значительно увеличивалась длина корней и в большей степени возросли ростовые показатели листьев и сырой массы проростка, по сравнению с контролем и проростками, растущими на среде С10. Эти данные согласуются с результатами ряда исследователей, использующих подобные питательные среды для выращивания разных видов растений *in vitro* [Xhee et al., 1999].

Таблица 1.

Морфометрические параметры проростков *C. hybridum* F1, выращенных в условиях *in vitro* на разных питательных средах на белом свету (плотность потока квантов 30 $\mu\text{моль/м}^2\text{с}$)

Питат. среда	Длина стебля		Длина корня		Площадь листа		СПЛР		Сырая масса проростка	
	мм	%	мм	%	мм ²	%	мм ²	%	г	%
М	11,75± 1,58	100	7,63± 1,38	100	41,07± 3,63	100	212,19± 10,28	100	0,11± 0,002	100
С1	13,56± 1,95	115	13,71± 2,10	180	49,12± 4,57	120	251,08± 12,35	118	0,13± 0,003	118
С10	19,45± 1,50	166	8,83± 1,64	116	45,32± 3,33	110	226,59± 9,19	107	0,12± 0,002	109

Таким образом, нами выявлено, что питательная среда Мурасиге–Скуга с добавлением 1 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК для проростков *C. hybridum* F1, выращиваемых на белом свету, является наиболее оптимальной.

Известно, что большое значение для роста и развития растений в условиях *in vitro* имеет интенсивность и спектральный состав света [Shin et al., 2008; Namada et al., 2010; Soares et al., 2010; Mengxi et al., 2011]. В данном исследовании нами обнаружено, что белый свет, смешанный со светом «цветных» ламп, по-разному влиял на рост и развитие проростков *C. hybridum* F1, выращиваемых на типовой питательной среде Мурасиге–Скуга (табл. 2).

В большей степени на увеличение длины стебля проростков *C. hybridum* F1 оказывал белый свет, смешанный с зеленым или красным светом (соответственно, на 70% и 13% выше контроля), в то время как белый свет с добавлением синего приводил к уменьшению длины стебля. Длина корня проростков практически не отличалась от контроля при добавлении синего света к белому, в то время как при добавлении к белому свету зеленого и красного света наблюдалось увеличение длины корня, соответственно, на 85% и 193% выше контроля. Средняя площадь листа, суммарная

площадь листьев проростка и его сырая масса также увеличивались с увеличением длины волны. При этом максимальное увеличение данных морфометрических показателей получено на «белом+красном» свете, по сравнению с контролем. Таким образом, при выращивании проростков *C. hybridum* F1 на типовой питательной среде Мурасиге–Скуга морфометрические показатели корня, листа и сырая масса проростка возрастали с увеличением длины волны света, в то время как длина стебля была больше на белом свете, смешанным с зеленым светом. Полученные результаты исследования подтверждают закономерность, что усиление доли длинноволнового участка спектра в смешанном светопотоке увеличивает линейные размеры и площадь ассимилирующей поверхности растений, которая была выявлена и другими исследователями на разных видах растений [Appelgren, 1991; Карначук, Головацкая, 1998; Головацкая, Дорофеев и др., 2013].

Таблица 2.

Морфометрические параметры проростков *C. hybridum* F1, выращенных в условиях *in vitro* на типовой питательной среде MS на свету разного спектрального состава (плотность потока квантов 30 $\mu\text{моль/м}^2\text{с}$)

Свет	Длина стебля		Длина корня		Площадь листа		СПЛР		Сырая масса проростка	
	мм	%	мм	%	мм^2	%	мм^2	%	г	%
БС	11,75± 1,58	100	7,63± 1,38	100	41,07± 4,63	100	212,19± 10,28	100	0,11± 0,002	100
БС+СС	11,50± 0,56	98	7,64± 1,68	100	43,39± 3,84	106	227,80± 11,21	107	0,15± 0,002	136
БС+ЗС	19,92± 1,90	170	14,11± 1,97	185	49,47± 3,47	120	288,57± 12,52	136	0,20± 0,005	182
БС+КС	13,25± 0,66	113	22,33± 2,56	293	61,95± 5,91	151	371,67± 14,46	175	0,22± 0,004	200

Таким образом, полученные результаты показали зависимость роста и развития проростков *Cymbidium hybridum* в культуре *in vitro* от состава питательной среды и света разного спектрального состава на начальных этапах онтогенеза.

Статья написана в рамках научного проекта (№ 8.1.29.2018), выполненного при поддержке Программы повышения конкурентоспособности Томского государственного университета.

Литература

Головацкая И.Ф., Дорофеев В.Ю., Медведева Ю.В., Никифоров П.Е., Карначук Р.А. Оптимизация условий освещения при культивировании микроклонов *Solanum tuberosum* L. сорта Луговской *in vitro* // Вестник ТГУ. Биология. – 2013. – № 4. – С. 133–144.

Карначук Р.А., Головацкая И.Ф. Гормональный статус, рост и формирование растений, выращенных на свету разного спектрального состава // Физиология растений. – 1998. – Т. 45, № 6. – С. 925–934.

Катаева Н.В., Аветисов А.А. Клональное размножение растений в культуре ткани / В кн.: Культура клеток растений. – М.: Наука, 1981. – С. 137–149.

Коломейцева Г.Л. Крупноцветковые орхидеи в коллекции главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН (*Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Paphiopedilum*, *Phalaenopsis*). – М.: ГЕОС, 2014. – 296 с.

Степанюк Г.Я., Хоцкова Л.В. Биологические особенности видов рода *Phalaenopsis* Blume при выращивании в оранжереях Сибирского ботанического сада // Вестник ТГУ. Биология. – 2012. – № 4. – С. 105–117.

Черевченко Т.М., Кушнир Г.П. Орхидеи в культуре. – Киев: Наук. думка, 1986. – 200 с.

Appelgren M. Effects of light quality on stem elongation of *Pelargonium in vitro* // *Scientia Horticulturae*. – 1991. – V. 45, Is. 3–4. – P. 345–351.

Hamada K., Shimasaki K., Ogata T., Nishimura Y., Nakamura K., Oyama-Egawa H., and Yoshida K. Effects of spectral composition conversion film and plant growth regulators on proliferation of *Cymbidium* protocorm-like body cultured *in vitro* // *Environment Control in Biology*. – 2010. – V. 48. – P. 127–132.

Mengxi L., Zhigang X., Yang Y., Yijie F. Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration (Article) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2011. – V. 106, Is. 1. – P. 1–10.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – V. 15, No. 3. – P. 473–497.

Shin K.S., Murthy H.N., Heo J.W., Hahn E.J., Paek K.Y. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants // *Acta Physiol. Plant* – 2008. – V. 30. – P. 339–343.

Soares J.D.R., Pasqual M., Rodrigues F.A., and de Araujo A.G. Etiolation and artificial light in native and hybrid orchids under *in vitro* cultivation // *Ciencia Rural*. – 2010. – V. 40. – P. 1941–1947.

Xhee L.L.-H., Neok C.K.-L., Mui H.K.-W., Lek K.Q.-P. Orchid tissue culture in the gardens // *Garden Wise*. – 1999. – V. 13. – P. 17–19.

INFLUENCE OF GROWTH CONDITIONS ON MORPHOGENESIS OF *CYMBIDIUM HYBRIDUM* SEEDLINGS CULTURED *IN VITRO*

L.V. Khotskova, G.Ya. Stepanyuk, T.P. Astafurova

Tomsk State University, Tomsk, Russia, lyubava77kh@gmail.com

Abstract. The effect of the spectral light composition and nutrient media on the morphogenesis of *Cymbidium hybridum* seedlings cultured *in vitro* was studied. It was found that the best for the growth and development of seedlings grown on white light was the MS nutrient medium with the addition of 1 mg l⁻¹ BAP and 0.5 mg l⁻¹ NAA. Most of the morphometric parameters of seedlings grown on a non-hormonal medium MS, increase with increasing wavelength of light in a mixed light flux.

Keywords: light, nutrient media, growth regulators, morphogenesis, *Cymbidium*

ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ *IN VITRO* КУЛЬТИВИРУЕМЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ГЕНАМИ ДЕСАТУРАЗ

Е.В. Цыпурская, Т.Н. Николаева, Н.В. Загоскина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, elena-pr22@mail.ru

Аннотация. Проведено изучение состава фенольных соединений в *in vitro* культивируемых растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и полученных из них линий, трансформированных генами $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы (*desA*) и $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы (*desC*), методом тонкослойной хроматографии и денситометрии. Представлены данные о составе и содержании основных компонентов фенольного комплекса, извлекаемых из листьев растений 96%-ным этанолом.

Ключевые слова: картофель, *in vitro*, десатураза, фенольные соединения

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1418-1422

Фенольные соединения относятся к одним из наиболее распространенных вторичных метаболитов растений, значительно отличающихся по структуре и химическим свойствам [Запрометов, 1993]. Их функциональная роль разнообразна, включая и участие в защите клеток от стрессовых воздействий [Cheynier et al., 2013]. Фенольные соединения являются компонентами антиоксидантной системы [Меньщикова, 2006; Lin et al., 2006]. Они могут инактивировать активные формы кислорода, тем самым замедляя окисление липидов клеточных мембран [Kondo, Kawashima, 2000; Stefanowska et al., 2002].

Физическое состояние биологических мембран зависит от функционирования десатураз – ферментов, отвечающих за образование двойных (C=C) связей в цепях жирных кислот [Urchurch, 2008; Лось, 2014]. Известно, что десатуразы обладают высокой специфичностью по отношению к длине углеводородной цепи и к месту возникновения двойной связи. Первая двойная связь всегда формируется после 9-го атома углерода (ответственна $\Delta 9$ -ацил-липидная десатураза, *desC*), а вторая двойная связь – в положении $\Delta 12$ (ответственна $\Delta 12$ -ацил-липидная десатураза, *desA*). Отметим, что ненасыщенные жирные кислоты являются важными компонентами клеточных мембранных структур, и модификация их уровня имеет значение для текучести мембран, интеграции в мембранах рецепторов, образования вторичных переносчиков и клеточных сигнальных механизмов, которые необходимы для функционирования клеток как в нормальных условиях, так и при действии стрессовых факторов [Лось, 2005].

В настоящее время трансгенные растения широко используются как модели для фундаментальных исследований и решения прикладных задач, в том числе по созданию устойчивых форм растений [Вячеславова и др., 2012]. Это касается и введения генов десатураз, которые приводят к изменениям физических свойств мембран у трансформантов растений (за счет более высокого содержания ненасыщенных жирных кислот), что отражается на их физиолого-биохимических характеристиках, в том числе и биосинтезе фенольных соединений [Загоскина и др., 2014].

Целью нашего исследования являлось изучение основных компонентов фенольного комплекса контрольных и трансгенных растений картофеля, несущих ген $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы (*desC*) или ген $\Delta 12$ - ацил-липидной десатуразы (*desA*).

Объект и методы исследования. Объектом исследования являлись культивируемые в условиях *in vitro* растения картофеля (*Solanum tuberosum* L., раннеспелый сорт Скороплодный), а также полученные из них трансгенные линии, несущие гены десатураз. Для получения трансгенных линий использовали конструкции, несущие ген *desA* из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, или ген *desC* из цианобактерии *Synechococcus vulcanus*, под контролем сильного конститутивного промотора 35SCaMV. Последовательность гена десатуразы была трансляционно слита с последовательностью репортерного гена *licBM3*, кодирующего термостабильную лихеназу. Экспрессия целевого гена была подтверждена результатами полимеразной цепной реакции, а уровень экспрессии был оценен по активности лихеназы, входящей в состав гибридного белка [Герасименко и др., 2010].

Растения картофеля, культивируемые в условиях *in vitro*, размножали микрочеренкованием, используя агаризованную питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую 2% сахарозы. Их выращивали в пробирках в камере фитотрона ИФР РАН при +24 °С и 16 ч освещении (люминесцентные лампы белого света ЛБ-80, освещенность 100 моль квантов/м·с) в течение 5 недель. При проведении исследований использовали листья, взятые из средней части 45-дневных растений.

Фенольные соединения извлекали из растительного материала 96%-ным этанолом (45 °С, 45 мин). Надосадочную фракцию отделяли центрифугированием (13000 об/мин, 10 мин) и использовали для проведения тонкослойной хроматографии на пластинках, покрытых слоем микрокристаллической целлюлозы («Ferak» или «Merck», Германия). В качестве растворителя использовали смесь: н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:5, верхняя фаза).

Предварительную идентификацию фенольных соединений проводили на ультрамикроскопе DESAGA UVIS (“DESAGA”, Голландия) по специфической ярко-голубой или синей флуоресценции в УФ-свете (длина волны 254 и 366 нм). Для дальнейшей идентификации использовали качественные реакции со специфическими реагентами: смесью 1%-ного водного раствора хлорного железа (FeCl_3) и 1%-ного водного раствора калия железосинеродистого ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) – на все классы фенольных соединений; 1%-ным этанольным раствором хлористого алюминия (AlCl_3) с последующей идентификацией в УФ – свете (яркая желтая или желто-зеленая флуоресценция) – на флавоноиды, а также диазотированным п-нитроанилином с последующей обработкой 20% раствором карбоната натрия (Na_2CO_3) – на фенолкарбоновые кислоты [Запрометов, 1974].

Для более точной идентификации фенольных соединений хроматограммы сканировали на денситометре (Densitometer CD 50, Desaga, Heidelberg) при длинах волн 280 и 330 нм. Рассчитывали площади пиков каждого индивидуального соединения [Николаева и др., 2010].

Результаты и обсуждение. Ранее нами были отмечены различия в биосинтезе фенольных соединений у контрольных и трансгенных растений картофеля, выращенных в условиях *in vitro* [Загоскина и др., 2014]. Однако это касалось лишь содержания различных их классов, но не индивидуальных соединений, что и явилось предметом нашего исследования.

Согласно данным тонкослойной хроматографии и денситометрического анализа, состав фенольных соединений, извлекаемых этанолом из листьев контрольных и трансформированных генами *desA* и *desC* растений картофеля, отличался (рисунок, таблица).

В составе фенольного комплекса контрольных растений присутствует 5 основных соединений фенольной природы, у линий с геном *desA* – 6, а у линий с геном *desC* – 7. Во всех вариантах отмечено образование веществ 1 и 2, наибольший уровень которых

отмечается у линии с геном *desA*. Эти соединения имеют низкие значения Rf и одно из них (1) относится к фенолкарбоновым кислотам (таблица). Вещества 3 и 6 обнаружены только в трансгенных линиях *desA* и *desC* и не характерны для контрольного варианта.

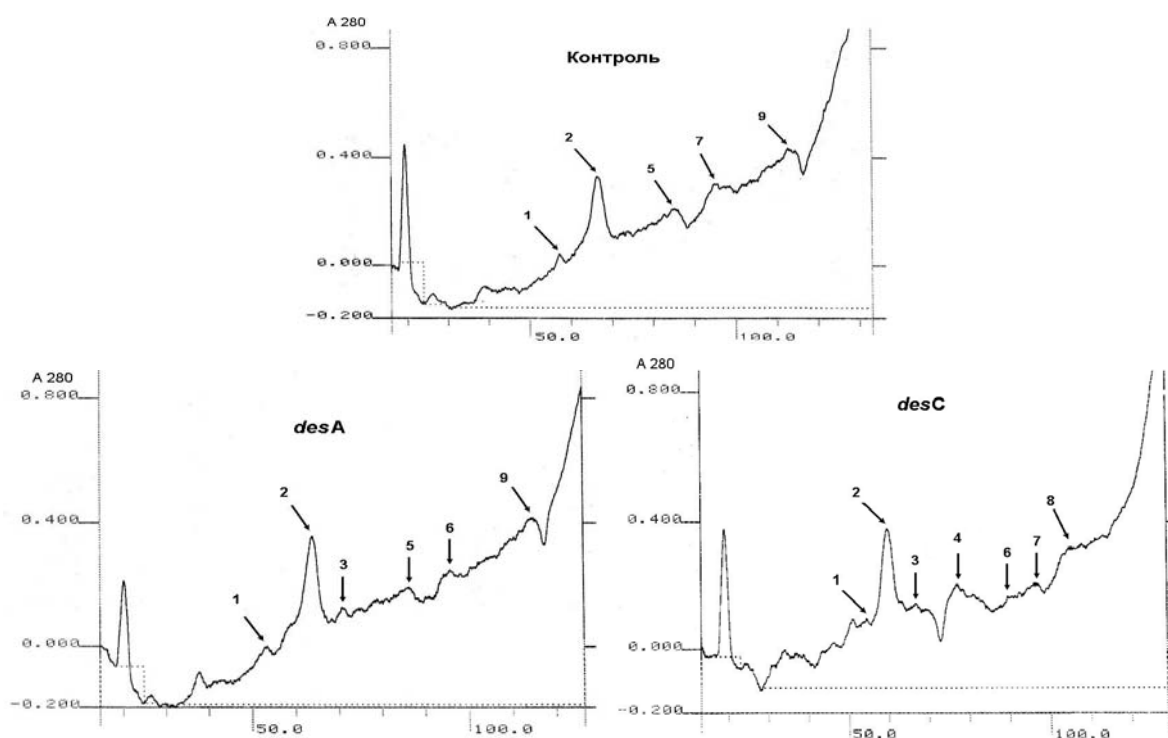


Рисунок. Денситограммы этанольных экстрактов листьев контрольных и трансгенных линий растений картофеля с генами *desA* и *desC*.

Таблица.
Основные компоненты фенольного комплекса контрольных и трансгенных растений картофеля

N в-ва	Rf	Реакция на:			Содержание в-ва (усл. ед.×10 ⁻²) контроль/ <i>desA</i> / <i>desC</i>	Соединение
		ФС*	ФЛ**	ФКК***		
1	0,29	+	-	+	11,9/16,3/9,5	ФКК
2	0,35	+	-	-	45,1/52,4/31,0	ФС
3	0,41	+	-	-	0/11,8/13,0	ФС
4	0,47	+	-	-	0/0/18,2	ФС
5	0,54	+	+	-	6,5/ 11,1/0	ФЛ
6	0,58	+	+	-	0/28,7/20,3	ФЛ
7	0,62	+	+	-	22,1/0/22,1	РУТИН
8	0,70	+	-	-	0/0/34,3	ФС
9	0,77	+	-	-	11,3/12,2/0	ФС

*ФС – фенольные соединения; **ФЛ – флавоноиды; ***ФКК – фенолкарбоновые кислоты

Следует также отметить, что для листьев растений картофеля, культивируемых в условиях *in vitro*, характерно образование рутина – одного из наиболее распространенных флавоноидных соединений [Запрометов, 1993]. При этом он был обнаружен в растениях контрольного варианта и трансгенной линии *desC* (в одинаковом количестве).

Исходя из полученных данных, можно заключить, что введение генов десатураз *desA* и *desC* в геном растений картофеля, приводит к изменениям в биосинтезе фенольных соединений, что проявляется на уровне содержания и состава отдельных их представителей.

Литература

Вячеславова А.О., Бердичевец И.Н., Тюрин А.А., Шимшилашвили Х.Р., Мустафаев О., Голденкова-Павлова И.В. Экспрессия гетерологичных генов в растительных системах: новые возможности // Генетика. – 2012. – Т. 48, №. 11. – С. 1245–1245.

Герасименко И.М., Сахно Л.А., Головач И.С., Кищенко Е.М., Шимшилашвили Х.Р., Голденкова-Павлова И.В. Получение растений, несущих гены ацил-липидных десатураз цианобактерий // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14 (1). – С. 127–133.

Загоскина Н.В., Прядёхина Е.В., Лапшин П.В., Юрьева Н.О., Голденкова-Павлова И.В. Морфофизиологические и биохимические характеристики растений картофеля с различными уровнями экспрессии гена $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы // Известия РАН. Серия биологическая. – 2014. – № 2. – С. 142–149.

Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений: учебное пособие. – Высшая школа, 1974. – 211 с.

Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. – 272 с.

Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. – М.: Научный мир, 2014.

Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений // Вестник Российской академии наук. – 2005. – Т. 75, №. 4. – С. 338–345.

Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 556 с.

Николаева Т.Н., Заварзина А.Г., Лапшин П.В., Заварзин А.А., Загоскина Н.В. Водорастворимые фенольные соединения *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. // Ин-т физиологии растений РАН. – М.: Научный мир, 2010. – 400 с.

Cheynier V., Comte G., Davies K. M., Lattanzio V., Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology // Plant Physiology and Biochemistry. – 2013. – V. 72. – P. 1–20.

Kondo N., Kawashima M. Enhancement of the tolerance to oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by UV-B irradiation: possible involvement of phenolic compounds and antioxidative enzymes // J. Plant Research. – 2000. – V. 113, No. 3. – P. 311–317.

Lin C.M., Chen C.T., Lee H.H., Lin J.K. Prevention of cellular ROS damage by isovitexin and related flavonoids // Planta Med. – 2002. – V. 68. – P. 365–367.

Stefanowska M., Kuraś M., Kacperska A. Low temperature-induced modifications in cell ultrastructure and localization of phenolics in winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.) leaves // Annals of Botany. – 2002. – V. 90, No. 5. – P. 637–645.

Upchurch R.G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress // Biotechnol. Lett. – 2008. – V. 30. – P. 967–977.

**CHANGES OF THE COMPOSITION OF PHENOLIC COMPOUNDS
IN THE TRANSFORMATION *IN VITRO* OF CULTIVATED POTATO PLANTS
WITH THE GENES OF DESATURASES**

E.V. Tsyurskaya, T.N. Nikolaeva, N.V. Zagoskina

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia, *elena-pr22@mail.ru*

Abstract. The composition of phenolic compounds the control and potato plants (*Solanum tuberosum* L., Skoroplodnyi cultivar) transformed with the $\Delta 12$ acyl-lipid desaturase gene (*desA*) and the $\Delta 9$ acyl-lipid desaturase gene (*desC*) were compared by thin-layer chromatography and densitometry. Data on the composition and content of the main components of the phenolic complex extracted from plant leaves with 96% ethanol are presented.

Keywords: *potato, in vitro, desaturase, phenolic compounds*

***LYCIUM BARBARUM* L. (ГОЖИ) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*, СОРТ ЭРМА**

Н.Г. Чоркинэ, М.А. Табара, А.И. Кутковски-Муштук, М.И. Трофим, М.Н. Лозински

Ботанический сад (Институт) Академии наук Молдовы, Кишинев, Молдова, ninaciorchina@mail.ru

Аннотация. Для инициирования культуры *in vitro* *Lycium barbarum* L., сорта Эрма инокулировали меристемы и верхушечные апексы с первичными примордиями, на питательную среду (MS), дополненную повышенной концентрацией ауксинов и цитокининов ANA и BAP. На 20-25 день отмечалось увеличение пролиферации, количества побегов и их длины на один эсплант. Полученные результаты показывают, что на питательной среде для микроклонирования витропобегов, пролиферированных из меристем, наблюдались и процессы корнеобразования (ризогенез).

Ключевые слова: *витрокультура, Гожу, Lycium barbarum, питательные среды, фитогормоны*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1423-1426

Микроклонирование метод вегетативного размножения хорошо известный и зарекомендовавший себя своими теоретическими и прикладными преимуществами для регенерации некоторых видов, форм, сортов трудно размножаемых традиционными способами (семенами, черенками, прививками и т.д.) [Fira et al., 2016] Имеет своей целью быстрое микротиражирование растений, получение оздоровленного безвирусного посадочного материала, создание новых продуктивных сортов, устойчивых к различным стрессогенным физическим и химическим факторам. [Fira, Clara, 2011].

Lycium barbarum L. последние 2 десятилетия притягивает к себе живой интерес, благодаря своим терапевтическим и питательным качествам, и очевидна необходимость в разработке технологии получения посадочного материала высокого качества посредством витрокультуры, что наиболее рентабельно. В статье приводятся результаты исследований по выявлению морфогенетического потенциала у различных типов эсплантов, посредством тестирования и установления фаз и периода инициирования и введения в культуру, роста развития и укоренение в условиях *in vitro*, *ex vitro* на различных питательных средах, субстратах и хорошо подобранных оптимальных условий культивирования. [Hu et al., 2001].

Lycium barbarum L. чаще известен под названием гожи уже более 2000 лет в качестве крайне полезного растения Тибета сем. Solanaceae. Культивирование гожи имеет свои преимущества и большое значение с экономической точки зрения, медицинской, питания (нутриции). Среднегодовой урожай фруктов гожи свыше 6,0 т на один гектар, фрукты ценны тем, что содержат значительное количество минералов: Mg, Fe, Ca, K, Cu, Se, 18 аминокислот, Vit A, C, Vit группы B: B₂, B₆, Vit E, полисахариды, ненасыщенные жирные кислоты, каротиноиды, фитостероиды и фенолы [Donno et al., G. 2015]. Goji самый сильный антиоксидант из всех известных фруктов существующих в мире и по содержанию каротина тоже стоит на первом месте [Hu et al., 2006; Jing, Yin, 2010]. Для получения качественного посадочного материала и аргументированного внедрения его в агропромышленный сектор необходимо иметь продуктивный сорт, изученный биоморфологически, адаптированный и акклиматизированный к конкретным условиям культивирования.

Экспериментальная работа проводилась в Лаб. Эмбриологии и Биотехнологии в 2015-2017 годах, в качестве биологического материала использовали сорт Эрма,

выведенный в Аграрном Университете г. Клуж-Напока Республики (Румыния) и любезно был предоставлен нам коллегами для интродукции и инициации этого сорта в Молдове [Clara et al., 2013; Fira, Clara, 2011]. С этой целью были отобраны экспланты порядка 2,0 см в мае месяце у растений открытого грунта и из теплицы. Стерилизация осуществлялась в 2 этапа: первый этап состоял в предварительной дезинфекции в течение 15 мин. В слабом растворе $KMnO_4$ (0,05%) и несколько капель Tween-20, затем следуют 3 полоскания дистиллированной водой. Второй этап, в котором экспланты были экспонированы в стерилизующем растворе диацета 0,1% в течение 7 мин при постоянном взбалтывании, по истечении времени раствор сливали и экспланты промывали 4 раза дистиллированной, автоклавированной водой. Варианты эксперимента состояли из различных комбинаций фитогормональных регуляторов роста, входящих в состав питательных сред и в зависимости от проводимых операций:

1. Для введения в культуру *in vitro* инокулировали меристемы на базовую среду MS-100%, агаризованную и дополненную 0,5 мг/л ВАР, в пробирки диаметром 2,0 см и 20 см длиной, количество среды в каждой пробирке составляет – 15,0 мл. В пробирку инокулируют один эксплант, которая достигает 6-10 см в течение 25-30 дней.

2. Микропобеги подвергают делению на фрагменты, обычно 4-5 см, для ризогенеза на новую среду MS-100%, агаризованную или жидкую с различной концентрацией АНА и ВАР в шести опытных вариантах. Были протестированы верхушечные, средние и нижние микрочеренки с 1-2 парами листочков. Базальную часть с хорошо развитой корневой системой отправляем на *ex vitro* для укоренение (табл. 1)

3. Процесс ризогенеза миничеренков стимулировали добавлением в состав жидкой питательной среды различные варианты ауксинов АІВ и АІА (табл. 2). Контрольный вариант был безгормональный.

4. Статистические подсчеты проводились в программе Soft Excel.

Таблица 1.

Влияние различных концентраций ВАР и АНА на процесс микроклонирования *in vitro* la *Lycium barbarum* L, Murashige & Skoog 1962 (MS)

Варианты опыта	Регуляторы роста	Процент жизнеспособных инокулянтов, %	Средняя длина минипобегов, (см) ES*	Число минипобегов SE*
V1	0,2mg/l ВАР	80	3.0 ± 0.4	2.4 ± 0.2
V2	0,4mg/l ВАР	85	4.0 ± 0.3	5.4 ± 0.3
V3	0,6mg/l ВАР	90	5.0 ± 0.6	5.2 ± 0.4
V4	0,6mg/l ВАР+0,6mg/l АНА	95	6.0 ± 0.3	19.7 ± 0.5
V5	0,4mg/l ВАР+0,4mg/l АНА	75	3.5 ± 0.3	15.9 ± 0.4
V6	0,2mg/l ВАР+0,2mg/l АНА	65	2.0 ± 0.3	5.3 ± 0.4

Анализируя результаты опытов, констатируем, что вид *Lycium barbarum* L., сорт Эрма, характеризуется позитивной реактивностью апикальной меристемы в качестве биологического материала и в этом отношении отмечены питательные среды 4, 3, 2 (табл. 1)

Влияние регуляторов роста ВАР и АНА на процесс микроклонирования. Увеличение концентрации ВАР в питательной среде прямо пропорционально по отношению к длине минипобега (табл. 1) и провоцирует пролиферацию большого количества адвентивных почек, а увеличение АНА благоприятно влияет на длину микропобегов у витрокультур [Ibrahim et al., 2005].

Следует отметить: на среде, дополненной 0,6 мг/л ВАР, развиваются более 20 адвентивных минипобегов, на варианте с концентрацией 0,4 мг/л ВАР имеем 15

мини побегов, концентрация 0,2 мг/л ВАР дает только 6 мини побегов.

Влияние сахарозы на рост и развитие мини побегов. Для удешевления посадочного материала и оптимизации сред сахарозу заменили на продовольственный сахар, что оказалось эффективным и рентабельным. Сахар в концентрации 30 г/л приводит к мощному развитию мини побегов, у которых наблюдаем яркий блестящий цвет листьев. За период порядка 30 дней на среде с повышенной дозой сахара мини побеги достигают более 6 см в длину, на 2 см больше по сравнению с контролем и на 3 см по сравнению с вариантом 15,0 г/л сахара [Kuria et al., 2008].

Ризогенез *in vitro*. Для развития корневой системы у витрокультур была протестирована жидкая питательная среда М-S-100% в семи вариантах, результаты этих исследований представлены в табл. 2. Из всех сред следует отметить питательную среду V-6 – М-S-100%б дополненную 1,0 мг/л АІВ, как наиболее оптимальную и адекватную на которой 93% мини побегов образуют развитую корневую систему. На 14 день наблюдаем появление корешков, а на 20-30 день витрокультура достигает развития, когда может быть использована в качестве биологического материала для микро черенкования. В норме побег для черенкования достигает в длину 10-12 см, из него обычно получаем 4-5 микро черенков 2,0-2,2 см каждый.

Таблица 2.

Способность корнеобразования мини побегов полученных *in vitro* из эксплантов культивируемых на питательной среде MS дополненной АІА și АІВ

Варианты опыта	Регуляторы роста (mg/l)		Процент ризогенеза, %	Число развитых корешков, (SE)**
	АІА	АІВ		
V1	00	00	23	1.0 ± 0.12
V2	0.5	-	60	2.3 ± 0.37
V3	1.0	-	70	3.2 ± 0.38
V4	2.0	-	73	5.6 ± 0.38
V5	-	0.5	54	4.3 ± 0.36
V6	-	1.0	93	8.3 ± 0.87
V7	-	2.0	70	6.3 ± 0.36

Процесс перевода витрокультуры из условий *in vitro* и *ex vitro*. Следует отметить, что процесс формирования корневой системы протекает без особых трудностей. Для *ex vitro* тоже характерна хорошая приживаемость при адекватном субстрате, влажности и температуре и составляет 90-95%. Процедура перевода транспланта осуществляется следующим образом: растения извлекают из пробирки, промывают от остатков питательной среды в слабом растворе 0,05% КМnO₄, при этом корешки при необходимости укорачивают, после чего растения сажают в субстрат, составляющие которого – торф и песок в пропорции 1:1, рН5,5-5,8, песок речной, тщательно промытый. Посадка проводится в специальные ячеистые паллеты, которые первую неделю укрывают прозрачными каркасами, для поддержания влажности, проветривание растений проводится 2-3 раза в день и при необходимости увлажняется субстрат пульверизатором. По истечении 7-10 дней каркас убирают и еще 15 дней растения могут быть пересажены в паллеты с ячейками большего диаметра или вегетационные сосуды в субстрат, состоящий из чернозема, песка, перлита и листовой почвы.

Анализируя, полученные результаты, сопоставляя их с литературными данными [Fira et al., 2016; Jing, Yin, 2010], можем утверждать, что данный метод, оптимизированный и апробированный нашими исследованиями, может быть использован для получения качественного посадочного материала для промышленных плантаций.

Литература

- Clapa D., Fira A., Joshee N. An Efficient *ex vitro* rooting and acclimatization method for horticultural plants using float hydroculture // Hortscience. – 2013. – V. 48. – P. 1159–1167.
- Donno D., Beccaro G.L., Mellano M.G., Cerutti A.K., Bounous G. Goji berry fruit (*Lycium* spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation // J. Funct. Food. – 2015.
- Fira A., Clapa D. Results regarding *in vitro* proliferation in goji (*Lycium barbarum*) // Bulletin UASVM Horticulture. – 2011. – V. 68 (1). – 503 p.
- Fira A., Joshee N., Cristea V., Simu M., Hârța M., Pamfil D., Clapa D. Optimization of micropropagation protocol for goji berry (*Lycium barbarum* L.) // Bulletin UASVM Horticulture. – 2016. – V. 73 (2). – DOI:10.15835/buasvmcn-hort:12177.
- Hu Z., G.-Q. Guo, D.-L. Zhao, L.-H. Li, G.-C. Zheng. Shoot regeneration from cultured leaf explants of *Lycium barbarum* and agrobacterium-mediated transformation // Russian Journal of Plant Physiology. – 2001. V. 48 (4). – P 453–458.
- Hu Z., Hu Y., Gao H-H., Guan X-Q., Zhuan D-H. Callus production, somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lycium barbarum* root explants // Biol. Plantarum. – 2008. – V. 52. – P. 93–96
- Hu Z., Wu Y-R., Li W., Gao H-H. Factors affecting agrobacterium tumefaciens – mediated genetic transformation of *Lycium barbarum* L. – *In Vitro Cell Dev-Pl.* – 2006. – V. 42. – P. 461–466.
- Ibrahim K.M., Kazal M.A., Rasheed K.I. Alternative gelling agents for potato tissue culture applications // Majalah Al-Istitsmary Al-Zara'y. – 2005. – V. 3. – P. 80–83.
- Jing L., L. Yin. Antihyperglycemic activity of polysaccharide from *Lycium barbarum* // Journal of Medicinal Plants Research. – 2010. – V. 4 (1). – P. 23–26.
- Kuria P., Demo P., Nyende A.B., Kahangi E.M. Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the *in vitro* micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). – Afr. J. Biotechnol. – 2008. – V. 7. – P. 301-307.

LYCIUM BARBARUM L. (GOJI) IN VITRO ORGANOGENESIS THE ERMA VARIETY

N.G. Ciorchină, M.A. Tabara, A.I. Cutcovschi-Muștuc, M.I. Трофим, M.P. Lozinschi

Botanical Garden of the Academy of Sciences of Moldova, Chisinau, Republic of Moldova, ninaciorchina@mail.ru

Abstract. For the initiation of *in vitro* of goji, shoot apex pieces, inoculated in cultura medium Murashige-Scoog (MS), supplemented with hormones of different concentration ANA and BAP. When higher doses of ANA and BAP were used, there was proliferation of shoots and an increase in their length in the Erma variety. The experiments aimed at determining the rooting capacity of plantlets *in vitro* were organized depending on the culture medium. Thus, irrespective of the combination and concentration of growth, it had a positive influence on the rooting capacity of the shoots

Keywords: organogenesis, medium nutrition, *in vitro*, growth regulators, variety

ИЗМЕНЕНИЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И УРОВНЯ БЕЛКА ПРОТОННЫХ НАСОСОВ ТОНОПЛАСТА КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ВУ-2 В ХОДЕ РОСТА РАСТЯЖЕНИЕМ

Т. Чэнь, А.А. Кирпичникова, С.Б. Теплякова, Д.А. Романюк, В.В. Емельянов, М.Ф. Шишова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия, mshishova@mail.ru

Аннотация. H^+ -АТФаза и H^+ -пирофосфатаза тонопласта используют энергию, освобождающуюся при гидролизе АТФ и пирофосфата. Эти ферменты являются компонентами протонной сигнальной системы и рН-стата клетки. В связи с тем, что данные о возможном соподчинении активности H^+ -помп тонопласта, а также зависимости такового от физиологического статуса клетки фрагментарны, данное исследование нацелено на анализ изменения активности протонных помп тонопласта в ходе роста растяжением на примере клеток суспензионной культуры табака ВУ-2 дикого типа и линии NAS.

Ключевые слова: *рост растяжением, H^+ -АТФаза, тонопласт*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1427-1430

В клетках растений имеется большое число ферментов, которые катализируют разнообразные биохимические процессы. Среди этих ферментов особое место принадлежит H^+ -АТФазе плазмалеммы и тонопласта. H^+ -АТФаза использует энергию, освобождающуюся при гидролизе АТФ для того, чтобы переносить через клеточную мембрану ионы водорода. Тем самым, создается электрохимический градиент ионов водорода, который имеет огромное значение в поддержании жизнеспособности растительной клетки. Аналогично, H^+ -пирофосфатаза тонопласта использует энергию, освобождающуюся при гидролизе пирофосфата, для генерации электрохимического градиента ионов водорода на вакуолярной мембране. Совместно с H^+ -АТФазой плазмалеммы эти ферменты являются важнейшими компонентами протонной сигнальной системы и рН-стата растительной клетки. Предполагается совместное участие протонных помп тонопласта и плазмалеммы в реализации специфичного для растительных клеток роста растяжением. Хорошо известно, что ауксин специфично стимулирует работу H^+ -АТФазы плазмалеммы, однако данные о регуляции протонной АТФазы тонопласта отсутствуют.

У растений протонная V-АТФаза тонопласта осуществляет целый ряд функций, в первую очередь, поддержание ионного и метаболического гомеостаза посредством генерации трансмембранного потенциала на тонопласте [Dettmer et al., 2006; Schumacher, 2006]. Данный фермент идентифицируется в мембранах провакуолей, эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и т.д. Растительные V-АТФазы принимают участие в процессах эндо- и экзоцитоза и играют важную роль в регуляции эмбрионального развития и роста клеток растяжением [Strompen et al., 2005; Dettmer et al., 2006; Schumacher, 2006]. Она представляет собой широко распространенный H^+ -транспортирующий фермент эукариотических клеток и состоит из нескольких субъединиц, образующих два домена: периферический надмембранный (V1) и мембранный интегральный (Vo). Домен Vo обеспечивает транспорт протонов, а V1 осуществляет гидролиз АТФ [Beyenbach, Wiczorek, 2006; Martinoia et al., 2007]. Предполагают, что сначала происходит сборка доменов, а затем их объединение с образованием функционально активного фермента. H^+ -пирофосфатаза использует энергию пирофосфата для генерации протонного градиента [Maeshima, 2000]. Для ряда

организмов, включая растения, было показано наличие двух типов пиррофосфатаз, различающихся своей активностью, значением и локализацией в клетке [Drozdowicz, Rea, 2001]. К сожалению, достаточно долго этот протон-транспортирующий фермент исследовался не столь активно, как уже рассмотренные выше представители протонных АТФаз. В связи с этим особый интерес представляет анализ изменения активности вакуолярных протонных насосов в ходе роста растяжением.

Исследование проведено на клетках суспензионной культуры табака ВУ-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Bright Yellow*) дикого типа и линии NAS (рис. 1), характеризующейся пониженным содержанием ауксинсвязывающего белка 1 (АСБ1). Этот белок, предположительно, участвует в рецепции и/или трансдукции ауксинового сигнала. Однако механизм его участия достаточно дискусионен.

Поэтому в нашей работе были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать интенсивность работы протонных помп тонопласта в ходе роста растяжением;
2. Оценить экспрессию генов, кодирующих H^+ -пиррофосфатазу тонопласта и субъединицы вакуолярной H^+ -АТФазы, в ходе роста растяжением;
3. Выявить роль АСБ1 в регуляции работы протонных насосов тонопласта в ходе роста растяжением.

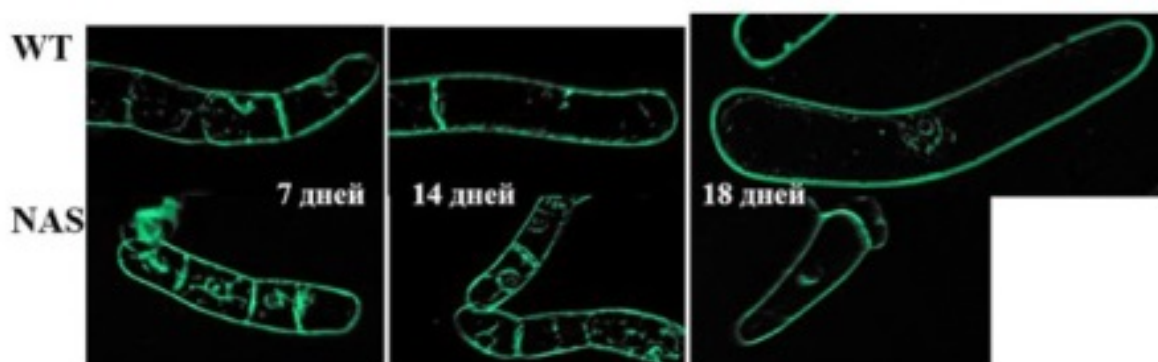


Рис. 1. Фотографии клеток суспензионной культуры.

В результате наших экспериментов показано усиление экспрессии генов, кодирующих субъединицы G1 и В H^+ -АТФазы тонопласта, на 14 день развития культуры табака ВУ-2 дикого типа. Именно этот этап развития характеризовался максимальным ростом растяжения. Усиление экспрессии согласуется с увеличением содержания субъединиц в составе тонопласта, что подтверждается блотт-анализом. Дальнейшие эксперименты были проведены с использованием очищенной фракции тонопласта, полученной разделением с помощью сахара/сорбит градиента. Чистота фракции доказана в присутствии специфичного ингибитора – бафиломицина, который практически полностью ингибировал гидролитическую активность фракции (рис. 2). Последующий анализ интенсивности гидролиза H^+ -АТФазы тонопласта показал, что функция фермента была максимальной именно на 14 день развития культуры и, как видно из рис. 1, на этапе интенсивного роста растяжением.

Совершенно иной была закономерность для клеток линии NAS. Показано отсутствие существенного усиления роста растяжением у этих клеток. Показано также отсутствие усиления экспрессии генов, кодирующих субъединицы H^+ -АТФазы тонопласта, что коррелировало с отсутствием увеличения содержания соответствующих белков в составе вакуолярной мембраны. Следует отметить и то, что

усиление гидролитической активности фермента на 14 день развития выявить не удалось.

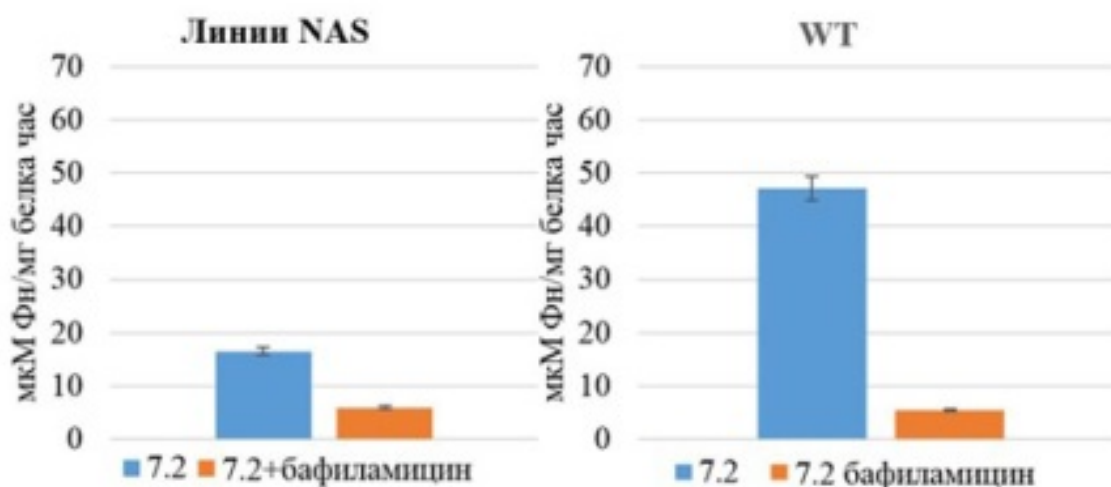


Рис. 2. Ингибиторный анализ H^+ -АТФазы тонопласта клеток суспензионной культуры табака.

У клеток табака пирофосфатаза кодируется несколько генами. Полученные результаты указывают, что 2 из 3-х проанализированных генов отличаются снижением уровня накопления транскриптов у культуры клеток табака дикого типа. Это снижение экспрессии полностью согласуется с данными об уменьшении числа ферментов в составе тонопласта и линейным снижением гидролитической активности фермента.

Клетки линии NAS характеризовались, напротив, усилением интенсивности экспрессии генов, кодирующих ферменты и гидролитической активности самого фермента на 2 неделю, что больше соответствовало изменениям H^+ -АТФазы.

Таким образом, на модельной системе, представленной синхронизированными клетками суспензионной культуры табака ВУ-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Bright Yellow*), выявлены различия в характере экспрессии генов, кодирующих субъединицы H^+ -АТФазы тонопласта и пирофосфатазы, согласующиеся с накоплением белков в составе соответствующих мембран и их гидролитической активности в ходе роста растяжением. Впервые показано участие АСБ1 в регуляции работы протонных помп тонопласта.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00743, с использованием оборудования Ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Литература

Beyenbach K.W., Wieczorek H. The V-type H^+ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation // *J. Exp. Biol.* – 2006. – V. 209. – P. 577–589.

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. – V. 18. – P. 715–730.

Drozdowicz Y.M., Rea P. Vacuolar H^+ pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream // *Trends Plant Sci.* – 2001. – V. 6, No. 5. – P. 206–211.

Gruber G., Wieczorek H., Harvey W.R. Muller V. Structure-function relationship of A-, F- and V-ATPases // *J. Exp. Biol.* – 2001. – V. 204. – P. 2597–2605.

Martinoia E., Maeshima M., Neuhaus H. E. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism // J. Exp. Bot. – 2007. – V. 58, No. 1. – P. 83–102.

Maeshima M. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – V. 1465, No. 1-2. – P. 37–51.

Strompen G., Dettmer J., Stierhof Y.-D. et al. Arabidopsis vacuolar H⁺-ATPase subunit E isoform is required for golgi organization and vacuole function in embryogenesis // Plant J. – 2005. – V. 41. – P. 125–132.

Schumacher K. Endomembrane proton pumps: connecting membrane and vesicle transport // Curr. Opin. Plant Biol. – 2006. – V. 9. – P. 595–600.

THE SHIFT IN HYDROLYTIC ACTIVITY AND PROTEIN LEVEL OF TONOPLAST PROTON PUMPS IN TOBACCO CELLS OF A SUSPENSION CULTURE BY-2 DURING ELONGATION GROWTH

T. Chen, A.A. Kirpichnikova, S.Teplyakova, D. Romanyuk, V. Yemelyanov, M. Shishova

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Saint-Petersburg State University», St. Petersburg, Russia, *mshishova@mail.ru*

Abstract. Tonoplast H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase use energy released during hydrolysis of ATP and pyrophosphate. These enzymes are components of the proton signaling and pH-stat system of plant cells. A possible mechanism of cross-regulation of these enzymes during physiological changes in tested cells is still under discussion. This investigation is focused on changes in tonoplast proton pumps activity during elongation growth and was provided with tobacco suspension culture By-2 (wt and NAS lines).

Keywords: *elongation growth, H⁺-ATPase, pyrophosphatase, tonoplast*

МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *SALVIA* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

М.Н. Ящуревская, М.Ю. Чередниченко

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия, michael.tsch@gmail.com

Аннотация. Род Шалфей (*Salvia* L.) включает почти 1000 видов, из которых лишь для наиболее распространенных и изученных с точки зрения вторичного метаболизма разработаны методики культивирования *in vitro* (например, шалфей лекарственный). В данной работе сравнивается эффективность каллусогенеза и органогенеза у представителей 3 видов: *S. officinalis* L., *S. sclarea* L., *S. viridis* L. Изучено влияние гормонального состава питательной среды Мурасиге и Скуга для данные показатели.

Ключевые слова: *Salvia*, *in vitro*, каллусогенез, органогенез

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1431-1433

Для различных видов рода *Salvia* L., представляющих интерес как лекарственные, ароматические, декоративные или редкие, эндемичные виды, в последние два десятилетия проведен ряд исследований, направленных на усовершенствование методов регенерации *in vitro* и разработку протоколов микроразмножения. В этих работах для клонального размножения использовали пазушные или апикальные почки, узловыи сегменты стебля, различные экспланты из проростков *in vitro*.

Направления исследований *in vitro* включают:

- изучение биологии культивируемых клеток и тканей *in vitro* [Skala, Wysokinska, 2004];
- клеточную селекцию *in vitro* на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам среды [Игнатова, 2011];
- клональное микроразмножение в культуре изолированных меристем [Makunga, van Staden, 2008];
- культуру гибридных зародышей [Cuenca, Amo-Marko, 2000] и др.

При этом основной объем исследований по культивированию представителей рода *Salvia in vitro* посвящен немногочисленным видам, прежде всего, шалфеем лекарственному – *Salvia officinalis* L. [Heistein, 1986; Endreb, 1994; Then et al., 2004].

Задачей данного этапа работы по подбору оптимальных культивирования *in vitro* для различных видов рода *Salvia* L. было сравнение эффективности каллусогенеза и органогенеза у представителей 3 видов рода: *Salvia officinalis* L. (шалфей лекарственный, семена производства агрофирмы АС-селекция), *Salvia sclarea* L. (шалфей мускатный, семена производства агрофирмы АС-селекция) и *Salvia viridis* L. (шалфей зеленый, сорт Букет, семена производства компании Johnsons Seeds, Великобритания).

Так как шалфей зеленый нечасто становится объектом биотехнологического изучения, необходимо отметить некоторые его характеристики. Синонимичными русскими названиями являются: шалфей хорминумовый, шалфей горминовый, шалфей хохлатый, сальвия хорминумовая. Встречается в Северной Африке, Южной Европе, на Кавказе и Ближнем Востоке. Произрастает по сухим каменистым склонам, на полях. Растение высотой 10...40 см. Стебель прямой, простой или от основания дважды ветвистый, по всей длине густо опушенный.

Экспланты получали из асептических микрорастений после образования 5...6-ой

пары настоящих листьев [Yaschurevskaya, Cherednichenko, 2017]. Использовали 3 типа эксплантов: листовые (5×5 мм), стеблевые (длиной 5...7 мм) и узловые (узел + 2...3 мм выше и ниже узла). Экспланты помещали в чашки Петри на питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением фитогормонов и регуляторов роста: (1) 3 мг/л 2,4-Д, (2) 1 мг/л БАП, (3) 3 мг/л БАП, (4) 1 мг/л БАП + 0,1 ИУК, (5) 3 мг/л БАП + 0,1 ИУК.

На исследованных средах различного гормонального состава каллусогенез был получен только при использовании в качестве эксплантов сегментов стебля длиной 5...7 мм. При использовании сегментов листьев и узлов каллусогенез не наблюдался.

Каллусогенез на сегментах стеблей проходил на всех вариантах питательных сред, кроме МС + 3 мг/л 2,4-Д (табл. 1, указаны средние по вариантам и доверительные интервалы). Причем питательные среды, не содержащие ауксинового компонента, давали значимо большую эффективность каллусогенеза, чем варианты, содержавшие ИУК в качестве ауксинового компонента. Это может косвенно свидетельствовать о высоком уровне эндогенных ауксинов.

Таблица 1.

Эффективность каллусогенеза на питательных средах различного гормонального состава

Гормональный состав питательной среды	Частота каллусогенеза, %		
	<i>S. viridis</i>	<i>S. sclarea</i>	<i>S. officinalis</i>
1 мг/л БАП	46,5±5,5	72,0±3,6	42,5±4,7
3 мг/л БАП	53,5±2,8	74,0±8,1	34,5±6,3
1 мг/л БАП+0,1 мг/л ИУК	11,0±8,7	14,0±4,9	21,0±7,1
3 мг/л БАП+0,1 мг/л ИУК	12,0±5,3	11,0±3,6	23,0±1,5

По данным табл. 1, наилучшей средой для каллусогенеза для трех рассмотренных видов являются питательные среды МС с добавлением цитокинина БАП в концентрации 1 или 3 мг/л [Ящуревская, Чередниченко, 2017].

На исследованных средах различного гормонального состава соматический органогенез был получен только при использовании в качестве эксплантов сегментов узлов (табл. 2). При использовании в качестве эксплантов сегментов листьев и сегментов стебля соматический органогенез не наблюдался.

Таблица 2.

Эффективность органогенеза на питательных средах различного гормонального состава

Гормональный состав питательной среды	Частота органогенеза, %		
	<i>S. viridis</i>	<i>S. sclarea</i>	<i>S. officinalis</i>
1 мг/л БАП	24,5±5,7	35,5±3,7	22,5±6,7
3 мг/л БАП	36,0±8,1	41,0±7,2	21,5±9,8
1 мг/л БАП+0,1 мг/л ИУК	29,5±1,3	46,0±3,9	29,0±4,4
3 мг/л БАП+0,1 мг/л ИУК	34,5±4,4	50,0±3,4	30,0±2,7
3 мг/л 2,4-Д	9,0±5,0	24,0±5,1	3,5±3,0

По данным табл. 2, достоверные различия между вариантами среды с добавлением цитокинина БАП по всем трем видам встречались редко и без четкой тенденции. Однако можно отметить, что по средним значениям некоторое преимущество для соматического органогенеза для шалфея зеленого у сред, содержащих 3 мг/л БАП с добавлением или без добавления 0,1 мг/л ИУК, в то время как, для шалфея мускатного и шалфея лекарственного – у питательных сред, содержащих как цитокининовый (1 мг/л или, соответственно, 3 мг/л БАП), так и ауксиновый компонент (0,1 мг/л ИУК). Наихудшие показатели у всех исследованных форм были в случае питательной среды МС + 3 мг/л 2,4-Д.

Таким образом, для получения каллусной ткани в качестве эксплантов целесообразно брать сегменты стебля, при этом в питательную среду добавлять 6-бензиламинопурин. Для индукции соматического органогенеза можно рекомендовать использование в качестве эксплантов узлов, причем цитокининовый компонент играет в данном процессе основную роль.

Литература

Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. – Одесса: Астропринт, 2011. – 224 с.

Ящуревская М.Н., Чередниченко М.Ю. Индукция каллусогенеза и органогенеза в культуре видов рода *Salvia* L. *in vitro* // Вавиловские чтения – 2017: Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвященной 130-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова. – Саратов: Саратовский ГАУ, ООО «Амирит», 2017. – С. 113–114.

Cuenca S., Amo-Marko J.B. *In vitro* propagation of two spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation // *In Vitro Cellular & Developmental Biology. – Plant.* – 2000. – V. 36. – P. 225–229.

Endreb R. *Plant cell biotechnology.* – Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1994. – 353 p.

Heistein P.F. *Plant cell suspension cultures as a source of drugs* // *Pharmacy International.* – 1986. – V. 7. – P. 38-40.

Makunga N.P., van Staden J. An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2008. – V. 92, No. 1. – P. 63–72.

Skala E., Wysokinska H. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.* – 2004. – V. 40, No. 6. – P. 596–602.

Then M., Szóllósy R., Vásárhelyi-Perédi K., Szentmihályi K. Polyphenol-, mineral element content and total antioxidant power of sage (*Salvia officinalis* L.) extracts // *Acta Horticulturae.* – 2004. – V. 629. – P. 123–129.

Yaschurevskaya M.N., Cherednichenko M.Yu. *In vitro* seed sterilization of some *Salvia* species and varieties // *The 3rd International Symposium on Euroasian Biodiversity. Abstract e-Book* (Eds. Semiz G., Akyldiz G.K.), July 05-08, 2017. – Minsk, Belarus. – P. 416.

MORPHOGENIC POTENTIAL OF THE *SALVIA* GENUS REPRESENTATIVES *IN VITRO* CULTURE

M.N. Yaschurevskaya, M.Yu. Cherednichenko

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Russian Timiryazev State Agrarian University», Moscow, Russia, michael.tsch@gmail.com

Abstract. The *Salvia* L. genus includes almost 1000 species, of which only for the most common species studied for secondary metabolism *in vitro* cultivation techniques have been developed (for example, medicinal sage). In this paper, the efficiency of callusogenesis and organogenesis in representatives of three species is compared: *S. officinalis* L., *S. sclarea* L., *S. viridis* L. The effect of the hormonal composition of the nutrient medium Murashige and Skoog has been studied for these indices.

Keywords: *Salvia*, *in vitro*, callusogenesis, organogenesis

NEW CRISPR/CAS9 GENE EDITING TECHNOLOGY FOR DEVELOPMENT OF AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

O.I. Kershanskaya¹, Zh. Kuli¹, A. Maulenbay¹, D. Nelidova¹, S.N. Nelidov¹, J. Stephens²

¹Institute Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

²The James Hutton Institute, Dundee, Scotland, UK, gen_o.kersh@mail.ru

Abstract. Plant resistance is an economical and sustainable stress management option. For plant diseases complete resistance does not exist and partial resistance has mostly been ineffective under field conditions. Our efforts to increase the strength of the plant innate defense system using the best modern gene editing technology CRISPR/Cas9 in combination with elaboration of simple and effective method of germ-line genetic transformation would be effective to limit viral and fungal pathogens in barley and to produce yield potential elite barley varieties with high economical benefice.

Keywords: CRISPR/Cas9, genome editing, stress resistance, barley

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1434-1437

Introduction: The technology, a genome-editing tool called CRISPR-Cas9, revolutionized the life sciences when it appeared on the market in 2013 [Doudna, Charpentier, 2013, 2014; Le Cong et al., 2013]. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) gene-editing is allowing rapid scientific advances in many fields, including human health and now it has been shown that crop research can also benefit from this latest exciting technology. New study of CRISPR-Cas9 technology shows potential to improve crop efficiency [Feng et al., 2013, 2014; Nekrasov et al., 2013]. It is now proving useful in the plant science community as a powerful tool for the improvement of agricultural crops. It is estimated that up to 40% of harvest is lost worldwide to pests/diseases threatening our food supply. Barley is susceptible to many viral and fungal diseases that can result in drastically reduced yield and poor quality grain. Barley cultivars with improved resistance to fungal or viral pathogens will benefit farmers and the local economy by increasing harvest yields and grain quality. The main goals are to elaborate and evaluate new germ-line transformation technology for delivering both conventional and CRISPR/Cas9-based constructions into barley zygote, and new gene editing CRISPR/Cas9 technology for creation of elite fungal and viral diseases resistant barley cultivars.

Materials: 5 UK barley cultivars (Tipple, Bowman, Ovation, Origin and Optic) and 5 KZ barley cultivars (Asem, Inkar, Sari-Arua, Arna, Saule). Methods: CRISPR/Cas 9: What is it and how does it work? CRISPR stands for Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. The discovery of the type II prokaryotic CRISPR “immune system” has allowed for the development for an RNA-guided genome editing tool that is simple, easy and quick to implement. The CRISPR/Cas9 system consists of a single monomeric protein and a chimeric RNA. A 20-nt sequence in the gRNA confers sequence specificity and cleavage is mediated by the Cas9 protein. Watson–Crick base pairing with the target DNA sequence is the basis for gRNA-based cleavage, making sophisticated protein engineering for each target unnecessary. Only a 20 nt in the gRNA is needs to be modified to facilitate the recognize a different target.

In collaboration with JHI, UK, proposed approach to barley diseases combat are included elaboration of new modern the most effective technique of CRISPR-Cas9 gene editing [Barakate et al., 2014, 2016]; methods of molecular genes cloning and constructing of key anti-fungal and anti-viral constructs; establishment of new *Agrobacterium* - mediated germ-line genetic transformation biotechnology; creation an effective binary vector for *Ac* and *glucanase* genes transformation, and knock out the eukaryotic translation initiation factor

(**eIF4E**) that is required by many viruses for multiplication; screening and molecular detection of transgenes and editing events by PCR and RT-PCR analysis; testing of created barley plants on micropathogenes and viruses resistance. Expected results: 1. New gene editing CRISPR-Cas9 biotechnology for creation of new elite viral disease resistant barley cultivars. 2. New germ-line transformation biotechnology for delivery of CRISPR-Cas9 and valuable genetic constructs into barley. 3. Constructs of chitin *ac* and *glucanase* genes for barley transformation. 4. CRISPR construct to knock out the eukaryotic translation initiation factor (**eIF4E**) for viruses multiplication. 5. Segregation away from the edited event the transformation cassette including Cas9 and guide RNA to leave a ‘clean’ not GMO mutation. 6. Production of genome edited barley plants with resistance to viral and fungal diseases.

Results and discussion: Plant CRISPR/Cas9 products are intended for *Agrobacterium*-mediated plant transformation or biolistic microparticle bombardment or protoplast transformation. RNAi silencing of **eIF4E** has conferred resistance to multiple viruses in melon and broad spectrum resistance to potyviruses in tomato. More recently, *Arabidopsis* complete resistance to Turnip Mosaic Virus has been successfully engineered by editing **eIF4E** using the CRISPR/Cas9 tool. The products are based on the type IIA CRISPR/Cas9 derived from *Streptococcus pyogenes*. CRISPR/Cas9 Plasmids for use in plants have been shown in figure.

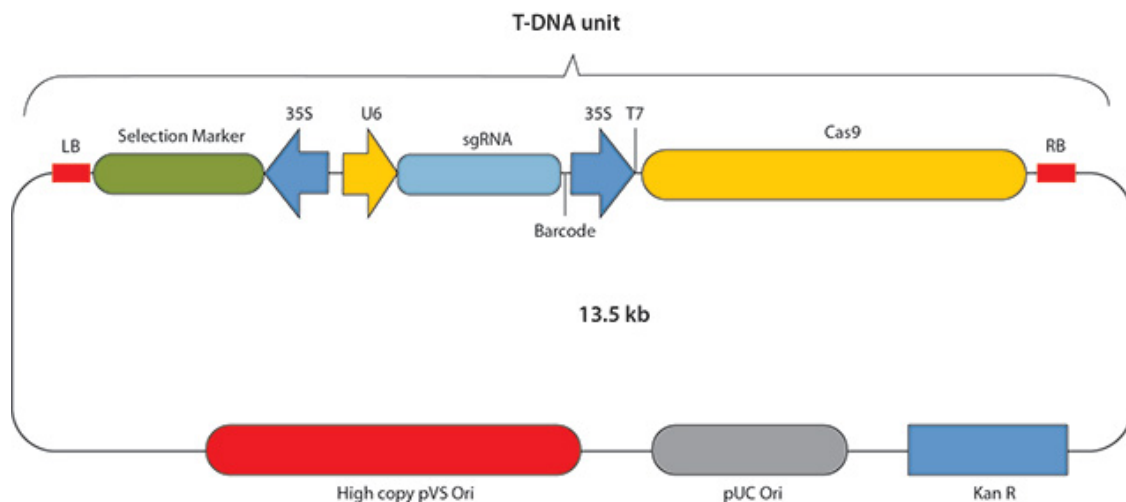


Figure. Scheme of T-DNA unit for monocot CRISPR/Cas9 editing.

The native Cas9 coding sequence was codon optimized for expression in monocots and dicots, respectively. The monocot Cas9 constructs contain a monocot U6 promoter for sgRNA expression. The plant selection markers include hygromycin B resistance gene, neomycin phosphotransferase gene, and the bar gene (phosphinothricin acetyl transferase).

CRISPR/Cas9 Genome Editing Tools include: 1. Design sgRNA. Requires the identification of target sites with specific sequence criteria, while also avoiding the potential for off-target effects. 2. Transcribe and screen sgRNA *in vitro*. Quickly transcribe any sgRNA *in vitro* at high yields, without ligation. Don't waste time delivering ineffective sgRNAs to cells—test the cleavage efficiencies of individual sgRNAs *in vitro* before performing gene editing in your target cells. 3. Deliver sgRNAs and Cas9 into cell. There are several options for delivering sgRNAs and Cas9 to your target cells: for plasmid delivery, Cas9/sgRNA co-expression vectors allow seamless insertion of sgRNAs, and express bright fluorescent markers. Use vesicles, which are cell-derived nanovesicles, for efficient delivery of active Cas9 ribonucleoprotein (RNP) complexes to a broad range of cell types with reduced off-target effects and very low cytotoxicity. To prevent genomic integration of Cas9, using this

single reagent to transfect target cells with Cas9 mRNA and sgRNAs without cytotoxic effects. This AAV2-based system for delivery of sgRNAs and Cas9 enables efficient gene editing in difficult-to-transfect cells without genomic integration of Cas9. 4. For sgRNAs and Cas9 delivering into barley, we are using our elaborated *A. tumefaciens* - mediated pollen germ – line transformation technique. 5. Detection Cas9 protein and confirmation gene editing. Confirm that Cas9 protein is being expressed in target cells. Ensure that your cell population contains mutations at your target locus by using a mismatch detection assay that outperforms a CEL-1 based assay. 6. Genotype determination. If there are indels on one or both copies of your target gene, Cas9/sgRNA-mediated in vitro cleavage reaction can accurately determine cell's genotype after gene editing. 7. Identity indels. Characterize CRISPR/Cas9-induced indels with a simple four-step protocol using the Guide-it Indel Identification Kit. T1 seeds should be germinated on antibiotic selection and confirmed as transgenic by PCR. Multiple seed from each independent line will be grown up as replicates and leaf tissue or whole plants will be used for assays with fungal spores (KZ) or virus isolates (UK) to determine resistance levels.

CRISPR/Cas9 consists of a Cas9 protein, a CRISPR RNA (crRNA), and a trans-activating crRNA (tracrRNA). In gene editing applications, crRNA and tracrRNA are often fused into a single guide RNA (sgRNA). The ribonucleoprotein invades the target with crRNA guide sequence by forming a 20-bp RNA/DNA hybrid and displacing the opposite DNA strand after it encounters a protospacer adjacent motif (PAM), such as NGG. Cas9 endonuclease subsequently cleaves the complementary DNA strand (target strand) with a HNH nuclease domain and the displaced DNA strand (non-target strand) with a RuvC-like nuclease domain to create a double strand break (DSB). The repair of the DSB by host cell via non-homologous end joining (NHEJ) or homology directed repair (HDR) pathways can be utilized to create gene knockout or introduce a specific genetic modification through homologous recombination with a DNA donor.

RNA-guided endonucleases (RGENs) consisting of the Cas9 protein derived from *Streptococcus pyogenes* and guide RNAs (gRNAs) can be customized by replacing only the RNA component leading to decreases in labor and time compared to other gene editing methods. Using either *Agrobacterium tumefaciens* or by transfecting plasmids that encode them, programmable nucleases can be delivered into plant cells, where these nucleases cleave chromosomal target sites in a sequence-dependent manner. The result is site-specific DNA double-strand breaks (DSBs) whose repair by endogenous systems results in targeted genome modifications. Main advantages of CRISPR/Cas9 are in terms of simplicity, accessibility, cost and versatility.

The classification of genome edited plants is currently under review to decide whether new breeding technologies including CRISPR/Cas9 are exempt from GM classification. As known RNAi silencing of **eIF4E** has conferred resistance to multiple viruses in melon and broad spectrum resistance to potyviruses in tomato. More recently, *Arabidopsis* complete resistance to Turnip Mosaic Virus has been successfully engineered by editing **eIF4E** using the CRISPR/Cas9 tool. Once the gene edited events are established in barley, the transformation cassette including Cas9 and guide RNA was segregated away from the edited event to leave a ‘clean’ mutation. The fungal cell wall is composed of chitin, glucans and other polymers. Homologs of both these genes **Ac** gene from *Amaranthus caudatus* have been overexpressed in a number of species and have shown various effects on fungal resistance. By targeting these main structural components we hoped to break down the fungal cell wall to prevent fungal attack. It has also been shown that enhancing glucanase activity in barley improves its quality as feed for livestock. Traditionally, barley-fed poultry have poor growth rates because they are deficient in glucanases and cannot fully break down endosperm cell walls. Feeding studies in literature have shown that poultry fed genetically modified barley

with heat stable glucanase outperformed poultry that were fed conventional barley. Introducing gene sequences using the CRISPR/Cas9-based technology is still inefficient so we used binary vectors containing a chitinase gene *Ac* and a heat stable *glucanase* gene for co-transformation experiments in barley. T1 seeds were germinated on antibiotic selection and confirmed as transgenic by PCR. Multiple seed from each independent barley line grown up as replicates and leaf tissue or whole plants used for assays with fungal spores (KZ) or virus isolates (UK) to determine resistance levels.

Conclusions: The genome edited plants with fungus and virus resistance could be produced. These new technologies will provide the means to target other quality traits (including agronomic and malting) for improved barley cultivars in the future. The development of a new genotype-independent, plant friendly transformation protocol in barley will be interested to plant scientists enabling future experiments to be done in elite cultivars rather than the only transformable Golden Promise cultivar which is of little commercial importance. Once the gene edited events are established in barley, the transformation cassette including Cas9 and guide RNA will be segregated away from the edited event to leave a 'clean' mutation. Edited plants could be segregated to produce 'clean' plants free of vector sequence which may be classified as GMO-free and suitable for future planting.

References

Barakate A., Higgins J.D., Vivera S., Stephens J., Perry R.M., Ramsay L., Colas I., Oakey H., Waugh R., Franklin F.C.H., Armstrong S.J., Halpin C. The synaptonemal complex protein ZYP1 is required for imposition of meiotic crossovers in barley // *The Plant cell*. – 2014.

Barakate A., Stephens J. An overview of CRISPR-based tools and their Improvements: new opportunities in understanding plant–pathogen interactions for better crop protection // *Front. Plant Sci*. – 2016. – <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00765>.

Doudna J.A., Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 // *Science*. – 2014. – V. 346 (6213). – P. 1258096.

Feng Z., Mao Y., Xu N., Zhang B., Wei P., Yang D.L. et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2014. – V. 111. – P. 4632–4637.

Feng Z., Zhang B., Ding W., Liu X., Yang DL., Wei P., Cao F., Zhu S., Zhang F., Mao Y., Zhu J.K. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system // *Cell Res*. – 2013. – V. 23. – P. 1229–1232.

Le Cong F., Ran A., David C., Lin Sh., Barretto R., Habib N., Hsu PD., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Feng Z. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science*. – 2013. – V. 339, I. 6121. – P. 819–823.

Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D., Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease // *Nat. Biotechnol*. – 2013. – V. 31. – P. 691–693.

**ДОКЛАДЫ В РАМКАХ
ШКОЛЫ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ**

ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ В ПРИРОДЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ю.М. Константинов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, yukon@sifibr.irk.ru

Аннотация. Митохондрии растений в отличие от хлоропластов обладают природной способностью к поглощению (импорту) чужеродной ДНК. Хотя молекулярный механизм трансмембранного переноса ДНК в митохондрии на сегодняшний день остается не до конца изученным, способность растительных митохондрий к импорту ДНК может быть использована как в фундаментальных исследованиях функционирования митохондриального генома, так и при разработке технологий доставки генов в эти органеллы для решения биотехнологических задач.

Ключевые слова: митохондрии, импорт ДНК, горизонтальный перенос генов, свободно циркулирующая ДНК

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1439-1440

Наблюдающийся в последние годы быстрый прогресс в области полногеномного секвенирования позволил прийти к важному выводу: горизонтальный перенос генов (ГПГ) играет важную роль не только в эволюции прокариот, но также достаточно широко распространен у эукариот. У представителей высших эукариот (животных, растений) с более высокой частотой ГПГ происходит в митохондриях. По современным представлениям ГПГ в митохондрии может происходить с участием природного механизма поглощения ДНК этими органеллами («импорта ДНК») [Koulintchenko et al., 2003]. Митохондриальный геном растений отличается от такового животных и дрожжей чрезвычайно большими размерами (300–2400 т.п.н.), наличием субгеномных колец, линейных и кольцевых плазмид, интенсивными процессами рекомбинации митохондриальной ДНК (мтДНК), толерантностью к включению ДНК чужеродного происхождения. С мтДНК растений связаны такие практически ценные свойства, как цитоплазматическая мужская стерильность, устойчивость к патотоксинам, адаптационная изменчивость. Хотя к настоящему времени достигнуты значительные успехи в изучении организации мтДНК растений, ряд важных в теоретическом и практическом отношении вопросов, связанных со структурой и функциями генома этих органелл, остается нерешенным. Анализ известных на сегодняшний день сведений о специфичности импорта ДНК в митохондрии высших растений позволяет предполагать наличие нескольких путей переноса нуклеиновых кислот в эти органеллы [Weber-Lotfi et al., 2015]. К настоящему времени получено много сведений о присутствии мтДНК в системе циркуляции высших организмов (кровь, лимфа, флоэмный сок и др.) [Gahan, 2008, 2012]. Хотя биологические функции свободно циркулирующей мтДНК у высших организмов остаются недостаточно изученными, имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют предполагать, что циркулирующая мтДНК может выступать в роли генетического и эпигенетических факторов [Gahan, 2013]. Таким образом, совокупность имеющихся данных об импорте ДНК в митохондрии высших эукариот позволяет рассматривать данный феномен в качестве явления, играющего важную роль в генетических процессах в ходе эволюции организмов. Одновременно с этим имеющиеся сведения позволяют рассматривать импорт и экспорт ДНК в митохондриях высших эукариот в качестве важного физиологического фактора, оказывающего значительное влияние на жизнедеятельность как отдельных органов и тканей, так и

организма в целом. Задача исследователей в настоящий период состоит в выяснении молекулярной природы митохондриального импорта ДНК для последующего использования этих знаний в разработке технологий направленной доставки генов в эти органеллы *in vivo* для решения задач в биотехнологии, биомедицине и сельском хозяйстве.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-04-00603).

Литература

Gahan P.B. and Swaminathan R. Circulating nucleic acids in plasma and serum // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2008. – V. 1137. – P. 1–6.

Gahan P.B. Biology of circulating nucleic acids and possible roles in diagnosis and treatment in diabetes and cancer // *Infectious Disorders – Drug Targets*. – 2012. – V. 12. – P. 360–370.

Gahan P. Circulating nucleic acids: possible inherited effects // *Biological Journal of the Linnean Society*. – 2013. – V. 110. – P. 931–948.

Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // *EMBO J*. – 2003. – V. 22, № 6. – P. 1245–1254.

Weber-Lotfi F., Koulintchenko M., Ibrahim N., Hammann P., Mileschina D., Konstantinov Yu. M., Dietrich A. Nucleic acid import into mitochondria: new insights into the translocation pathways // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2015. – V. 1853. – P. 3165–3181.

HORIZONTAL GENE TRANSFER INTO PLANT MITOCHONDRIA *IN VIVO* AND IN EXPERIMENTS

Yu.M. Konstantinov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, yukon@sifibr.irk.ru

Abstract. The plant mitochondria but not chloroplasts have natural ability to uptake (to import) foreign DNA. Although the molecular mechanism of DNA transfer into mitochondria is not yet completely understood, the ability of mitochondria actively import DNA may be used efficiently as for studying of mitochondrial genome functioning as for development of biotechnologies for gene delivery into mitochondria.

Keywords: *mitochondria, DNA import, horizontal gene transfer, free circulating DNA*

МАЛЫЕ РНК: РОЛЬ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ ОТ ПАТОГЕНОВ

А.Г. Соловьев

Подразделение Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова» Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Российская Федерация, solovyev@belozersky.msu.ru

Аннотация. Малые РНК, один из ключевых компонентов системы РНК-интерференции, задействованы в защитном ответе растений на патогены вирусной и невирусной природы. Функционирование защитных механизмов, использующих siRNA и miRNA, может рассматриваться в рамках концепции «гонки молекулярных вооружений», описывающей ко-эволюцию растений и их патогенов.

Ключевые слова: РНК-интерференция, малые РНК, siRNA, miRNA, защитный ответ растений

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1441-1442

Открытие РНК-интерференции – одно из самых заметных событий в биологической науке за последнюю четверть века. Многие принципы работы этой системы были открыты и охарактеризованы на модели растений. В частности, была показана ключевая роль системы РНК-интерференции в защите растений от патогенов, в первую очередь – вирусов. Две основные ветви РНК-интерференции представлены транскрипционным и пост-транскрипционным сайленсингом. Первый является механизмом, который использует метилирование ДНК для контроля активности мобильных элементов генома, тогда как второй – механизмом контроля экспрессии генов с помощью микро-РНК (miRNA) и борьбы с вирусами с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA). Двухцепочечные РНК, представляющие собой промежуточные продукты репликации вирусных РНК-геномов, являются мощным индуктором РНК-интерференции, а дочерние вирусные геномы – ее мишенью. Высокая эффективность antiviralного ответа с участием siRNA, способного полностью блокировать вирусную инфекцию, приводит к необходимости продукции вирусами белков, супрессирующих такой тип защитного ответа. Эти белки, в свою очередь, могут узнаваться системой врожденного иммунитета растения, подавляющей развитие вирусной инфекции. Подобная "гонка молекулярных вооружений" наблюдается во взаимодействии растений и с другими патогенами. В частности, ряд белков-эффекторов фитопатогенных бактерий и грибов, проникая в клетку бактерий, подавляет защитные ответы, основанные на miRNA, но могут узнаваться системой врожденного иммунитета. Помимо этого, новые данные показывают, что siRNA могут транспортироваться из клеток растений в клетки патогенных грибов, снижая экспрессию определенных генов и подавляя развитие инфекции. И наоборот, siRNA, продуцируемые в клетках патогенных грибов, могут транспортироваться в клетки растений, супрессируя экспрессию генов защитных белков. Таким образом, система РНК-интерференции, наряду с другими защитными системами растений, определяет характер их взаимодействия с патогенами различной природы.

SMALL RNAs: ROLES IN PLANT PROTECTION AGAINST PATHOGENS

A.G. Solovyev

Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University subdepartment «A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology», Moscow, Russian Federation, *solovyev@belozersky.msu.ru*

Abstract. Small RNAs, being one of the key components of the RNA interference system, are involved in plant protective responses to pathogens of viral and non-viral nature. The protective mechanisms based on siRNA and miRNA can be considered in the frame of the concept of ‘molecular arms race’ describing co-evolution of plants and their pathogens.

Keywords: *RNA interference, small RNAs, siRNA, miRNA, plant defense response.*

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Абугалиева А.И. – 1008
Авдеева Л.В. – 1013
Агурова И.В. – 1146
Адамович С.Н. – 1397
Азарова Т.С. – 1121
Аксенов-Грибанов Д.В. – 1344
Акулов А.Н. – 1229, 1358
Алексеева С.И. – 1018
Алиев К. – 1156
Алиев К.А. – 1258, 1264, 1403
Алиев У.К. – 1403
Аль Харбавии В.Э.К. – 1021
Анапияев Б.Б. – 1160, 1248
Аникина Н.А. – 1057
Анисимов А.В. – 1025
Анисова Ж.М. – 1029
Арефьева А.А. – 1074
Архипов М.В. – 1164
Астафурова Т.П. – 1199, 1414
Астраханцева Н.В. – 1034
Афанасьева Л.В. – 1094
Ахметова А.Б. – 1160

Б

Бабкин В.А. – 1168, 1381
Балнокин Ю.В. – 952, 978
Баранова А.А. – 1392
Батукаев А.А. – 1172, 1176
Батукаев М.С. – 1172, 1176
Башмаков Д.И. – 1021
Бейсенбек Е.Б. – 1160, 1248
Белимов А.А. – 1121
Беловежец Л.А. – 1151, 1180, 1397
Бельков В.И. – 886, 903, 998
Беляев Д.В. – 952
Берестовой М.А. – 1183
Бессолицына Е.К. – 1187
Билова Т.Е. – 1099
Богомазова М.В. – 1103
Болотова Т.А. – 1191, 1272, 1276, 1385
Борисова Г.Г. – 1079
Боровик О.А. – 898
Боровский Г.Б. – 889, 893, 898, 917, 1047, 1222
Бороздина М.Б. – 889
Бояркина С.В. – 1195
Будкевич Т.А. – 1029
Буренина А.А. – 1199
Бурыгин Г.Л. – 1203
Бухарина И.Л. – 1070
Быбин В.А. – 893, 1206
Бычкова А.А. – 1241

В

Валентович Л.Н. – 962
Верхотуров В.В. – 957, 970
Веселов Д.С. – 1363
Вильянен Д.В. – 903
Виноградова Е.Н. – 1038, 1043
Виноградова Н.А. – 1043
Власова А.А. – 903
Войников В.К. – 1330
Волобуева О.Г. – 1210, 1215
Воробьев Н.И. – 1116
Воронков А.С. – 926
Ву В.З. – 1099

Г

Гавриш И.А. – 1059
Гагарина И.Н. – 1334
Галактионова Л.В. – 1059
Галин И.Р. – 1363
Гамбург К.З. – 893, 898, 1353
Гарник Е.Ю. – 886, 903, 998
Гетте И.Г. – 1047
Голденкова-Павлова И.В. – 1183, 1253, 1401
Горина С.С. – 1187, 1219
Горностай Т.Г. – 1222
Гра О.А. – 1253, 1401
Грабельных О.И. – 898
Граскова И.А. – 1225, 1321
Гречкин А.Н. – 1187, 1219
Грищенко Е.Р. – 1052
Гулов М.К. – 966
Гумерова Е.А. – 1229, 1358
Гурина В.В. – 1143
Гусакова Л.П. – 1164

Д

Давлятназарова З.Б. – 1156
Данилова М.Н. – 908
Данилова Т.А. – 1164
Девгуть С.В. – 1084, 1089
Дейнеко Е.В. – 1234
Дикарева Н.В. – 1055
Дмитриев И.А. – 1344
Домаш В.И. – 1052
Дорошенко А.С. – 908
Дорошков А.А. – 957, 970
Дреева Ф.Р. – 986, 990
Дударева Л.В. – 1367

Е

Евдокимова О.В. – 962
Емельянов В.В. – 1388, 1427
Емшанова В.А. – 1344

Ж

Жигачева И.В. – 1236

З

Забрейко С.А. – 1052
Загоскина Н.В. – 1418
Зайцева Ю.В. – 1241
Захаров Ю.Б. – 1222, 1327
Захарова Е.А. – 1057
Захарова Е.В. – 926, 931
Зернова О.В. – 921
Зинатуллина А.Е. – 1290
Зобова Н.В. – 1308
Золотовская Е.Д. – 941, 1244
Зорина С.Ю. – 1151

И

Ибрагимова С.М. – 913
Иванов О.А. – 1052
Ильина Т.М. – 1219
Ионенко И.Ф. – 1025
Искаков Б.К. – 1316
Искакова К.М. – 1160, 1248

К

Кабардаева К.В. – 1253, 1401
Калашникова Е.А. – 1255
Калугина О.В. – 1094
Канделинская О.Л. – 1052
Караев С.Ф. – 1258, 1264
Каргаполова К.Ю. – 1203
Каримов Н.Ж. – 1316
Карпычев И.В. – 952
Карташов А.В. – 1077
Катышев А.И. – 889, 917, 998
Катышева Н.Б. – 917
Кершанская О.И. – 921
Киёмова З.С. – 1258, 1264
Киракосян Р.Н. – 1255
Кирпичникова А.А. – 1268, 1388, 1427
Киселев В.Н. – 1084, 1089
Клаус А.А. – 1077
Клименко Е.С. – 1272
Клименко О.А. – 944, 948
Клименков И.В. – 1225
Клюев Д.А. – 1055, 1057
Ковалева Л.В. – 926, 931
Коваль Е.В. – 936
Кожухметов К. – 1008
Кокшарова О.А. – 975
Коновалов А.Д. – 941, 1244
Константинов Ю.М. – 886, 903, 993, 998,
1191, 1272, 1276, 1339, 1385, 1439
Коротаева Н.Е. – 889, 1047
Короткова А.М. – 1059, 1063
Коротченко И.С. – 1067
Кособрюхов А.А. – 1313
Косов И.В. – 1047
Костюкова Ю.А. – 1280, 1358
Косян Д.Б. – 1063

Кочетов А.А. – 1285
Кочетов А.В. – 913
Кравченко А.Н. – 944, 948
Краснова М.Е. – 1344
Красова Ю.В. – 1203
Круглова Н.Н. – 1290, 1363
Кузина О.Н. – 1103
Кузнецов В.В. – 1077
Кузьмин П.А. – 1070
Кузьмина А.М. – 1070
Кулинченко М.В. – 993, 998, 1191, 1272,
1276, 1339, 1385
Курамшина З.М. – 1074, 1139
Куриленко В.В. – 1103
Кутковски-Муштук А.И. – 1295, 1299, 1423
Кучаева Л.Н. – 1099
Кучарова Е.В. – 1303

Л

Лайков А.В. – 1358
Лебедев В.Г. – 1305
Левчук А.А. – 1180
Леонова И.Н. – 957, 970
Лисецкая И.А. – 1392
Лозински М.Н. – 1423
Лозинский М.Г. – 1295
Лозовая В.В. – 921
Лоскутов С.И. – 1121
Луговцова С.Ю. – 1308
Лукаткин А.С. – 1021
Лукина П.Ю. – 1079
Лысенко Е.А. – 1077

М

Мадьярова Е.В. – 1344
Майорова О.В. – 952
Макаров И.О. – 1055, 1057
Макарова Л.Е. – 1151
Максимова Л.А. – 1206
Малаева М.Б. – 986, 990
Малева М.Г. – 1079
Маркова Ю.А. – 893, 1151, 1206, 1397
Мартиросян В.В. – 1313
Мартиросян Ю.Ц. – 1313
Маталин Д.А. – 978
Матиив А.Б. – 1003
Матюшевская Е.В. – 1084, 1089
Медведева Ю.В. – 1411
Минкина Ю.В. – 926
Мирошникова М.П. – 1215
Мисирова А.Х. – 986, 990
Митрахович П.А. – 1089
Михайлова Т.А. – 1094
Мусабаев Р.У. – 1316
Мустафаев О. – 1253, 1401
Мухтарова Л.Ш. – 1187, 1219

Мучкина Е.Я. – 1067

Мясоедов Н.А. – 952

Н

Назарова Н.Н. – 1258, 1264

Неделяева О.И. – 952

Нелидов С.Н. – 921

Нелидова Д.С. – 921

Нестеркина И.С. – 1143

Нешумаева Н.А. – 1308

Низкородова А.С. – 1316

Николаева Т.Н. – 1418

Ножкина О.А. – 1321

Норкулов Н. – 1264

Нурминский В.Н. – 1327

О

Оборина Е.Н. – 1397

Огородникова С.Ю. – 936

Озолина Н.В. – 1143

Оленников Д.Н. – 1222

Омарова А.Ш. – 1248

Омеличкина Ю.В. – 1195

Онучина Н.А. – 1180

Орлова Д.А. – 941

Орлова Ю.В. – 952, 978

Осипова С.В. – 957, 970

Осмоловская Н.Г. – 1099, 1103

Островская Р.М. – 1106

Остроухова Л.А. – 1168

Охлопкова Ж.М. – 1018, 1303, 1372

Охремчук Е.В. – 962

П

Павленко О.С. – 1183, 1401

Павличенко В.В. – 941, 983, 1244, 1330

Павловская Н.Е. – 1334

Пак М.Э. – 1392

Палаева Д.О. – 1172

Панфилов А.В. – 1339

Партоев К. – 966, 1156

Пермяков А.В. – 957, 970

Пермякова М.Д. – 957, 970

Перфильева А.И. – 1225, 1321

Пищик В.Н. – 1116

Помазкина Л.В. – 1111

Попова А.А. – 975

Попова Л.Г. – 952, 978

Попова Н.Ф. – 1099

Потрахов Н.Н. – 1164

Прияткин Н.С. – 1164

Протасов Е.С. – 1344

Протопопова М.В. – 941, 983, 1244, 1330

Пулькина С.В. – 1407

Пухальский Я.В. – 1116, 1121

Пшеничникова Т.А. – 957, 970

Р

Рекославская Н.И. – 1348, 1378

Реутова Н.В. – 986, 990

Реутова Т.В. – 986, 990

Рогожин Е.А. – 1392

Романова Л.И. – 1034

Романюк Д.А. – 1427

Рудиковская Е.Г. – 957, 970

Рудиковский А.В. – 1353

Румянцева Н.И. – 1229, 1280, 1358

С

Савин Т.В. – 1008

Садыкова В.С. – 1392

Сак М.М. – 1029

Саляев Р.К. – 1348, 1378

Самута В.Ю. – 1103

Саратовских Е.А. – 1013, 1126

Сарбаев А.Т. – 1160

Свиридова О.В. – 1116

Сельдимирова О.А. – 1290, 1363

Семёнова Н.В. – 1367

Сивцева С.В. – 1372

Сидоров А.В. – 1241, 1321

Сидоров Р.А. – 1183

Синявина Н.Г. – 1285

Скрипальщикова Л.Н. – 1135

Смирнов В.Ф. – 1057

Смирнова Е.О. – 1219

Смирнова О.Н. – 1057

Смирнова Ю.В. – 1074, 1139

Собачкин Д.С. – 1034

Соколова Л.Г. – 1151

Соловьев А.Г. – 1441

Солодухина Н.В. – 1375

Спиридонова Е.В. – 1143

Стасова В.В. – 1135

Степанюк Г.Я. – 1414

Столбиков А.С. – 1348, 1378

Столповская Е.В. – 1381

Субота И.Ю. – 993, 1191, 1272

Сурнина Е.Н. – 1199

Суслов М.А. – 1025

Сухов Б.Г. – 1225, 1321

Сыщиков Д.В. – 1146

Сыщикова О.В. – 1146

Т

Табара М.А. – 1423

Тарасенко В.И. – 903, 998, 1191, 1272, 1385

Теплякова С. – 1268

Теплякова С.Б. – 1388, 1427

Тимофеев М.А. – 1344

Тимофеева Г.В. – 931

Ткаченко О.В. – 1203

Толмачев С.Ю. – 1116

Топоркова Я.Ю. – 1187, 1219

Третьякова И.Н. – 1392

Третьякова М.С. – 1151, 1397

Трифорова Е.А. – 913
Трофим М.И. – 1299, 1423
Трофимова Н.Н. – 1381
Тузелбаева Ш.Р. – 1248
Турская А.Л. – 1206, 1397
Тюкалов Ю.А. – 1164
Тюрин А.А. – 1183, 1253, 1401

У

Ушаков И.А. – 1397

Ф

Фадеев В.С. – 1253, 1401
Файзиева С.А. – 1403
Фатыхова В.С. – 1219
Фахрутдинова А.С. – 1070
Федосеева И.В. – 889, 917
Федяева А.В. – 889
Филипенко Е.А. – 913
Филонова М.В. – 1407, 1411
Фомина Т.И. – 1407

Х

Хайруллин Р.М. – 1074, 1139
Халилова Л.А. – 952, 978
Хмель И.А. – 975
Хоцкова Л.В. – 1414
Храмов Д.Е. – 978
Худжамерова Ф.Б. – 1403

Ц

Цинкевич С.В. – 962
Цыпурская Е.В. – 1418

Ч

Чекунова Е.М. – 1003
Чепинога В.В. – 983
Чередниченко М.Ю. – 1375, 1431
Черникова В.В. – 998
Чоркина Н.Г. – 1295, 1299
Чоркинэ Н.Г. – 1423
Чудинов В.А. – 1008

Чупрова Ю.В. – 936
Чурин А.А. – 1407, 1411
Чэнь Т. – 1268, 1388, 1427

Ш

Шапошников А.И. – 1116, 1121
Шарпио Т.П. – 1052
Шафикова Т.Н. – 1195
Шергина О.В. – 1094
Шестибратов К.А. – 1305
Шилова И.В. – 1411
Ширяев Г.И. – 1079
Шишова М.Ф. – 1268, 1388, 1427
Шишхаева М.Г. – 1176
Шмаков В.Н. – 1272, 1367
Шувалов А.В. – 952, 978

Ю

Юрченко А.А. – 952, 978
Юшкина Т.С. – 1003

Я

Яковлева А.А. – 1057
Яковлева Т.В. – 998
Якушев Б.И. – 1029
Яротов А.Е. – 1089
Ящуревская М.Н. – 1431

В-W

Börner A. – 957, 970
Dietrich A. – 1276
Kershanskaya O.I. – 1434
Kuli Zh. – 1434
Lohwasser U. – 957, 970
Maulenbay A. – 1434
Nelidov S.N. – 1434
Nelidova D. – 1434
Stephens J. – 1434
Weber-Lotfi F. – 1276

СОДЕРЖАНИЕ

СЕКЦИЯ 2. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМОВ.....	885
<i>Бельков В.И., Гарник Е.Ю., Константинов Ю.М.</i> ЗНАЧЕНИЕ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ В ПЕРЕСТРОЙКАХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	886-888
<i>Боровский Г.Б., Бороздина М.Б., Катышев А.И., Коротаева Н.Е., Федосеева И.В., Федяева А.В.</i> ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ И СТРЕССОВЫЕ БЕЛКИ АРАБИДОПСИСА, У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ «ВНЕШНЕЙ» NADH-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ (NDB2).....	889-892
<i>Гамбург К.З., Быбин В.А., Боровский Г.Б., Маркова Ю.А.</i> ВЛИЯНИЕ КАРТОФЕЛЯ СОРТА «СКАРБЬ», ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ГЕНОМ <i>GOX</i> ИЗ <i>PENICILLIUM FUNICULOSUM</i> , НА РАЗМНОЖЕНИЕ НЕПАТОГЕННОЙ БЕСПЛАЗМИДНОЙ БАКТЕРИИ <i>ESHERICHIA COLI</i> И ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ <i>PESTOBACTERIUM</i> <i>CAROTOVORUM</i> И <i>CLAVIBACTER MICHIGANENSIS</i>	893-897
<i>Гамбург К.З., Грабельных О.И., Боровик О.А., Боровский Г.Б.</i> ВЛИЯНИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ГЕНА <i>GOX</i> ИЗ <i>PENICILLIUM FUNICULOSUM</i> В ГЕНОМ КАРТОФЕЛЯ СОРТА СКАРБЬ НА ЕГО УСТОЙЧИВОСТЬ К ДЛИТЕЛЬНОМУ ОХЛАЖДЕНИЮ.....	898-902
<i>Гарник Е.Ю., Вильянен Д.В., Власова А.А., Бельков В.И., Тарасенко В.И., Константинов Ю.М.</i> ФЕНОТИП "STAY-GREEN" У МУТАНТА <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ПО ГЕНАМ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ <i>GDH1GDH2</i>	903-907
<i>Дорошенко А.С., Данилова М.Н.</i> УЧАСТИЕ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛИНГА СИНЕГО СВЕТА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АППАРАТА ТРАНСКРИПЦИИ ПЛАСТОМА ПРИ ЦИТОКИНИН-ЗАВИСИМОЙ ДЕЭТИОЛЯЦИИ <i>A. THALIANA</i>	908-912
<i>Ибрагимова С.М., Трифонова Е.А., Филипенко Е.А., Кочетов А.В.</i> ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ В ФИТОПАТОГЕНЕЗЕ У РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, НЕСУЩИХ ГЕН ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ ЦИНИИ <i>ZRNaseII</i>	913-916
<i>Катышев А.И., Катышева Н.Б., Федосеева И.В., Боровский Г.Б.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНОВ <i>mTERF</i> В РЕАЛИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В МИТОХОНДРИЯХ АРАБИДОПСИСА.....	917-920
<i>Кершанская О.И., Зернова О.В., Нелидова Д.С., Нелидов С.Н., Лозовая В.В.</i> УЛУЧШЕНИЕ ВНУТРЕННЕЙ УСТОЙЧИВОСТИ СОИ К СТРЕССАМ ПУТЕМ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ФЕНИЛПРОПАНОИДНОГО ЦИКЛА.....	921-925
<i>Ковалева Л.В., Воронков А.С., Захарова Е.В., Минкина Ю.В.</i> АБСЦИЗОВАЯ КИСЛОТА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ СИГНАЛ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ У <i>PELTONIA HYBRIDA</i>	926-930
<i>Ковалева Л.В., Захарова Е.В., Тимофеева Г.В.</i> САМОНЕСОВМЕСТИМОСТЬ РНКазного ТИПА И ПРОГРАММИРОВАННАЯ КЛЕТОЧНАЯ СМЕРТЬ (PCD).....	931-935
<i>Коваль Е.В., Чупрова Ю.В., Огородникова С.Ю.</i> ВЛИЯНИЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ НА РАСТЕНИЯ, ВЫРАЩЕННЫЕ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МЕТИЛФОСФОНАТАМИ.....	936-940
<i>Коновалов А.Д., Павличенко В.В., Орлова Д.А., Золотовская Е.Д., Протопопова М.В.</i> СОВРЕМЕННАЯ ФИЛОГЕОГРАФИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА <i>WALDSTEINIA TERNATA</i> (СТЕРН.) <i>FRITSCH</i> КАК ОТРАЖЕНИЕ ГЛОБАЛЬНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЧЕТВЕРТИЧНОГО ПЕРИОДА.....	941-943
<i>Кравченко А.Н., Клименко О.А.</i> ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ И ПОНИЖЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ПРОЦЕСС ПРОРАСТАНИЯ И УСТОЙЧИВОСТЬ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА КУКУРУЗЫ.....	944-947
<i>Кравченко А.Н., Клименко О.А.</i> ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВОДОПОГЛОЩАЮЩЕЙ И ВОДОУДЕРЖИВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ КУКУРУЗЫ НА СТРЕССОВЫХ ОСМОТИЧЕСКИХ ФОНАХ	948-951

<i>Неделяева О.И., Шувалов А.В., Орлова Ю.В., Халилова Л.А., Беляев Д.В., Мясоедов Н.А., Майорова О.В., Юрченко А.А., Попова Л.Г., Балнокин Ю.В., Карпычев И.В.</i> КЛОНИРОВАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ <i>SaCLCa1</i> И <i>SaCLCc1</i> СЕМЕЙСТВА ХЛОРИДНЫХ КАНАЛОВ (CLC) ИЗ ГАЛОФИТА <i>SUAEDA ALTISSIMA</i> (L.) Pall.....	952-956
<i>Осипова С.В., Пшеничникова Т.А., Пермьяков А.В., Пермьякова М.Д., Рудиковская Е.Г., Дорошков А.А., Леонова И.Н., Верхотуров В.В., Lohwasser U., Börner A.</i> РОЛЬ ХРОМОСОМ ВТОРОЙ ГОМЕОЛОГИЧЕСКОЙ ГРУППЫ В ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ <i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.	957-961
<i>Охремчук Е.В., Цинкевич С.В., Евдокимова О.В., Валентович Л.Н.</i> ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА <i>STARHYLOCOSCUS</i> КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ (БИОТОПЛИВА).....	962-965
<i>Партоев К., Гулов М.К.</i> КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ТЕМПЕРАТУРОЙ ВОЗДУХА И ПРИЗНАКАМИ КАРТОФЕЛЯ.....	966-969
<i>Пермьякова М.Д., Осипова С.В., Пермьяков А.В., Пшеничникова Т.А., Рудиковская Е.Г., Дорошков А.А., Леонова И.Н., Верхотуров В.В., Lohwasser U., Börner A.</i> КАНДИДАТНЫЕ ГЕНЫ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЛИПОКСИГЕНАЗЫ.....	970-974
<i>Попова А.А., Кокишарова О.А., Хмель И.А.</i> ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК ЦИАНОБАКТЕРИИ <i>SYNECHOCOSCUS</i> SP. PCC 7942 К ДЕЙСТВИЮ 2-НОНАНОНА.....	975-977
<i>Попова Л.Г., Шувалов А.В., Юрченко А.А., Храмов Д.Е., Маталин Д.А., Халилова Л.А., Орлова Ю.В., Балнокин Ю.В.</i> ИДЕНТИФИКАЦИЯ <i>IN SILICO</i> ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА CLC, В СОБРАННЫХ <i>DE NOVO</i> ТРАНСКРИПТОМАХ МОРСКОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ <i>DUNALIELLA TERTIOLESTA</i>	978-982
<i>Протопопова М.В., Павличенко В.В., Чепинога В.В.</i> ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОБОСОБЛЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ РЕЛИКТОВЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ БАЙКАЛЬСКОЙ СИБИРИ КАК РЕЗУЛЬТАТ ГЛОБАЛЬНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ	983-985
<i>Реутова Н.В., Малаева М.Б., Реутова Т.В., Дреева Ф.Р., Мисирова А.Х.</i> ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЫСОКОГОРЬЯ НА РЯД ХАРАКТЕРИСТИК ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО	986-989
<i>Реутова Н.В., Малаева М.Б., Реутова Т.В., Дреева Ф.Р., Мисирова А.Х.</i> НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРИСПОСОБЛЕНИЯ РАСТЕНИЙ К УСЛОВИЯМ ВЫСОКОГОРЬЯ НА ПРИМЕРЕ ДВУХ ВИДОВ.....	990-992
<i>Субота И.Ю., Кулинченко М.В., Константинов Ю.М.</i> ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ/ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ КАК ОДИН ИЗ ВЕДУЩИХ МЕХАНИЗМОВ ТОНКОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ.....	993-997
<i>Тарасенко В.И., Гарник Е.Ю., Катыхов А.И., Бельков В.И., Яковлева Т.В., Черникова В.В., Константинов Ю.М., Кулинченко М.В.</i> ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ДВОЙНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ RPO7mp ИЗ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> В РАННЕМ РАЗВИТИИ РАСТЕНИЙ И В РЕАКЦИИ НА СТРЕСС.....	998-1002
<i>Чекунова Е.М., Матиив А.Б., Юшкина Т.С.</i> ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ К СВЕТУ НА МОДЕЛИ БЕСХЛОРОФИЛЬНЫХ МУТАНТОВ ЗЕЛЕННОЙ ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ВОДОРОСЛИ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	1003-1007
<i>Чудинов В.А., Савин Т.В., Кожяхметов К., Абуғалиева А.И.</i> УСТОЙЧИВЫЕ К БОЛЕЗНЯМ ДИГАПЛОИДНЫЕ И ИНТРОГРЕССИВНЫЕ ЛИНИИ ПШЕНИЦЫ ДЛЯ ОРГАНИЧЕСКОГО ЗЕМЛЕДЕЛИЯ.....	1008-1011

СЕКЦИЯ 3. ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ.....1012

Авдеева Л.В., Саратовских Е.А.

NADH И ЕЕ РОЛЬ В ИНАКТИВАЦИИ ТЕХНОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ1013-1017

Алексеева С.И., Охлопкова Ж.М.

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧЕЙ НА ПОПУЛЯЦИЮ МНОГОКОРЕННИКА ОБЫКНОВЕННОГО *SPIRODELA POLYRHIZA* (L.) SCHLEID.....1018-1020

Аль Харбавии В.Э.К., Баимаков Д.И., Лукаткин А.С.

ОЦЕНКА ФИТОРЕМЕДИАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ СРЕДНЕЙ ПОЛОСЫ РОССИИ ДЛЯ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ ОТ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ.....1021-1024

Анисимов А.В., Ионенко И.Ф., Суслов М.А.

ВОДОПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ ПАРАМАГНИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ.....1025-1028

Анисова Ж.М., Сак М.М., Будкевич Т.А., Якушев Б.И.

ЭКЗОГЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ХВОЙНЫХ И ЛИСТВЕННЫХ ПОРОД В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ.....1029-1033

Астраханцева Н.В., Романова Л.И., Собачкин Д.С.

СОДЕРЖАНИЕ ПИГМЕНТОВ В ХВОЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В МОЛОДНЯКАХ ЕСТЕСТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ПРОЙДЕННЫХ РУБКАМИ УХОДА РАЗНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ1034-1037

Виноградова Е.Н.

УСТОЙЧИВОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ ТЕХНОГЕННЫХ ЭКОТОПОВ К ДЕЙСТВИЮ ПИРИДИНА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*1038-1042

Виноградова Н.А., Виноградова Е.Н.

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ГРУПП БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛИСТЬЯХ БОЯРЫШНИКА ОБМАНЧИВОГО.....1043-1046

Гетте И.Г., Коротаева Н.Е., Косов И.В., Боровский Г.Б.

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА В ХВОЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PINUS SYLVESTRIS* L.) В ПОСТПИРОГЕННЫЙ ПЕРИОД.....1047-1051

Домаш В.И., Канделинская О.Л., Иванов О.А., Грищенко Е.Р., Шарпио Т.П., Забрейко С.А.

РОЛЬ СИСТЕМЫ ПРОТЕОЛИЗА И ЛЕКТИНОВ В МЕХАНИЗМАХ АДАПТАЦИИ КУЛЬТУРНЫХ И ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ЛЭП1052-1054

Клюев Д.А., Макаров И.О., Дикарева Н.В.

ДЕЙСТВИЕ СЛАБОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ЭНДОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАТАЛАЗЫ И ПЕРОКСИДАЗЫ МИКРОМИЦЕТОВ - АКТИВНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ.....1055-1056

Клюев Д.А., Макаров И.О., Смирнов В.Ф., Смирнова О.Н., Аникина Н.А., Захарова Е.А., Яковлева А.А.

ДЕЙСТВИЕ СЛАБОГО НИЗКОЧАСТОТНОГО ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РОСТ И АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ МИКРОМИЦЕТОВ – АКТИВНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ1057-1058

Короткова А.М., Гавриш И.А., Галактионова Л.В.

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСОВ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА, ОКСИДА КРЕМНИЯ И МОЛИБДЕНА С ГУМИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ В ТЕСТЕ *TRITIMUM AESTIVUM* И *HORDEUM VULGARE*.....1059-1062

- Короткова А.М., Косян Д.Б.*
БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МЕТАЛЛОВ НА РАСТЕНИЕ *LEMNA MINOR*.....1063-1066
- Коротченко И.С., Мучкина Е.Я.*
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА НАКОПЛЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ЛИСТВЕННЫМИ И ХВОЙНЫМИ ПОРОДАМИ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ.....1067-1069
- Кузьмина А.М., Бухарина И.Л., Кузьмин П.А., Фахрутдинова А.С.*
АНАЛИЗ ДИНАМИКИ СОДЕРЖАНИЯ ТАНИНОВ И АКТИВНОСТЬ ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ В ЛИСТЯХ ТОПОЛЯ БАЛЬЗАМИЧЕСКОГО В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ СРЕДЫ.....1070-1073
- Кураמיшина З.М., Арефьева А.А., Смирнова Ю.В., Хайруллин Р.М.*
ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОЛИНА В РАСТЕНИЯХ *TRITICUM AESTIVUM L.*, ИНОКУЛИРОВАННЫХ ЭНДОФИТНЫМИ ШТАММАМИ *BACILLUS SUBTILIS*.
.....1074-1076
- Лысенко Е.А., Клаус А.А., Карташов А.В., Кузнецов В.В.*
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ Cd И ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ КАТИОНОВ ВНУТРИ ХЛОРОПЛАСТОВ. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПОДХОД К ПОИСКУ МИШЕНЕЙ Cd1077-1078
- Малева М.Г., Борисова Г.Г., Ширяев Г.И., Лукина П.Ю.*
ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ В ЛИСТЯХ БЕЛОКРЫЛЬНИКА БОЛОТНОГО В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ.....1079-1083
- Матюшевская Е.В., Киселев В.Н., Девгуть С.В.*
ГЕЛИОРАДИАЦИОННЫЙ ФАКТОР УСЫХАНИЯ СОСНЫ В БЕЛОРУССКОМ ПОЛЕСЬЕ.....1084-1088
- Матюшевская Е.В., Киселев В.Н., Яротов А.Е., Митрахович П.А., Девгуть С.В.*
ЕЛЬНИКИ БЕЛОРУССКОГО ПОЛЕСЬЯ В СОВРЕМЕННЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ ПОСЛЕ ОСУШИТЕЛЬНОЙ МЕЛИОРАЦИИ.....1089-1093
- Михайлова Т.А., Калугина О.В., Шергина О.В., Афанасьева Л.В.*
ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ФОТОСИНТЕЗА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ.....1094-1098
- Осмоловская Н.Г., Ву В.З., Билова Т.Е., Кучаева Л.Н., Попова Н.Ф.*
МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ОТКЛИК В ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ АМАРАНТА НА ДЕЙСТВИЕ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ КАДМИЯ И ЦИНКА В СРЕДЕ1099-1102
- Осмоловская Н.Г., Самута В.Ю., Богомазова М.В., Кузина О.Н., Куриленко В.В.*
ФИТОРЕМЕДИАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕКОТОРЫХ ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ГОРОДСКИХ ПОЧВ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ.....1103-1105
- Островская Р.М.*
БИОТЕСТИРОВАНИЕ ПЕСТИЦИДОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАСТЕНИЙ И ГРИБОВ.....1106-1110
- Помазкина Л.В.*
ОЦЕНКА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПОЧВЕННОГО МИКРОБНОГО КОМПЛЕКСА И СОСТОЯНИЯ АГРОЭКОСИСТЕМ В УСЛОВИЯХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ И ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ.....1111-1115
- Пухальский Я.В., Воробьев Н.И., Шапошников А.И., Пицик В.Н., Свиридова О.В., Толмачев С.Ю.*
РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЛИЯНИЯ ПЕРЕМЕННЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА БИОСИСТЕМУ «БАКТЕРИИ *SPHINGOMONAS SP. K1B* – РАСТЕНИЯ ГОРОХА» В УСЛОВИЯХ ГИДРОПОННОЙ КУЛЬТУРЫ.....1116-1120
- Пухальский Я.В., Шапошников А.И., Лоскутов С.И., Азарова, Т.С., Белимов А.А.*
ИЗМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИОННОГО СОСТАВА КОРНЕВЫХ ЭКССУДАТОВ У РАСТЕНИЙ ГОРОХА ПОСЕВНОГО ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ.....1121-1125

<i>Саратовских Е.А.</i> ВЛИЯНИЕ ПЕСТИЦИДОВ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ	1126-1134
<i>Скрипальщикова Л.Н., Стасова В.В.</i> СТАБИЛЬНОСТЬ РАЗВИТИЯ ЛИСТОВОЙ ПЛАСТИНКИ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ В ПРИГОРОДАХ КРАСНОЯРСКА.....	1135-1138
<i>Смирнова Ю.В., Кураמיшина З.М., Хайруллин Р.М.</i> ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НИКЕЛЯ В КОРНЯХ ПШЕНИЦЫ.....	1139-1142
<i>Спиридонова Е.В., Нестеркина И.С., Гурина В.В., Озолина Н.В.</i> ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА МЕТАБОЛИЗМ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ.....	1143-1145
<i>Сыщиков Д.В., Агурова И.В., Сыщикова О.В.</i> ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ АНТРОПОГЕННО ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЭКОСИСТЕМ ДОНЕЦКО-МАКЕЕВСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОЙ АГЛОМЕРАЦИИ.....	1146-1150
<i>Третьякова М.С., Беловежец Л.А., Соколова Л.Г., Зорина С.Ю., Маркова Ю.А., Макарова Л.Е.</i> ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАСТЕНИЯМИ В УСКОРЕНИИ ПРОЦЕССОВ РАЗЛОЖЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ.....	1151-1154
СЕКЦИЯ 4. БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ.....	1155
<i>Алиев К., Партоев К., Давлятназарова З.Б.</i> СОВРЕМЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И ЕЁ ПЕРСПЕКТИВЫ В ТАДЖИКИСТАНЕ.....	1156-1159
<i>Анапияев Б.Б., Исакова К.М., Бейсенбек Е.Б., Сарбаев А.Т., Ахметова А.Б.</i> БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К РЖАВЧИНЫМ БОЛЕЗНЯМ.....	1160-1163
<i>Архипов М.В., Потрахов Н.Н., Тюкалов Ю.А., Данилова Т.А., Прияткин Н.С., Гусакова Л.П.</i> ВОЗМОЖНОСТИ ЦИФРОВОЙ РЕНТГЕНОГРАФИИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЗЕРНОВКИ В ПРЕЦИЗИОННЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ И СЕМЕНОВОДСТВЕ.....	1164-1167
<i>Бабкин В.А., Остроухова Л.А.</i> БЕЗОТХОДНАЯ ПЕРЕРАБОТКА БИОМАССЫ СИБИРСКОЙ ЛИСТВЕННИЦЫ – ОСНОВНОЙ ЛЕСООБРАЗУЮЩЕЙ ПОРОДЫ БУРЯТИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЙ.....	1168-1171
<i>Батукаев М.С., Палаева Д.О., Батукаев А.А.</i> МИКРОЧЕРЕНКОВАНИЕ ВИНОГРАДА <i>IN VITRO</i>	1172-1175
<i>Батукаев М.С., Шишхаева М.Г., Батукаев А.А.</i> ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРИ РАЗМНОЖЕНИИ НОВЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА <i>IN VITRO</i>	1176-1179
<i>Беловежец Л.А., Левчук А.А., Онучина Н.А.</i> СПОСОБНОСТЬ ЭТИЛАЦЕТАТНЫХ ФРАКЦИЙ ДРЕВЕСИНЫ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ ПОДАВЛЯТЬ РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	1180-1182
<i>Берестовой М.А., Павленко О.С., Тюрин А.А., Сидоров Р.А., Голденкова-Павлова И.В.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ БЕЛКОВ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ С ПОМОЩЬЮ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ, НА ПРИМЕРЕ АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ Δ9- ДЕСАТУРАЗЫ.....	1183-1186
<i>Бессолицына Е.К., Горина С.С., Топоркова Я.Ю., Мухтарова Л.Ш., Гречкин А.Н.</i> ДУАЛИСТИЧНЫЕ ЦИТОХРОМЫ P450 ПОДСЕМЕЙСТВА CYP74B.....	1187-1190
<i>Болотова Т.А., Субота И.Ю., Тарасенко В.И., Константинов Ю.М., Кулинченко М.В.</i> ИЗУЧЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПОПУЛЯЦИИ МИТОХОНДРИЙ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ.....	1191-1194

<i>Бояркина С.В., Омеличкина Ю.В., Шафикова Т.Н.</i> ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ТАБАКА НА ВОЗДЕЙСТВИЕ БИОТРОФА <i>CLAVIBACTER MICHIGANENSIS</i> И НЕКРОТРОФА <i>PESTOVACTERIUM CAROTOVORUM</i>	1195-1198
<i>Буренина А.А., Астафурова Т.П., Сурнина Е.Н.</i> СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НАНОЧАСТИЦ ZnO.....	1199-1202
<i>Бурыгин Г.Л., Каргаполова К.Ю., Красова Ю.В., Ткаченко О.В.</i> ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ФЛАГЕЛЛИНАМИ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ	1203-1205
<i>Быбин В.А., Турская А.Л., Максимова Л.А., Маркова Ю.А.</i> ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РЯДА АЛКАЛОИДОВ НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ РАЗНЫХ ВИДОВ	1206-1209
<i>Волобуева О.Г.</i> СОДЕРЖАНИЕ ФИТОГОРМОНОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИМБИОЗА РАСТЕНИЙ ФАСОЛИ РАЗНЫХ СОРТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ КОРНЕВИНА И РИЗОТОФИНА.....	1210-1214
<i>Волобуева О.Г., Мирошникова М.П.</i> ИЗМЕНЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КЛУБЕНЬКОВ РАСТЕНИЙ ФАСОЛИ СОРТОВ ГЕЛИАДА И ШОКОЛАДНИЦА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭПИН-ЭКСТРА.....	1215-1218
<i>Горина С.С., Смирнова Е.О., Фатыхова В.С., Ильина Т.М., Топоркова Я.Ю., Мухтарова Л.Ш., Гречкин А.Н.</i> СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХРОМОВ P450 ПОДСЕМЕЙСТВА CYP74B.....	1219-1221
<i>Горностай Т.Г., Захаров Ю.Б., Боровский Г.Б., Оленников Д.Н.</i> РЕГУЛЯЦИЯ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА МИЦЕЛИЯ <i>INONOTUS RHEADES</i> ПОД ДЕЙСТВИЕМ СВЕТА.....	1222-1224
<i>Граскова И.А., Перфильева А.И., Клименков И.В., Сухов Б.Г.</i> АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОКОМПЗИТОВ.....	1225-1228
<i>Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Румянцева Н.И.</i> БИОСИНТЕЗ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ И СПОСОБЫ ЕГО АКТИВАЦИИ	1229-1233
<i>Дейнеко Е.В.</i> МОЛЕКУЛЯРНОЕ ФЕРМЕРСТВО: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	1234-1235
<i>Жигачева И.В.</i> ПРОСТРАНСТВЕННО ЗАТРУДНЕННЫЕ ФЕНОЛЫ ПОВЫШАЮТ УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ.....	1236-1240
<i>Зайцева Ю.В., Сидоров А.В., Бычкова А.А.</i> ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПОДЗЕМНЫМИ ОРГАНАМИ <i>DACTYLORHIZA INCARNATA</i> (L.) SOO (ORCHIDACEAE).....	1241-1243
<i>Золотовская Е.Д., Протопопова М.В., Коновалов А.Д., Павличенко В.В.</i> ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ТОПОЛЯ БЕРЛИНСКОГО ГЕНОМ ДЕГИДРИНА <i>WCS120</i> ИЗ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ	1244-1247
<i>Искакова К.М., Анатяев Б.Б., Бейсенбек Е.Б., Омарова А.Ш., Тузелбаева Ш.Р.</i> КУЛЬТУРА СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК <i>SORGHUM BICOLOUR</i> L. <i>IN VITRO</i>	1248-1252
<i>Кабардаева К.В., Тюрин А.А., Гра О.А., Фадеев В.С., Мустафаев О., Голденкова-Павлова И.В.</i> АНАЛИЗ МОТИВОВ 5'-НТО <i>A. THALIANA</i>	1253-1254
<i>Калашишникова Е.А., Киракосян Р.Н.</i> ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА ГРИБЫ РОДА <i>FUSARIUM</i> L	1255-1257

<i>Караев С.Ф., Киёмова З.С., Назарова Н.Н., Алиев К.А.</i> РЕГУЛЯЦИЯ НЕКОТОРЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ГЕНОТИПОВ КАРТОФЕЛЯ <i>IN VITRO</i> В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ.....	1258-1263
<i>Киёмова З.С., Караев С.Ф., Назарова Н.Н., Норкулов Н., Алиев К.А.</i> ДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРА РОСТА НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ У ГЕНОТИПОВ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ.....	1264-1267
<i>Кирпичникова А.А., Чэнь Т., Теплякова С., Шишова М.Ф.</i> ИЗМЕНЕНИЕ АЦИДОФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ Н ⁺ -АТФазы ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ТАБАКА VBI-0	1268-1271
<i>Клименко Е.С., Шмаков В.В., Болотова Т.А., Субота И.Ю., Тарасенко В.И., Кулинченко М.В., Константинов Ю.М.</i> ИЗУЧЕНИЕ ИМПОРТА ДНК В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ РЕКОНСТРУКЦИИ.....	1272-1275
<i>Константинов Ю.М., Болотова Т.А., Dietrich A., Weber-Lotfi F., Кулинченко М.В.</i> ИЗУЧЕНИЕ ИМПОРТА ДНК РАЗНОЙ ДЛИНЫ И СТРУКТУРЫ В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ	1276-1279
<i>Костюкова Ю.А., Румянцева Н.И.</i> ВЛИЯНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ЭКСПЛАНТА НА ИНДУКЦИЮ ЭМБРИОГЕННЫХ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ.....	1280-1284
<i>Кочетов А.А., Синявина Н.Г.</i> ВЫТЯЖКА ИЗ ЛИСТА СТЕВИИ – ПРИРОДНЫЙ СТИМУЛЯТОР РОСТА РАСТЕНИЙ.....	1285-1289
<i>Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е.</i> ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ <i>IN PLANTA</i> В СТАДИИ РАЗВИТИЯ, ОПТИМИЛЬНОЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КАЛЛУСА В ЦЕЛЯХ ИЗУЧЕНИЯ В МОДЕЛЬНЫХ СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	1290-1294
<i>Кутковски-Муштук А.И., Чоркина Н.Г., Лозинский М.Г.</i> СОХРАНЕНИЕ РЕДКОГО ВИДА <i>BELLEVALIA SARMATICA</i> (GEORGI) WORONOW КУЛЬТУРЫ <i>IN VITRO</i>	1295-1298
<i>Кутковски-Муштук А.И., Чоркина Н.Г., Трофим М.И.</i> МЕТОД КУЛЬТИВИРОВАНИЕ <i>IN VITRO</i> ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ <i>WITHANIA SOMNIFERA</i> L. (DUNAL).....	1299-1302
<i>Кучарова Е.В., Охлопкова Ж.М.</i> ПЕРСПЕКТИВЫ <i>DRACOSERHALUM</i> В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК	1303-1304
<i>Лебедев В.Г., Шестибратов К.А.</i> КОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОЦЕНКЕ ФЕНОТИПА ТРАНСГЕННЫХ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ	1305-1307
<i>Луговцова С.Ю., Нешумаева Н.А., Зобова Н.В.</i> ВЛИЯНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ МЕТАБОЛИТОВ <i>FUSARIUM SPOROTRICHIOIDES</i> НА ПРОЦЕССЫ РЕГЕНЕРАЦИИ <i>AVENA SATIVA</i> В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ	1308-1312
<i>Мартиросян Ю.Ц., Мартиросян В.В., Кособрюхов А.А.</i> СОВРЕМЕННЫЕ СВЕТОДИОДНЫЕ ИСТОЧНИКИ СВЕТА КАК ФАКТОР ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЙНОСТИ РАСТЕНИЙ	1313-1315
<i>Низкородова А.С., Мусабаев Р.У., Каримов Н.Ж., Исаков Б.К.</i> ЭНХАНСЕРЫ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ ТРАНСЛЯЦИИ В УСЛОВИЯХ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА.....	1316-1320
<i>Ножкина О.А., Перфильева А.И., Граскова И.А., Сидоров А.В., Сухов Б.Г.</i> ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ЭФФЕКТА НАНОКОМПОЗИТОВ СЕРЕБРА НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ И ИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ КАРТОФЕЛЯ.....	1321-1326

Нурминский В.Н., Захаров Ю.Б. ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА И ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА НА ФОТОСИНТЕЗ РАСТЕНИЙ	1327-1329
Павличенко В.В., Протопопова М.В., Войников В.К. ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ <i>POPULUS</i> × <i>BEROLINENSIS</i>	1330-1333
Павловская Н.Е., Гагарина И.Н. ФИЗИОЛОГО- БИОХИМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОЗДАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ БОЛЕЗНЕЙ	1334-1338
Панфилов А.В., Константинов Ю.М., Кулинченко М.В. ПОСТАНОВКА МЕТОДА ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕЧЕНИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК РАЗНОЙ ДЛИНЫ И АНАЛИЗА ИМПОРТА МЕЧЕНЫХ СУБСТРАТОВ В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ	1339-1343
Протасов Е.С., Аксенов-Грибанов Д.В., Краснова М.Е., Дмитриев И.А., Емианова В.А., Мадьярова Е.В., Тимофеев М.А. БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АКТИНОБАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БАЙКАЛЬСКИМИ ЭНДЕМИЧНЫМИ АМФИПОДАМИ - ФИТОФАГАМИ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОТОПОВ ОЗЕРА	1344-1347
Рекославская Н.И., Салеев Р.К., Столбиков А.С. О СПОСОБАХ ИНТЕНСИФИКАЦИИ СИНТЕЗА АНТИГЕННЫХ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВИРУСНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ИННОВАЦИОННЫХ ВАКЦИН НА БАЗЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСПРЕССИОННЫХ СИСТЕМ	1348-1352
Рудиковский А.В., Гамбург К.З. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ МИНДАЛЯ ТРЁХЛОПАСТНОГО (<i>PRUNUS TRILOBA</i> <i>LINDL.</i>)	1353-1357
Румянцева Н.И., Акулов А.Н., Лайков А.В., Гумерова Е.А., Костюкова Ю.А. СЕКРЕТОМЫ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР ГРЕЧИХИ С РАЗНОЙ МОРФОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ	1358-1362
Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Галин И.Р., Веселов Д.С. ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ <i>IN VITRO</i> У ЯЧМЕНЯ	1363-1366
Семёнова Н.В., Шмаков В.Н., Дударева Л.В. НЕЙТРАЛЬНЫЕ ЛИПИДЫ ЭМБРИОГЕННЫХ И НЕЭМБРИОГЕННЫХ КАЛЛУСНЫХ ЛИНИЙ <i>LARIX SIBIRICA</i> LEDEV.....	1367-1371
Сивцева С.В., Охлопкова Ж.М. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ ПОЛЫНИ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ЯКУТИИ	1372-1374
Солодухина Н.В., Чередниченко М.Ю. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ <i>ELSHOLTZIA CILIATA IN VITRO</i>	1375-1377
Столбиков А.С., Салеев Р.К., Рекославская Н.И. ПЛАСТИДНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КАЛЛУСОВ РАСТЕНИЙ ТОМАТА БИОБАЛЛИСТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИН ПРОТИВ ОНКОГЕННОЙ ПАПИЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ.....	1378-1380
Столповская Е.В., Трофимова Н.Н., Бабкин В.А. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА С БИОГЕННЫМИ МЕТАЛЛАМИ.....	1381-1384
Тарасенко В.И., Болотова Т.А., Кулинченко М.В., Константинов Ю.М. ИССЛЕДОВАНИЕ ИМПОРТА ДНК В МИТОХОНДРИИ <i>IN VIVO</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОПЛАСТОВ АРАБИДОПСИСА.....	1385-1387

<i>Теплякова С.Б., Чэнь Т., Кирпичникова А.А., Емельянов В.В., Шишова М.Ф.</i> РОЛЬ АВР1 В РЕГУЛЯЦИИ ПРОТОН-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ Н ⁺ -АТФазы ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ТАБАКА ВУ-2 ДИКОГО ТИПА И NAS	1388-1391
<i>Третьякова И.Н., Пак М.Э., Лисецкая И.А., Баранова А.А., Рогожин Е.А., Садыкова В.С.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ И МИКРОМИЦЕТОВ РОДА TRICHODERMA ДЛЯ ВЫХОДА ЭМБРИОГЕННЫХ КУЛЬТУР <i>LARIX SIBIRICA</i>	1392-1396
<i>Турская А.Л., Маркова Ю.А., Адамович С.Н., Ушаков И.А., Оборина Е.Н., Третьякова М.С., Беловежец Л.А.</i> ПРОТАТРАНЫ – СИНТЕТИЧЕСКИЕ БИОСТИМУЛЯТОРЫ РОСТА МИКРООРГАНИЗМА- НЕФТЕДЕСТРУКТОРА <i>RHODOCOCCUS SP</i>	1397-1400
<i>Тюрин А.А., Павленко О.С., Кабардаева К.В., Гра О.А., Фадеев В.С., Мустафаев О., Голденкова-Павлова И.В.</i> ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ.....	1401-1402
<i>Файзиева С.А., Алиев У.К., Худжамерова Ф.Б., Алиев К.А.</i> ПОЛУЧЕНИЕ МОРФОГЕННЫХ КАЛЛУСОВ РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	1403-1406
<i>Филонова М.В., Пулькина С.В., Фомина Т.И., Чурин А.А.</i> ЦИТО-ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ <i>ACONITUM VARBATUM</i> PATR. EX PERS	1407-1410
<i>Филонова М.В., Шилова И.В., Медведева Ю.В., Чурин А.А.</i> ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ <i>CONIUM MACULATUM L.</i>	1411-1413
<i>Хоцкова Л.В., Степанюк Г.Я., Астафурова Т.П.</i> ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ НА МОРФОГЕНЕЗ ПРОРОСТКОВ <i>CYMBIDIUM HYBRIDUM</i> В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	1414-1417
<i>Цыгурская Е.В., Николаева Т.Н., Загоскина Н.В.</i> ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ <i>IN VITRO</i> КУЛЬТИВИРУЕМЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ГЕНАМИ ДЕСАТУРАЗ.....	1418-1422
<i>Чоркинэ Н.Г., Табара М.А., Кутковски-Муштук А.И., Трофим М.И., Лозински М.Н.</i> <i>LYCIUM BARBARUM L.</i> (ГОЖИ) В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> СОРТ 'ЭРМА'.....	1423-1426
<i>Чэнь Т., Кирпичникова А.А., Теплякова С.Б., Романюк Д.А., Емельянов В.В., Шишова М.Ф.</i> ИЗМЕНЕНИЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И УРОВНЯ БЕЛКА ПРОТОННЫХ НАСОСОВ ТОНОПЛАСТА КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ТАБАКА ВУ-2 В ХОДЕ РОСТА РАСТЯЖЕНИЕМ	1427-1430
<i>Ящуревская М.Н., Чередниченко М.Ю.</i> МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>SALVIA</i> В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	1431-1433
<i>Kershanskaya O.I., Kuli Zh., Maulenbay A., Nelidova D., Nelidov S.N., Stephens J.</i> NEW CRISPR/CAS9 GENE EDITING TECHNOLOGY FOR DEVELOPMENT OF AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY.....	1434-1437
ДОКЛАДЫ В РАМКАХ ШКОЛЫ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ.....	1438
<i>Константинов Ю.М.</i> ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ В ПРИРОДЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ.....	1439-1440
<i>Соловьев А.Г.</i> МАЛЫЕ РНК: РОЛЬ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ ОТ ПАТОГЕНОВ.....	1441-1442
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ.....	1443

Научное издание

**Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к
неблагоприятным условиям среды**

**Сборник материалов (в двух частях)
Всероссийской научной конференции
с международным участием и школы молодых ученых
(Иркутск, 10–15 июля 2018 г.)**

ЧАСТЬ II

Техническая редакция и оригинал макет
О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова, И.В. Федосеева, Л.Е. Макарова

Дизайн обложки
Ю.А. Розина, Н.В. Дорофеев, Т.В. Копытина

Подписано в печать 03.07.2018 г.
Формат 60×90/8. Гарнитура Times New Roman. Бумага Ballet.
Уч.-изд. л. 63,0. Усл. печ. л. 67,2. Тираж 300 экз. Заказ № 816.

Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 1