

СЕКЦИЯ «БИОЛОГИЯ»**ПОДСЕКЦИЯ «ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ»****Компоненты липидного и пигментного комплекса растений при оценке
холодостойкости представителей семейства *Rhododendron*****Антонюк Татьяна Николаевна, аспирант****Таран Наталья Юрьевна, доктор биол. наук, проф***Киевский национальный университет имени Тараса Шавченко, Киев, Украина**E-mail: antonyk_t@bigmir.net*

Каждому виду растений отвечает четкий ареал естественного распространения. Географическое происхождение, наследственные биологические особенности, диапазоны адаптационных возможностей, которые выработались в процессе исторического развития, и климатические условия места интродукции являются важными факторами, которые определяют стойкость растений. Процесс адаптации рододендронов зависит от реакции растения на культивирование в новых условиях, которые обуславливают изменение метаболических процессов на действие новых факторов. Критическим в годовом цикле роста и развития рододендронов (особенно вечнозеленых) является зимний период с бесснежными зимами, резкими перепадами температур и постоянными ветрами. Для большинства видов рододендронов данные условия являются стрессовыми и ведут к активизации биохимических адаптивных реакций, которые проявляются в трансформации специфических защитных веществ фенольной и липидной природы, а также компонентов пигментного комплекса. Изучение особенностей трансформации этих веществ и было целью настоящей работы. Исследования проводились на шести представителях семейства *Rhododendron*: трех вечнозеленых (*Rh. fortunei*, *Rh. ponticum*, *Rh. amesiae*), и трех представителей полувечнозеленых (*Rh. obtusum*, *Rh. micranthum*, *Rh. Ledebourii*), интродуцированных в климатических условиях Лесостепи Украины. Анализ пигмент-липидных маркеров в процессе осенне-зимней вегетации растений показал, что снижение температуры влечет изменение соотношения хлорофиллов а/б в листьях вечнозеленых видов рододендронов. Максимальное снижение концентрации хлорофилла а и b, и увеличение концентрации каротиноидов отмечено для вида *Rh. Ponticum*, что свидетельствует о его низкой зимостойкости. В то же время, виды *Rh. obtusum*, *Rh. micranthum*, *Rh. Ledebourii* отмечались меньшей чувствительностью пигментного комплекса к низким температурам, поскольку снижение содержания хлорофиллов а и b у них было менее существенно при неизменном содержании каротиноидов. У вечнозеленых рододендронов *Rh. fortunei*, *Rh. amesiae*, содержание хлорофилла а в зимние месяцы – январь, февраль увеличивалось 1,2-1,3 раза, что свидетельствует об активизации адаптационных реакций фотосинтетического аппарата данных видов рододендронов к действию низких температур. Результаты исследования адаптивных реакций липидных компонентов фотосинтезирующих тканей показали, что растения реагируют на холод повышением содержания липидов. Среди изменений содержания липидов отмечено накопление сульфолипида (СЛ), который свидетельствует о стабилизации мембран и обеспечении оптимальных условий для функционирования процессов фотосинтеза. После снижения температуры до - 4°C отмечено максимальное увеличение сульфолипида в листьях видов *Rh. obtusum*, *Rh. micranthum*, *Rh. Ledebourii*, а у вида *Rh. ponticum* отмечена противоположная тенденция - уменьшение их количества. При снижении температуры до - 9°C у всех видов рододендронов наблюдалось снижение содержания сульфолипида. Исследование маркерных показателей биохимических адаптационных реакций –

пигментов и сульфоллипидов, позволило охарактеризовать виды *Rh. obtusum*, *Rh. micranthum*, *Rh. Ledebourii* как зимостойкие, виды *Rh. fortunei*, *Rh. amesiae* как среднезимостойкие, а вид *Rh. ponticum* как слабозимостойкий.

**Анализ содержания пигментов полупаразитного растения омелы окрашенной
Апрошенко Василина Николаевна¹, Леусова Наталья Юрьевна²
аспирант¹, к.б.н.²**

Дальневосточный Государственный Аграрный Университет¹, Благовещенск,
Россия; Институт геологии и природопользования ДВО РАН², Благовещенск, Россия

Омела окрашенная *Viscum coloratum* (Ком.) Nakai представляет собой вечнозеленый шарообразной формы до 1 м в диаметре кустарник-полупаразит [4]. Она паразитирует на лиственных деревьях – осине, тополе, иве, чозении, березе, липе, клене, яблоне, груше и др. Пораженные омелой деревья ослабевают и отстают в росте [1]. Омеловые обладают собственным фотосинтезом, однако сведения по фотосинтетическим особенностям этого вечнозеленого кустарника остаются фрагментарными. Есть данные, что листья омелы фиксируют CO₂ в процессе фотосинтеза с той же скоростью, что и листья растения-хозяина [2]. Абсолютное содержание пигментов и их соотношение у любого вида растений величина непостоянная. Она может значительно варьировать в зависимости от интенсивности и качества света, структурных особенностей листовой пластинки и пр. Изучение растений из разных местообитаний показало, что изменение качественных и количественных показателей пигментного комплекса многие авторы рассматривают как один из возможных путей адаптации растений [3]. Так снижение отношения хлорофиллов a/b характерно для теневыносливых растений в сравнении со светолюбивыми. Поскольку омеловые являются полупаразитными растениями можно предположить, что они имеют, кроме того, специфические особенности пигментного комплекса в связи с их образом жизни. Целью данной работы был сравнительный анализ пигментного комплекса у омелы окрашенной, произрастающей на разных растениях-хозяевах. Для определения содержания хлорофилла использовали листья омелы окрашенной, собранной в июле 2007 года с ивы козьей, ивы Шверина, черемухи Маака, липы амурской. Анализ содержания пигментов показал, что количество хлорофиллов в расчете на сырой вес не зависело от вида растения-хозяина и составляло от 0,72±0,06мг до 1,10±0,09 мг хлорофилла на 1 г сырого веса, что значительно ниже по сравнению с непаразитными растениями. Соотношение хлорофиллов a/b равно 1. Таким образом, нами выявлены адаптивные реакции растения омелы окрашенной на уровне пигментного аппарата. По соотношению содержания хлорофилла a и b в листьях омелы окрашенной можно сделать вывод что, омела относится к теневыносливым растениям или приспосабливается к этому в процессе жизни. Вид растения-хозяина, вероятно, не играет существенной роли на содержание фотосинтетических пигментов и процессы фотосинтеза в целом определяются генетически.

Список литературы:

1. Бейлин, И.Г. Цветковые полупаразиты и паразиты / И.Г. Бейлин. – М.: Наука, 1968. – С. 15 – 29.
2. Евстегнеева, З.Г. Некоторые особенности азотного метаболизма облигатнопаразитных и полупаразитных растений / З.Г. Евстегнеева, Н.А. Соловьева // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т.35 №2. – С. 117 – 122.
3. Ронжина, Д.А. Структура фотосинтетического аппарата листа пресноводных гидрофитов. II. Количественная характеристика мезофилла листа и функциональная активность листьев с разной степенью погружения. / Д.А. Ронжина, В.И. Янков // Физиология растений. – 2001. – Т.48 – С. 836 – 845.
4. Сосудистые растения советского Дальнего Востока. / Отв. ред. С.С. Харкевич – СПб.: Наука, 1995. – Т.7 – С. 252.

**Изучение особенностей культивирования соматических тканей
подсолнечника *in vitro*.**

Багдалова Алия Зягитовна

студент

*ФГОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова»*

E-mail: aliya-bagdalova@rambler.ru

Внедрение в сельское хозяйство высоких технологий, основанных на последних достижениях биотехнологии способно качественно изменить ситуацию в агро сфере. Клеточная биотехнология и биоинженерия ООН объявлены важнейшими научными и производственными приоритетами XXI века. С помощью биотехнологии можно значительно сократить затраты на создание высокоурожайных форм и сортов растений. Целью данной работы являлось изучение влияния генотипа экспланта и гормонального состава питательной среды на каллусогенез у подсолнечника. В качестве материала для исследований использовали пять сортов подсолнечника: ЮВ-28Б, Саратовский 82, Саратовский 85, Скороспелый 87, Саратовский 20. Гипокотили стерильных проростков делили на фрагменты размером 3-5мм в стерильных условиях ламинар-бокса и инокулировали на питательную среду Мурасиге-Скуга с двумя вариантами фитогормонов: 1) 2,4Д 4 мг/л и 6БАП 1 мг/л; 2) 6БАП 6 мг/л и ИУК 0,5 мг/л. Кроме изучения влияния фитогормонов оценивали зависимость эффективности образования каллуса от ориентации экспланта на питательной среде. Фрагменты гипокотилля помещали на поверхность питательной среды в горизонтальном положении с поперечными насечками и вертикальном положении без насечек. Анализ полученных культур показал, что каллус образуется у всех генотипов с разной эффективностью. На первом варианте среды отмечается низкая эффективность каллусогенеза. Каллус образовывался на эксплантах в единичных случаях, при этом величина каллуса не превышала 2мм в диаметре. Наблюдался некроз тканей, они были не пригодны для дальнейшей регенерации растений. Тем не менее у сортов ЮВ-28Б и Скороспелый 87 выход каллуса в 2-3 раза превышал соответствующие показатели остальных сортов. На втором варианте среды значительно лучше каллус образовывался у сорта Саратовский 20 (выход каллуса составил 80%), а также у сорта Скороспелый 87 (выход каллуса составил 79%). У сорта ЮВ-28Б (выход каллуса составил 44%), что значительно хуже, чем у остальных сортов на этом варианте среды, а также чем у сорта ЮВ-28Б на первом варианте среды. У сорта ЮВ-28Б при значительно меньшей способности к образованию каллуса формировались только мелкие плотные зеленые каллусы. У остальных 4 сортов разные типы каллусов образовались примерно с одинаковой частотой. Изучение влияния ориентации фрагментов гипокотилей на питательной среде показало, что для генотипов Саратовский 85, Скороспелый 87 и Саратовский 20 не имеет принципиального значения положения экспланта на питательной среде. Для генотипа ЮВ-28Б достоверно лучшие результаты по каллусогенезу получены при горизонтальной ориентации фрагментов гипокотилей на среде, а у сорта Саратовский 82 – при вертикальной ориентации. Можно предположить, что для большинства генотипов более приемлемой является горизонтальная ориентация экспланта на питательной среде, как более технологически удобная. Установлено, что среди пяти сортов подсолнечника лучшей способностью к каллусогенезу на различных средах обладает сорт Скороспелый 87. Каллус подсолнечника на фрагментах гипокотилля, возможно, получать достаточно эффективно на питательной среде содержащей 6БАП – 6 мг/л в сочетании с ИУК – 0,5 мг/л. Для

регенерации полученных каллусов необходимо подбирать фитогормональный состав среды и условия культивирования.

Молекулярные механизмы адаптации хлоропластов к тепловому шоку: экспрессия генов пластома

Барташевич Дарья Александровна

студентка

Российский государственный аграрный университет-МСХА им. К.А.Тимирязева,
Москва, Россия

E-mail: bartashevichda@mail.ru

Изучалось влияние теплового шока на транскрипцию генов пластома, кодирующих фотосинтетический комплекс и пластидный аппарат экспрессии генов. Изучение транскрипции проводили на первых листьях 7-дневных проростков ячменя. Обработку повышенной температурой (400С) проводили *in vivo*, в течение 1,5 и 3 ч. Среди фотосинтетических генов наибольший интерес вызывает реакция генов, кодирующих апопротеины реакционных центров ФС I и ФС II: транскрипция этих генов значительно усиливалась через 1,5 ч. после начала воздействия повышенной температуры, а еще через 1,5 ч. уменьшалась, возвращаясь к контрольному уровню. После 3 ч. воздействия теплового шока наблюдали активацию транскрипции генов, кодирующих субъединицы НАД(Ф)•Н пластохинон-оксидоредуктазы, рибосомных белков и генов мультисубъединичной РНК-полимеразы (РЕР). Наблюдаемая активация транскрипции распространяется не на все гены электрон-транспортной цепи фотосинтетических мембран. Гены, кодирующие периферийные белки ФС II, не проявили подобной реакции: их транскрипция практически не изменяется. Активация транскрипции генов белков рибосом наблюдается не только в интактных растениях, но и при тепловой обработке изолированных хлоропластов. Это позволяет предполагать, что в условиях теплового шока изменяются свойства транскрипционных факторов внутри хлоропластов, в связи с этим можно сделать вывод о наличии внутри хлоропластов механизма регуляции активности транскрипционного аппарата и/или транскрипционных факторов. Предварительное исследование показало, что в условиях теплового шока наблюдается и дифференциальное изменение стационарного уровня мРНК: уровень мРНК *rbcL* уменьшается, а уровень мРНК *psbA* – возрастает.

**Динамика лектиновой активности проростков пшеницы при инфицировании
Pseudocercospora herpotrioides Fron.**

**Белава Виктория Назаровна, Панюта Ольга Александровна, Таран Наталья
Юрьевна**

аспирант, доцент, профессор

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, биологический
факультет, Киев, Украина*

E-mail: v987@voliacable.com , panyuta@ukr.net , tarantul@univ.kiev.ua

Лектины растений, как белки, отвечающие за процесс узнавания чужеродного агента, его связывание, предотвращение или замедление процесса инфицирования, а также как начальное звено элиситор-индуцируемого запуска сигнальных систем растительной клетки участвуют в формировании иммунитета растения. В связи с этим мы исследовали динамику лектиновой активности (ЛА) в тканях проростков сортов озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с разной устойчивостью к церкоспореллёзу (возбудитель *Pseudocercospora herpotrioides* Fron.). В наших экспериментах ЛА определяли методом ратусэритроагглютинации [1]. Прорастающие семена пшеницы восприимчивого и относительно устойчивого сортов инфицировали суспензией конидий (титр 5-7х10⁴ КОЕ/см³). ЛА в проростках определяли в течение первых пяти суток с момента инфицирования. Уровень ЛА изменялся незначительно. При этом у резистентного сорта он был на 20-50% выше, чем у восприимчивого; различия в содержании ЛА в тканях контрольных и инфицированных растений в пределах сорта были незначительными. Это позволило предположить, что более явная картина изменения ЛА в инфицированных и здоровых тканях наблюдается на более ранних этапах патогенеза. В следующей серии экспериментов определяли динамику ЛА в проростках пшеницы в первые часы после инфицирования (каждые 1,5 часа). Одновременно исследовали возможность индукции ЛА перекисью водорода, как одним из звеньев механизма ограничения пролонгированных защитных реакций при патогенезе [2]. В контрольных вариантах ЛА в течение шести часов постепенно снижалась. При этом начальный уровень ЛА у резистентного сорта был в 7,8 раз выше, чем у восприимчивого. В инфицированных проростках выявлено резкое возрастание ЛА (в 10,2 раз по отношению к контролю) через 1,5 ч. в проростках устойчивого сорта и постепенное повышение ЛА (в 9,5 раз по отношению к контролю) через 3ч. в проростках восприимчивого сорта. В вариантах с перекисью водорода в проростках устойчивого сорта начальный уровень ЛА составлял 43,5% от контроля, затем наблюдалось постепенное снижение ЛА до уровня контроля (к 4,5 часу). В проростках восприимчивого сорта начальный уровень ЛА составлял 175% от контроля, затем наблюдалось снижение ЛА до контрольного значения (к 6-му часу). При инфицировании предобработанных Н₂О₂ проростков сортов с разной устойчивостью к церкоспореллёзу временная динамика ЛА сохранялась, но у устойчивого сорта максимум ЛА был ниже, чем в варианте без Н₂О₂ (на 6,5%), а у восприимчивого - выше (на 11,9%). На наш взгляд, степень устойчивости сорта определяется скоростью запуска защитных реакций (в данном случае синтеза лектинов), а сила реакции (в данном случае ЛА) - количеством запасных лектиновых мРНК.

Литература:

1. Погоріла Н.Ф., Суржик Л.М., Погоріла З.О. (2002) Новий спосіб тестування лектинів рослин // Український ботанічний журнал.-Т.59, №2, с.217-220.
2. Бабоша А.В. (2006) Изменение содержания агглютинина зародышей пшеницы в растениях, обработанных перекисью водорода // Прикладная биохимия и микробиология.-Т.24, №2, с.247-251.

**Особенности процесса дыхания в культивируемых *in vitro*
клетках *Dioscorea deltoidea* Wall.**

Беркович Е.А.

МГУ им. М.В. Ломоносова

berkovichster@gmail.com

Суспензионная культура растительных клеток является удобной модельной системой для изучения различных физиологических процессов, происходящих на клеточном уровне. Важнейшим процессом, обеспечивающим энергетические потребности клетки, является дыхание. В то же время, особенности процесса дыхания в клетках *in vitro* изучены недостаточно. В частности, практически не известно соотношение интенсивности общего и цианидрезистентного (альтернативного) дыхания в разные фазы роста культуры, а также влияние особенностей процесса дыхания клеток на биосинтетические способности клеток (в том числе синтеза вторичных метаболитов). Одной из наиболее интересных культур клеток – продуцентов вторичных метаболитов является *Dioscorea deltoidea* W. Клетки этой культуры синтезируют фураностаноловые гликозиды, содержание которых в высушенной биомассе достигает 10%. В качестве объекта исследования использовали мутантный штамм ДМ-0,5, полученный в Отделе биологии и биотехнологии ИФР РАН. Культивирование проводили в колбах на качалке по стандартной методике на жидкой среде Мурасиге-Скуга, с добавлением витаминов по Стаба, 2,4-D и кинетина. Для характеристики роста и физиологического состояния культуры использовали сырую и сухую массу клеток, их концентрацию в суспензии и жизнеспособность. В процессе выращивания проводили количественное определение фураностаноловых гликозидов спектрофотометрическим методом. Общую скорость дыхания и вклад различных его путей в общее поглощение кислорода на разных стадиях культивирования проводили на полярографической установке, используя ингибиторный анализ. В результате проведенных экспериментов были получены характерные S-образные кривые роста по всем исследуемым параметрам. Максимальная удельная скорость роста в экспоненциальной фазе достигала 0,393 к концу цикла накопление биомассы по сухому весу достигало 9,31, показатели жизнеспособности культуры колебались от 87% в начале цикла до 65% в конце цикла. Содержание фураностаноловых гликозидов к концу цикла составляло 6-8% к сухой массе клеток. Максимальная интенсивность дыхания наблюдалась на стадии экспоненциального роста ($856,9 \pm 81,6$ мгО₂/ч*гсыр.массы). На стадии замедления роста и отмирания клеток наблюдалось снижение общей интенсивности дыхания ($697,9 \pm 66,5$ мгО₂/ч*гсыр.массы) на фоне увеличения вклада остаточного дыхания в общее поглощение кислорода, что коррелирует с общим снижением всех ростовых и биосинтетических характеристик (жизнеспособность, сырой и сухой вес).

Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Носову А.М., доценту, к.б.н. Полесской О.Г. и н.с. Титовой М.В. за помощь в подготовке тезисов

Роль оксида азота в передаче сигнала ауксина.**Вершинкин Данила Александрович**

научный сотрудник

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

gar@ippras.ru

Одной из актуальных проблем физиологии растений является выяснение механизмов трансдукции гормональных сигналов. В последние годы установлено участие свободных радикалов, таких как разные формы оксида азота ($\text{NO}\cdot$ и NO^+) в передаче сигналов у эукариот и прокариот. В частности, было показано [1,2], что оксид азота (NO) способен имитировать эффекты ауксина на деление и растяжение клеток, ризогенез. Однако оставалось неясным, участвует ли оксид азота в трансдукции ауксинового сигнала или действует вне этого процесса. Нами было показано, что ауксин вызывал быстрое образование оксида азота в 3-4 дневных проростках арабидопсиса, что позволило предположить прямое влияние ауксина на NO -генерирующие ферменты. Было изучено влияние разных форм оксида азота на экспрессию *in planta* ауксин-зависимой генетической конструкции $\text{Dr5}::\text{GUS}$, которая была создана на основе промотора гена первичного ответа на ауксин. Дополнительным объектом исследования являлась NO -зависимая генетическая конструкция $\text{Atfer1}::\text{GUS}$, которая была создана на основе промотора гена первичного ответа на оксид азота Atfer1 . Опыты проводили на 3-4-дневных проростках трансгенного арабидопсиса, при короткой (4 ч) экспозиции. Индукторы и ингибиторы вносили в раствор, в котором инкубировали проростки. Влияние на экспрессию данных генетических конструкций определяли количественно по активности GUS *in vitro* флуорометрическим методом. Показано, что NO -доноры нитрозоний катион (NO^+) и радикальной формы оксида азота ($\text{NO}\cdot$) нитропруссид натрия (SNP), нитрозоцистеин, нитрозоглутатион, динитрозильное производное DTT ($\text{DTT}(\text{NO})_2$) и NOR-3 усиливали экспрессию ауксин-зависимой генетической конструкции $\text{Dr5}::\text{GUS}$ в зависимости от соединения 1,3-4 раза. Для повышения проницаемости использовали Triton X100 в концентрации 0,1%, что привело к усилению эффекта нитрозотиолов, в особенности короткоживущего донора оксида азота $\text{DTT}(\text{NO})_2$, активность которого возросла в 3,6-4 раза. Донор нитроксил аниона (NO^-) моонитрозильное производное DTT (DTT-NO) ингибировал эффект ауксина на 65%, этот эффект снимался SNP . Конкурентный ингибитор NO -синтазы L-NNA и скевенджеры (поглотители) оксида азота: cPTIO и гидроксикобаламин, - подавляли эффект ауксина на экспрессию $\text{Dr5}::\text{GUS}$ на 83% и 56%, соответственно. Эти эффекты ингибирования в разной степени снимались с помощью SNP . Ауксин в свою очередь усиливал экспрессию NO -зависимого промотора Atfer1 в 2,7-6 раз. Ингибитор NO -синтазы L-NNA подавлял этот эффект ауксина. На основе полученных данных можно предполагать участие отдельных форм NO во внутриклеточной трансдукции ауксинового сигнала.

Литература:

1. Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L. (2004). Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development// *Plant Physiology* 135, 279–286.
2. Correa-Aragunde N., Graziano M. Chevalier C. and Lamanttina L. (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato// *Journal of Experimental Botany* V.53, N.3, 581-588

Факторы прорастания мужского гаметофита

Воронков Александр Сергеевич

аспирант

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

E-mail: voronkov_as@mail.ru

Прорастание и рост мужского гаметофита (пыльцевых зерен и пыльцевых трубок) регулируется транспортом ионов через плазматическую мембрану [3,4]. Интерес исследователей направлен на изучение механизмов, контролирующую трансмембранную транслокацию ионов [2]. Результаты, полученные в ходе исследований в этой области, дали основание полагать, что механизмы трансдукции сигналов в пыльцевом зерне могут базироваться на транзиторных сдвигах параметров ионного гомеостаза, таких, как рН цитозоля. Целью настоящей работы было выяснение вопроса о том, способны ли фитогормоны вызывать нарушение ионного гомеостаза пыльцевых зерен петунии. Мы исходили из того, что гормон-индуцированный сдвиг внутриклеточного рН может быть вовлечен в каскад событий, обуславливающих трансдукцию гормональных сигналов в системе пыльца-пестик. В качестве индикаторов рНс использовали флуоресцеин диацетат и бис-карбоксифлуоресцеин диацетат [1]. Предварительный анализ показал, что пыльцевые зерна содержат фитогормоны, а прорастание сопровождается изменением эндогенного уровня этих соединений и чувствительно к действию экзогенных гормонов (ИУК, АБК, ГК). Пыльцевые зерна, прораставшие в присутствии фитогормонов (ИУК и АБК), претерпевали относительно быстрое защелачивание цитозоля. Гормон-индуцированный сдвиг рНс в щелочную область был полностью подавлен в присутствии ванадата. Можно предположить, что физиологическое действие фитогормонов включает в себя модуляцию рНс, то есть временное нарушение гомеостатической регуляции рН цитозоля пыльцевого зерна. Модуляция рНс может играть роль сигнала, инициируя дальнейшие ответные реакции, запускаемые фитогормонами. Полученные данные позволили заключить, что гормон-индуцированный щелочной сдвиг рНс пыльцевых зерен обусловлен активностью Н⁺-АТФазы плазматической мембраны и что работа этого фермента является важной частью системы регуляции рНс в пыльцевом зерне. Проведенное исследование показало, что внутриклеточный рН пыльцевых зерен чувствителен к действию фитогормонов, причем характер влияния этих соединений на рНс существенным образом зависит как от их природы, так и от физиологического состояния мужского гаметофита. Полученные данные дали основание предполагать, что гормон-индуцированный сдвиг рНс пыльцевых зерен вовлечен в каскад событий, запускающих и контролирующих процессы прогамной фазы оплодотворения с участием фитогормонов.

Литература:

1. Трофимова М.С., Молотковский Ю.Г. рН цитозоля изолированных протопластов и его искусственное изменение // Физиология Растений. 1988. Т. 35. С. 629-640.
2. Feijo J.A., Sainhas J., Holdaway-Clarke T., Cordeiro M.S., Kunkel J.G., Hepler P.K. Cellular oscillations and the regulation of growth: the pollen tube paradigm // Bioessays. 2001. V. 23. P. 86-94.
3. Franklin-Tong V.E. Signalling and the Modulation of Pollen Tube Growth // Plant Cell. 1999. V. 11. P. 727-738. 4. Lord E.M., Russell S.D. The Mechanism of Pollination and Fertilization in Plant // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2002 V. 18. P. 81-105.

Влияние дициклогексилкарбодиимида на электрогенную активность**Na⁺-АТФазы плазмалеммы *Dunaliella maritima*****Генатулина А.Р., Попова Л.Г.***Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН**127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35**E-mail: balnokin@mail.ru*

На везикулах плазматической мембраны (ПМ), выделенной из морской микроводоросли *Dunaliella maritima*, в присутствии АТФ и Na⁺ наблюдали генерацию трансмембранного электрического потенциала ($\Delta\psi$), обусловленную функционированием в этой мембране электрогенной Na⁺-транспортирующей АТФазы. Карбоксилмодифицирующий реагент дициклогексилкарбодиимид (ДЦКД) – неспецифический ингибитор различных АТФаз, добавленный к суспензии везикул ПМ *D. maritima* в процессе генерации $\Delta\psi$, приводит к ускорению генерации электрического потенциала (или кажущейся активации фермента). Данный эффект является нетривиальным и требует объяснения. Представляется маловероятным, что ингибитор АТФаз ДЦКД оказывает стимулирующее действие на Na⁺-АТФазу *D. maritima*. В следующем эксперименте была проверена гипотеза о том, что ДЦКД уменьшает ионную проводимость везикулярной мембраны, что, в свою очередь, приводит к кажущейся активации фермента. Mg²⁺-зависимая Na⁺-АТФаза, ответственная за генерацию $\Delta\psi$, после создания потенциала на мембране была «выключена» внесением ЭДТА в реакционную смесь. В результате наблюдался распад созданного электрического потенциала. Последующее добавление ДЦКД существенно тормозило распад $\Delta\psi$, что свидетельствовало об уменьшении ионной проводимости везикулярной мембраны в присутствии ДЦКД. Эксперименты, проведенные на выделенных везикулах ПМ *D. maritima*, предынкубированных в присутствии ДЦКД и в отсутствии ионов Na⁺, показали, что ингибитор подавляет активность Na⁺-АТФазы (KI = 20 мкМ). Вместе с тем, ингибирующего действия ДЦКД на фермент не наблюдалось в случае, если мембранные везикулы были предынкубированы с ДЦКД в присутствии высоких концентраций Na⁺ (20 мМ и больше). Таким образом, ДЦКД способен связываться с исследуемым ферментом и подавлять его активность, тогда как ионы Na⁺ в высоких концентрациях защищают фермент от взаимодействия с ДЦКД. Кажущийся стимулирующий эффект ДЦКД на Na⁺-АТФазу *D. maritima* обусловлен уменьшением ионной проводимости ПМ водоросли в присутствии этого ингибитора.

Сравнение действия различных фенольных соединений на уровень ПОЛ в проростках пшеницы

Городкова Елена Сергеевна

Студент

Московский Городской Педагогический Университет, Москва, Россия

E-mail: Moysa_rochtaa@mail.ru

Растения в процессе своего онтогенеза часто сталкиваются с неблагоприятными воздействиями окружающей среды, которые вызывают накопление в растительных тканях активных форм кислорода (АФК) и запускают различные окислительные процессы. Следствием этого являются структурно-функциональные нарушения, вызывающие окислительные повреждения белков, нуклеиновых кислот, а также перекисное окисление липидов (ПОЛ), что является одним из первых показателей повреждений, связанных с окислительным стрессом. Важным фактором устойчивости к этому является функционирование эффективной многоуровневой антиоксидантной системы, включающей как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные соединения. К числу последних можно отнести различные фенольные соединения (ФС), образование которых свойственно практически каждой растительной клетке.

В связи с этим целью исследования являлось изучение влияния некоторых экзогенных ФС на интенсивность процессов ПОЛ на примере проростков мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) ярового сорта Амир. Проростки пшеницы выращивали в течение 10 суток на растворах кверцетина, рутина или феруловой кислоты (в концентрациях 10-4, 10-5 и 10-6 М) при температуре 22°C и 16-ти часовом фотопериоде. Контролем являлись растения, выращенные на дистиллированной воде. Содержание малонового диальдегида (МДА), как основного продукта ПОЛ, определяли в первых листьях проростков пшеницы до и после промораживания (2 часа при температуре -100С), проводимого с целью инициации ПОЛ. При выращивании проростков пшеницы на растворах, содержащих различные ФС, количество МДА в тканях было выше, чем в контроле при всех использованных нами концентрациях (10-4, 10-5 и 10-6 М). В большей степени эти различия проявлялись на растворах флавонолов (кверцетина и его гликозида рутин), которые повышали содержание МДА в листьях почти в 2 раза по сравнению с контролем. Возможно, обычных условиях выращивания при аутоокислении ФС могут сами являться прооксидантами, стимулируя выработку перекисей и АФК, тем самым, повышая ПОЛ. Промораживание проростков привело к повышению содержания МДА в листьях контрольных растений (в 1.6 раз), в то время как у растений, выращенных в присутствии ФС, количество МДА значительно уменьшалось, особенно в случае кверцетина (10-5 и 10-4 М) и феруловой кислоты (10-6 М). При этом содержание МДА снижалось почти до показаний контроля перед промораживанием. Вероятно, это связано с антиоксидантными свойствами этих соединений. Рутин в меньшей степени подавлял окислительные процессы. При его воздействии интенсивность ПОЛ в листьях после промораживания снижалась всего лишь на 10-18% по сравнению с контролем. Исходя из выше изложенного, можно заключить, что ФС могут выполнять как антиоксидантную, так и прооксидантную роль. В оптимальных условиях экзогенные ФС при аутоокислении становились сами источниками АФК, повышая уровень ПОЛ. При промораживании проростков, приводящем к окислительному взрыву в клетках, ФС проявляли четко выраженный антиоксидантный эффект, подавляя образование продуктов ПОЛ. При этом максимальным действием обладал кверцетин в концентрации 10-5 М и феруловая кислота в концентрации 10-6 М.

Регуляция накопления гидроксикоричных кислот и флавоноидов в каллусной культуре эхинацеи пурпурной**Дитченко Татьяна Ивановна***к.б.н., доцент**Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь**E-mail: ditchenko@inbox.ru*

Биологически активные вещества (БАВ) растений рода *Echinacea* Moench., в частности эхинацеи пурпурной, за последние десятилетия широко используются в качестве источников эффективных лекарственных средств преимущественно с иммуностимулирующей и противовоспалительной активностью. К ним относятся полисахариды, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты и их производные, эфирные масла, алкиламиды, жирные кислоты. Фенольные соединения эхинацеи (гидроксикоричные кислоты и флавоноиды) обладают антибактериальным, противогрибковым и антиоксидантным действием, а также усиливают иммуностимулирующую активность водорастворимого полисахаридного комплекса. Большой научный и практический интерес представляет получение биологически активных фенольных соединений с помощью метода культуры клеток и тканей растений. Обладая рядом преимуществ (возможность выделения необходимых веществ независимо от сезона, климата, болезней; регуляция синтеза вторичных метаболитов путем изменения условий культивирования и др.), этот метод может составить альтернативу природному источнику практически ценных веществ. На продукцию БАВ культурами растительных клеток и тканей влияет целый ряд факторов. В первую очередь, это состав питательной среды и содержание отдельных ее компонентов (фитогормонов, макроэлементов, сахарозы и др.). Целью настоящей работы явилось изучение накопления гидроксикоричных кислот и флавоноидов каллусной культурой эхинацеи пурпурной при варьировании содержания фитогормонов, а также уровней азота и фосфора в среде культивирования. Для культивирования каллусов эхинацеи пурпурной в работе использовалась питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга (MS), в которую вносили различные комбинации регуляторов роста: 0,1 – 0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 0,2 – 1,0 мг/л кинетина, а также 2,0 мг/л индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Было протестировано 6 вариантов питательных сред, которые различались соотношением 2,4-Д и кинетина. В экспериментах по изучению влияния содержания азота и фосфора в среде культивирования на выход фенольных соединений было использовано 3 варианта сред: среда MS, характеризующаяся вдвое сниженной концентрацией соединений азота (1/2 N), фосфатов (1/2 P), а также соединений азота и фосфора одновременно (1/2 NP). Культивирование каллусов эхинацеи пурпурной осуществлялось в темноте при постоянной температуре 24,50С. В результате установлено, что наиболее высокие уровни накопления гидроксикоричных кислот и суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин характерны для каллусов эхинацеи пурпурной, культивируемых на среде MS, содержащей 0,1 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина, самые низкие – в присутствии 0,1 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина. Снижение концентрации таких макроэлементов как азот и фосфор в среде культивирования приводило к возрастанию содержания фенольных соединений в каллусной культуре эхинацеи. При этом дефицит фосфора вызывал более значительное увеличение выхода гидроксикоричных кислот и флавоноидов по сравнению с дефицитом азота. При культивировании каллусов эхинацеи пурпурной на среде, характеризующейся уменьшением содержания как азота, так и фосфора, не было отмечено более сильного образования анализируемых фенольных соединений по

сравнению с вариантами сред со сниженной концентрацией одного из указанных макроэлементов.

Анализ андроклинных каллусов пшеницы методом иммунолокализации**Д.Ю. Зайцев**

аспирант

Институт биологии Уфимского НЦ РАН, Уфа, Россия

kruglova@anrb.ru

Андроклиния – феномен образования в условиях культуры *in vitro* способного к репродукции растения-регенеранта из морфогенетически компетентной клетки пыльника – микроспоры. Один из путей морфогенеза *in vitro* микроспоры связан с формированием каллуса, который в данном случае предложено называть андроклинным. Показано, что в культивируемых пыльниках образуются каллусы двух типов: клетки которых способны к дальнейшему морфогенезу *in vitro* и регенерации растений (морфогенные) и клетки которых не обладают такой способностью (неморфогенные). Нами был выявлен также и третий тип каллусов, способный при определенных условиях к дальнейшему развитию *in vitro*, и названный, поэтому, потенциально морфогенным. Нами была выдвинута рабочая гипотеза, что морфогенетическая способность части клеток каллуса к дальнейшему развитию *in vitro* определяется фитогормонами, которые, как известно, являются основными координаторами процессов морфогенеза. В связи с этим цель работы состояла в выявлении зон локализации в каллусе эндогенных фитогормонов - ауксинов и цитокининов. Применяли метод культуры *in vitro* изолированных пыльников пшеницы, общепринятую методику цито-гистологических исследований и метод иммунолокализации фитогормонов. Препараты просматривали и фотографировали на микровизоре проходящего света μ Vizo-101 (ЛОМО ФОТОНИКА, г. Санкт-Петербург). Сопоставление данных цито-гистологического анализа и иммунолокализации фитогормонов показало, что как ауксины, так и цитокинины локализуются в зонах так называемых морфогенетических очагов, состоящих по данным световой микроскопии из клеток, которые можно охарактеризовать как меристематические. По литературным данным ауксины оказывают влияние на деление, растяжение и дифференциацию клеток. Переход клеток к митозу и цитокинезу зависит, как правило, также и от присутствия цитокининов. Присутствие этих гормонов характерно для зон роста с активно делящимися меристематическими клетками. Таким образом, локализация гормонов в клетках меристематических очагов подтверждает статус этих клеток, как обладающих морфогенетическим потенциалом для дальнейшего развития и являющихся инициальными при индукции различных путей морфогенеза *in vitro* в андроклинном каллусе.

Работа поддержана грантом РФФИ-Поволжье (№ 08-04-97045) и грантом программы «Ведущие научные школы РФ» (№ НШ-4834.2006.4).

Возможное участие супероксидного анион-радикала в адаптации предварительно облученных растений к гипертермии

Зинина Светлана Вячеславовна, Федотова Нина Вадимовна, Васильева Екатерина Андреевна

студент, студент, студент

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н.Новгород, Россия

E-mail: kfr@bio.unn.ru

Мембраны фотосинтезирующей клетки отличаются повышенным уровнем генерации различных активных форм кислорода (АФК), которые приводят к смещению прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону повышения интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), что в свою очередь, является пусковым механизмом окислительного стресса. Однако в настоящее время получены сведения о том, что АФК выполняют регуляторные функции в организме и в некоторых случаях выступают в качестве сигнальных молекул.

В современной физиологии растений хлоропласты рассматриваются как сенсоры растительной клетки, т.к. способны первыми продуцировать АФК в ответ на самые различные воздействия. В связи с этим, исследовали состояние прооксидантно-антиоксидантного равновесия в хлоропластах 14-дневных растений гороха (*Pisum sativum* L.), облученных с помощью γ -60Со-источника в дозах 0,1 Гр и 1 Гр, входящих в интервал малых для растительного организма. Часть растений после облучения подвергали гипертермии (42°C в течение 30 минут). Контролем служили необлученные и не подвергнутые гипертермии растения. О состоянии перекисного гомеостаза судили по продукции супероксидного анион-радикала, по накоплению продуктов ПОЛ (ППОЛ) – диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА), а также по активности ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД), аскорбатпероксидазы (АП), глутатионредуктазы (ГР). Показано, что и облучение растений ионизирующей радиацией и последующая гипертермия вызывали усиление генерации супероксидного анион-радикала. Увеличение продукции АФК приводило к смещению прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону интенсификации окислительных процессов. При облучении в дозах 0,1 Гр и 1 Гр уровень ДК незначительно возрастал относительно контроля, а концентрация МДА достоверно не изменялась. При гипертермии после облучения в дозе 1 Гр содержание ППОЛ резко падало в сравнении с растениями предварительно облученными в дозе 0,1 Гр и контролем. Такое предадаптирующее к тепловому шоку действие облучения в большей дозе (1 Гр), вероятно, связано с быстрой активацией антиоксидантных ферментов. Однако СОД, являющаяся ферментом первой линии, имела при гипертермии более низкую активность по сравнению с образцами, предварительно облученными в дозе 0,1 Гр, что приводило к накоплению супероксида. При этом происходила значительная активация ключевых ферментов аскорбат-глутатионового цикла – АП и ГР, чего не происходило при тепловой обработке растений, облученных в дозе 0,1 Гр. Таким образом, облучение в дозе 0,1 Гр вызывало гиперчувствительный ответ на воздействие повышенной температуры. Большая доза (1 Гр) формировала адаптивный ответ хлоропластов к действию гипертермии. Генерация супероксидного анион-радикала самой клеткой в течение длительного времени после облучения, вероятно, может иметь сигнальную функцию для запуска системы восстановления или защиты от возможного действия последующего стрессора.

Изучение наследования трансгенов в растениях рапса (*Brassica napus*)***Кадкина Елизавета Владимировна****Студентка 5 курса**Московский городской педагогический университет**e-mail:kadkinak@yandex.ru*

С каждым годом увеличивается площадь почв с повышенным засолением, одновременно сокращается площадь посева здоровых растений, из-за распространения вирусных заболеваний. Рапс является одним из важнейших масленичных растений. Масло рапса содержит самое низкое количество вредных для здоровья человека насыщенных жирных кислот и широко используется в пищевых и технических целях, кроме того растения рапса обладают относительной солеустойчивостью. В связи с этим необходимо изучать наследование признаков у трансгенных растений рапса в условиях засоления. Эти исследования позволят проследить закрепление и наследование определенного признака у рапса в последующих поколениях. Целью данной работы был анализ трансгенных растений рапса разных конструкций со встроенными генами, а так же выявление закономерностей наследования этих признаков. Для исследования было взято 4 сорта растений рапса со встроенными уже генами. Эти семена были получены при самоопылении трансгенных растений рапса (т.е. это семена поколения T1). Растения рапса были трансформированы методом агробактериальной трансформации, вводимыми генами были: 1) ген пролиндегидрогеназы в антисмысловой ориентации (обеспечивает повышение солеустойчивости), 2) гены транспортного белка и белка оболочки вируса табачной мозаики крестоцветных, 3) ген *prtII* (устойчивость к канамицину). В ходе эксперимента были посажены семена растений рапса разной конструкции (T1). Затем эти растения были расчленены и высажены на среду G1/2. Получено по 40 растений первого поколения с 4-мя различными конструкциями. ДНК выделена примерно из 70 растений. Одновременно начат анализ на наличие встроенных генов методом ПЦР. Проверено 18 растений, из них 3 содержат ген транспортного белка вируса табачной мозаики, 2 - ген устойчивости к канамицину. Предполагается в дальнейшем выделить из оставшихся растений ДНК, и с помощью метода ПЦР и электрофореза проверить образцы растений на наличие в них встроенных генов. Полученные данные позволят проследить, наследуется ли устойчивость к различным факторам в следующих поколениях у трансгенных растений рапса. Работа выполнена в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Влияние УФ облучения меристемных регенерантов картофеля (*Solanum tuberosum*) на процессы ризогенеза и активность пероксидазы

Ковалёва Ольга Александровна

сотрудник

Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка

E-mail: kovalyovy@mail.ru

К настоящему времени известно, что ультрафиолетовая радиация (УФР) вызывает изменения биохимических параметров растительных организмов. В последние годы интенсивно исследуется возможность использования пероксидаз в качестве биоиндикаторов устойчивости растений к абиотическим и антропогенным факторам среды и влияние пероксидаз на процессы ризогенеза через воздействие на ауксиновый, лигниновый и антоциановый метаболизм [2]. Цель данной работы – изучить влияние облучения УФР меристемных регенерантов картофеля на активность пероксидазы и способность к ризогенезу. Исследования выполнены на меристемных регенерантах картофеля сортов Скарб и Одиссей, которые выращивали под источниками света ДНАЗ-400 ($\lambda_{\max}=610$ нм), фотопериод 16/8 часов, в пластиковых контейнерах на синтетических ионообменных субстратах при температуре $20\pm 20^\circ\text{C}$. Источник УФР – лампа ДРТ – 1000 ($\lambda=240-320$ нм). Облучение проводили сразу же после черенкования. Для контроля величины дозы облучения растений использовали УФР – дозиметр ДАУ – 8. Однократная доза облучения УФР меристемных регенерантов картофеля была 120 Дж/м² или $E_1=1,2\cdot 10^5$ эрг/м². Контролем служили идентичные растения, не подвергавшиеся воздействию УФР. Пероксидазную активность и процессы ризогенеза анализировали в контрольных и опытных растениях согласно методике описанной в статье [3]. В ходе проведенного эксперимента установлено, что облучение УФР дозами 120 Дж/м², 240 Дж/м² и 360 Дж/м² способствует резкому увеличению активности пероксидазы в 1 - 3 сутки после облучения, но начиная с 4-5 суток после облучения активность пероксидазы у опытных образцов ниже, чем у контрольных. Облученные растения также характеризовались ускоренным образованием и развитием корней: так, у сорта Одиссей, средняя длина корней (мм) при облучении дозой 120 Дж/м² на 96% превосходит контроль, а при облучении дозой 240 Дж/м² и 360 Дж/м² – на 148 % и 190 % соответственно. Похожая динамика наблюдается и в сорте Скарб. Кроме этого, в ходе эксперимента отмечено, что укоренение контрольных регенерантов в среднем происходит на седьмые сутки после черенкования, а регенеранты облученные УФР укореняются на третьи - четвертые сутки. Таким образом, наибольшая укореняемость меристемных регенерантов наблюдалась на фоне высокой концентрации пероксидазы в листьях картофеля. Инициация придаточных корней на регенерантах растений тесно связана с эндогенным уровнем ауксинов в зоне ризогенеза. В литературе широко обсуждается вопрос о связи процесса ризогенеза, индуцированного природными или синтетическими ауксинами, с активацией ряда ферментных систем. Утверждается, что повышение активности пероксидазы в растительных тканях – типичная ответная реакция на возрастание в них эндогенного уровня ауксинов [1].

Литература:

1. Гуськов А.В., Земская В.А.(1985) Изменения ауксиноксидазной активности в укореняющихся черенках фасоли под действием ИУК и 2,4-Д // Физиология растений. Т.32, вып. 6, с. 1137 – 1144. 2. Гуськов А.В., Протчев А.Г., Загоскина Н.В.(1991) Содержание фенольных соединений и активность пероксидазы в зелёных черенках легко- и трудноукореняемых сортов вишни // Доклады ВАСХНИЛ. № 4, с. 32-36. 3. Янчевская Т.Г., Гриц А.Н, Ковалёва О.А. (2006) Влияние ультрафиолетового облучения суммарного диапазона на активность пероксидазы листьев меристемных регенерантов картофеля (*Solanum tuberosum*) // Вести БГПУ, № 2. Серия 3. с. 38-40.

Дегидрин-подобные белки в рекальцитрантных семенах конского каштана***Ковзиаивили Елена Георгиевна****студентка**Московский городской педагогический университет, Москва, Россия*

Стресс-индуцируемые белки – дегидрины были обнаружены первоначально при исследовании созревания устойчивых к высушиванию ортодоксальных семян среди специфической гетерогенной группы белков, названных LEA-белками (Late Embryogenesis Abundant), т.е., преобладающими белками позднего эмбриогенеза. Эти белки накапливаются в семядолях и осевых органах созревающих семян на стадии дегидратации. Позже было показано, что дегидрины появляются также и в вегетативных органах растений в ответ на засуху, солевой стресс, холодную акклиматизацию, а также воздействие АБК. Все дегидрины, или LEA-белки, являются чрезвычайно гидрофильными, богатыми глицином и термостабильными белками (они не коагулируют даже при 100°C). В созревающих ортодоксальных семенах эти белки могут составлять до 30% от незапасных клеточных белков и быстро исчезают при прорастании. По современным представлениям, термостабильные белки - дегидрины играют важную роль в стабилизации клеточных структур при высушивании, участвуют в выработке устойчивости к осмотическому стрессу. На основании этого было выдвинуто предположение, что чувствительность к высушиванию у рекальцитрантных семян может быть результатом отсутствия у них дегидринов. Однако позже было показано, что дегидрин-подобные белки присутствуют во фракции термостабильных белков в рекальцитрантных семенах. Семена конского каштана (*Aesculus hippocastanum* L.) не переносят высушивания, то есть относятся к рекальцитрантному типу. С другой стороны, эти семена после опадения с деревьев входят в состояние глубокого физиологического покоя, которое снимается после длительной холодной стратификации, то есть семена конского каштана устойчивы к холодному стрессу. Исследование белкового комплекса семян конского каштана [1] показало наличие значительного количества термостабильных белков, которые составляют более 30% растворимых белков цитозоля в осевых органах и подавляющую массу (около 80%) белков семядолей. Представляло интерес выявить дегидрины среди термостабильных белков конского каштана. Для этой цели были использованы методы одномерного электрофореза в градиенте ПААГ и Вестерн-блот-анализ. Полученные результаты показали, что во фракции термостабильных белков семян конского каштана присутствуют дегидрин-подобные белки, которые выявлялись в виде одной яркой полосы в зоне молекулярных масс около 50 кД. Низкомолекулярные термостабильные белки, которыми обогащена исследуемая фракция, не давали реакции на дегидрины. Дегидрин-подобные белки обнаружены во всех частях зародыша: в осевых органах, семядолях, черешках семядольных листьев. По-видимому, тканевая специфичность в локализации этих белков отсутствует. Дегидрины выявлялись в тканях семян каштана на протяжении всего периода стратификации, после начала роста зародышевого корешка уменьшалась как фракция термостабильных белков, так и относительное содержание в ней дегидринов. Полученные данные говорят о том, что дегидрины составляют незначительную часть фракции термостабильных белков. Функции остальных термостабильных белков, которые накапливаются в больших количествах в рекальцитрантных семенах конского каштана, остаются неясными и нуждаются в дальнейшем исследовании.

Литература:

1. Гумилевская Н.А., Азаркович М.И., Комарова М.Е., Обручева Н.В. Белки осевых органов покоящихся и прорастающих семян конского каштана: 1. Общая характеристика белков // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 5—17.

Биохимические показатели районированных сортов риса Приморского края
Куприн Александр Витальевич
 студент V курса
 Уссурийский государственный педагогический институт, биолого-химический
 факультет, Уссурийск, Россия
 E-mail: Kyprins@mail.ru

Рис является одной из основных зерновых культур для большей части населения земного шара. В семенах риса много крахмала от 60 до 70% и относительно небольшое количество белка от 5 до 11%. Следовательно, одним из основных показателей пищевого качества риса является количественное соотношение в нем белка и крахмала. Использование продуктов переработки риса для пищевых целей требует, прежде всего, знание биохимических показателей пищевой ценности риса. В связи с этим мы предприняли попытку определить количественное содержание белка, крахмала и его составных частей – амилозы и амилопектина и оценить активность амилазы в семенах и в проростках семян риса и экспериментально показать питательную ценность районированных в Приморском научно-исследовательском институте сельского хозяйства РАСХН сортов риса [1]. В качестве исходного материала использовали пять районированных сортов риса. Работу вели с семенами и проростками. В муке зерна и гомогенатах проростков определяли содержание крахмала, амилозы, амилопектина и активность амилазы. Амилозу определяли по методу Джулиано [2] с некоторыми модификациями. Количественное содержание амилазы определяли фотоколориметрическим методом на спектрофотометре UNICO 1200/1201. Количественное содержание белка определяли биуретовым методом. Экспериментальные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Биохимические показатели районированных сортов риса

Сорт	Белок, %	Крахмал, %	Амилоза, %	Амилаза, мг/мг белка/час		
				Сухие семена	Проростки	
					10 суток	14 суток
Приозерный-61	7,50±0,15	63,00±0,25	22,00±0,19	10,86±0,23	13,07±0,25	9,07±0,14
Ханкайский-52	8,00±0,11	66,00±0,17	18,78±0,17	3,00±0,08	4,53±0,28	3,01±0,25
Ханкайский-429	8,20±0,08	65,00±0,12	22,15±0,23	7,38±0,25	9,66±0,12	6,52±0,15
Луговой	9,00±0,05	67,00±0,09	16,12±0,14	7,72±0,15	8,94±0,19	5,86±0,17
Дарий-23	8,50±0,12	64,00±0,07	18,12±0,15	4,00±0,27	6,65±0,29	4,75±0,15

Из таблицы следует, что в рассматриваемых районированных сортах риса прослеживается обратная зависимость между количеством белка и крахмала. Значения амилазной активности в исследуемых сортах варьирует в широких пределах. И максимальная активность фермента выявлена у сорта Приозерный-61, однако количественное содержание крахмала не коррелирует с активностью фермента. Исходя из соотношения основных биохимических показателей по питательной ценности, рассматриваемые сорта можно расположить в следующем порядке: Луговой, Ханкайский-52, Ханкайский-429, Дарий-23, Приозерный-61.

Литература:

1. Каталог сортов полевых, овощных и плодово-ягодных культур, возделываемых в Приморском крае. – М., 2005. – 105 с.
2. Методы биохимического исследования растений/Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др.: Под ред. Ермакова А. И. – Л., 1987. – 430 с.

Динамика накопления сахаров и активность инвертазы в осевых органах прорастающих семян конского каштана¹**Литягина С.В.***научный сотрудник**Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия**E-mail: lityagina@mail.ru*

Изучена динамика сахарозы и моносахаров в связи с активностью инвертазы в осевых органах семян конского каштана *Aesculus hippocastanum* при выходе из покоя и прорастании семян. Семена конского каштана относятся к рекальцитрантному типу, т.е. в осевых органах поддерживается высокий уровень оводненности (63-65 %), при потере которого семена гибнут. После 4, 9 и 16 недель хранения семян на холоду, их помещали в оптимальные для прорастания условия и брали пробы осевых органов в период набухания до проклевывания семян. В осевых органах измеряли сырой и сухой вес, содержание сахарозы, глюкозы и фруктозы и активность инвертаз (вакуолярной инвертазы и инвертазы клеточной стенки). Углеводы определяли, используя метод капиллярной газовой хроматографии. Доминирующим углеводом является сахароза, ее содержание значительно увеличивается, начиная с первой половины набухания. Это возрастание происходит главным образом за счет ее притока из семядолей, что указывает на раннее начало донорно-акцепторных отношений в прорастающих семенах конского каштана. Пик активности и вакуолярной инвертазы, и инвертазы клеточной стенки приходится на середину периода набухания, что приводит к накоплению в 8-10 раз глюкозы и фруктозы перед проклевыванием. Накопление моносахаров приводит к увеличению осмотического давления, по сравнению с осмотическим давлением, развиваемым сахарозой, что является обязательным условием для инициации роста клеток растяжением при прорастании. Таким образом, запуск донорно-акцепторных отношений при прорастании может быть специфической особенностью рекальцитрантных семян, и связан с высокой оводненностью проводящей системы, сохраняющейся и поддерживаемой от опадения семян до их прорастания.

Литература:

1. Обручева Н.В., Литягина С.В., Рихтер А. (2006) Динамика углеводов в осевых органах семян конского каштана при переходе от покоя к прорастанию // Физиология растений, 53, № 6, с. 869-879. 2. Obroucheva N.V., Lityagina S.V. (2007) Dormancy release and germination in recalcitrant horse chestnut seeds // Dendrobiology, v.57, p. 27-34.

¹ Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-00416

Функциональное значение фитолектинов на примере агглютинина зародыша пшеницы

Лубянова Алсу Ринатовна¹, Абдракипова Лейсан Фирхатовна²

научный сотрудник, к.б.н.¹, студент²

Институт биохимии и генетики УНЦ РАН¹, Башкирский Государственный Университет², Уфа, Россия

lectin@anrb.ru

Агглютинин зародыша пшеницы (АЗП) является хорошо изученным лектином, характерным для зародышей семян и вегетирующих растений пшеницы [1]. По своим свойствам этот белок очень сходен с лектинами других злаковых культур [1], поэтому АЗП считается их типичным представителем. Экзогенная обработка АЗП растений пшеницы стимулирует их рост; в основе такого эффекта АЗП лежат индуцированные лектином перестройки в гормональной системе растения [3]. Такое воздействие АЗП на растения пшеницы может отражать функциональное значение фитолектинов, а может быть лишь частным случаем. Цель нашей работы - выявить эффект обработки АЗП на другие злаковые растения на примере важной сельскохозяйственной культуры – ячменя. Семена ячменя *Hordeum vulgare* L. (сорт Прерия) проращивали в течение 3 сут на фильтровальной бумаге в кюветах на водопроводной воде. 3-суточные проростки изолировали от эндосперма и выдерживали в течение 24 ч в стаканах на смеси 2%-ной сахарозы и АЗП в концентрации 1 мг/л. Контрольные растения выращивали на 2%-ной сахарозе. О росте корней 4-суточных проростков судили по митотическому индексу (МИ) меристематической ткани корней - проценту клеток на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы к общему числу подсчитанных клеток [4]. Содержание свободных форм цитокининов (ЦК) и индолилуксусной кислоты (ИУК) в корнях 4-суточных проростков определяли методом иммуноанализа [2]. Экзогенная обработка растений ячменя АЗП стимулировала деление клеток корня. МИ апикальных клеток корней под воздействием АЗП увеличился почти в два раза и составил 5.4%, тогда как МИ меристематических клеток корней контрольных растений был на уровне 3%. Рост растений находится под контролем гормональной системы. Мы показали, что в ходе обработки лектином в корнях ячменя транзитно накапливались ЦК и ИУК - фитогормоны, которые при совместном использовании в физиологических концентрациях стимулируют деление меристематических клеток растений. Максимум накопления ИУК и ЦК в корнях АЗП-обработанных растений ячменя приходился на 4 ч воздействия лектина и составляет 70% (для ИУК) и 40% (для ЦК) от контрольного уровня. Такое повышение содержания ИУК и ЦК в корнях обработанных АЗП проростков ячменя указывает на важный механизм стимуляции роста клеток корней лектинами, опосредованный изменением содержания эндогенных фитогормонов. Полученные результаты подтверждают участие лектинов в реализации программы роста растений.

Литература: 1. Peumans W.J. (1984) Biochemistry, cell-biology, physiology, biosynthesis and function of gramineae lectins. Proefschrift...Leuven: Katholike u., Lab. voor Pflatenbiochemie. 2. Shakirova F.M., Sakhabutdinova A.R., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A., Fatkhutdinova D.R. (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity // Plant Sci. V.164(N.3), p. 317-322. 3. Безрукова М.В., Кильдибекова А.Р., Авальбаев А.М., Шакирова Ф.М. (2004) Участие агглютинина зародыша пшеницы в регуляции деления клеток апикальной меристемы корней проростков // Цитология. Т. 46, с. 35-38. 4. Паушева З. П. (1988) Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 207.

Получение культур клеток трех видов тисса - источника противоопухолевого дитерпеноида (таксанов).

Макарова Светлана Сергеевна^{1,2}

Студентка

Глоба Елена Борисовна², Демидова Елена Викторовна

¹*Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова*

Биологический факультет, Москва, Россия

²*Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва, Россия*

E-mail: svetodiodovna@mail.ru

Культура клеток высших растений представляет собой экспериментально созданную популяцию соматических клеток. Помимо использования в фундаментальных исследованиях, культура клеток высших растений является универсальным инструментом для решения многих прикладных задач. В частности, растительные клетки *in vitro* могут служить источником ценных веществ растительного происхождения. Растения семейства *Taxaceae* (тиссовые) в последнее время представляют значительный интерес в качестве источника дитерпеноидов таксанового ряда, находящихся в коре и листьях растения, и используемых в лечении различных форм рака. Недостатком получения таксоидов из растительного материала является их низкое содержание в тканях растений и медленный рост представителей рода *Taxus*. Таким образом, получение культуры клеток тисса имеет важное практическое значение. Поставленная задача сопряжена с рядом трудностей. В первую очередь, это низкая скорость роста культур клеток хвойных растений, и, во-вторых, образование больших количеств фенольных соединений, ингибирующих рост клеток *in vitro*. Целью данной работы являлось получение культуры клеток трех видов тисса: *Taxus cuspidata*, *T.baccata*, *T.media* и подбор условий для поддержания и оптимизации роста полученных культур клеток. В качестве эксплантов использовали листья, стеблевые сегменты (небольшие участки стебля с 1-3 листьями) и семена. Для получения культур клеток использовали среды Гамборга, Мурашиге и Скуга, Уайта, с добавлением витаминов, гидролизата казеина, мио-инозита в разных концентрациях. В качестве фитогормонов использовали 2,4-Д (2 и 4 мг/л), кинетин (0,5 и 1 мг/л) и гиббереллиновую кислоту (0,15 и 0,3 мг/л). Для снижения токсичного действия фенольных соединений в среды добавляли антиоксиданты - аскорбиновую кислоту (10 мг/л) и поливинилпирролидон (ПВП, 1г/л). Для получения культур использовали экспланты находящиеся в различном физиологическом состоянии – покоя (зимние) и активного роста (летние). В культурах, введенных из «зимних» эксплантов, содержание фенолов было ниже, чем у культур, получаемых летом. В связи с этим, каллусогенез на «зимних» эксплантах оказался эффективнее. Кроме того, используемые в работе виды также различались между собой по интенсивности синтеза фенольных соединений. Лучше росли культуры клеток тех видов, содержание в которых этих соединений было минимально, а именно *T.media*. Наибольшее количество фенолов обнаружено в клетках *in vitro* *T.baccata*, каллусы которого характеризовались невысоким индексом роста. В результате проведенной работы получено несколько линий каллусных и суспензионных культур клеток, с индексом роста не менее 2, что является достаточно высоким значением для культур клеток тиса. Было установлено, что для клеток каждого из исследуемых видов тиса оптимальным является определенный минеральный состав среды выращивания, а содержание гормонов (однократное или двукратное) не влияет на рост культуры. С помощью метода хроматомасс-спектрометрии в одной из полученных линий было показано присутствие таксанов.

Исследование процессов роста и накопления алкалоидов в двух штаммах суспензионной культуры *Stephania glabra* (Roxb) Miers при выращивании в колбах и биореакторах

Осипьянц Андрей Игоревич

студент

Титова Мария Владимировна

научный сотрудник

Решетняк Оксана Владимировна

старший научный сотрудник

Носов Александр Михайлович

профессор

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева (ИФР) РАН, Москва, Россия

E-mail: osssip@gmail.com

Отсутствие в нашей стране естественного растительного сырья для производства лекарственных препаратов влечет за собой необходимость получения и выращивания культур клеток высших растений – продуцентов ценных вторичных метаболитов. Одним из широко применяемых в неврологии препаратов является стефаглабрина сульфат – соль изохинолинового алкалоида стефарина, источником которого служит субтропическое растение стефания гладкая (*Stephania glabra* (Roxb) Miers). Стефания гладкая была введена в клеточную суспензионную культуру еще в 80-е годы прошлого столетия; однако разнообразие полученных штаммов данной культуры, обладающих различными ростовыми характеристиками и уровнем синтеза стефарина, требует их тщательного изучения с целью понимания влияния факторов роста на биосинтез вторичных метаболитов, повышения уровня их синтеза, а также масштабирования процесса культивирования. Целью представленной работы является сравнительная характеристика двух штаммов культур стефании гладкой (261 и 113) на двух вариантах сред (с нормальным и сниженным в 20 раз содержанием 2,4-D) при выращивании в колбах и лабораторном биореакторе по параметрам роста и уровню накопления стефарина. Химический анализ сухой биомассы обоих штаммов проводили экспресс-методом с использованием ТСХ и денситометрического обсчета данных. В результате проведенного культивирования в колбах было определено, что наилучшие результаты по накоплению биомассы и алкалоида стефарина наблюдались при использовании стандартной среды для 113 штамма и среды с пониженным содержанием 2,4-D для 261 штамма. Для 113 и 261 штаммов такой показатель, как удельная скорость роста, составил, соответственно, 0,21 и 0,15 сут.⁻¹, индекс роста – 12,68 и 5,88, время удвоения 3,32 и 4,74 сут. и экономический коэффициент – 0,38 и 0,25. Уровень накопления стефарина в 261 штамме достигал 1 мг/г сухой массы суспензии, что превышает показатель для 113 штамма. На основе представленных данных был сделан вывод о перспективности масштабирования процесса выращивания 261 штамма на среде с пониженным содержанием 2,4-D, поэтому было проведено культивирование 261 штамма в 20л биореакторе. Рост культуры в биореакторе характеризовался незначительным снижением жизнеспособности и уровня накопления биомассы, однако уровень синтеза стефарина достигал 1,78 мг/г сухой массы.

Функциональная идентификация НАДФН-оксидазы плазмалеммы растительных клеток**Пиотровский Михаил Сергеевич***студент**Российский университет Дружбы народов, Москва, Россия**E-mail: agro-ministr@yandex.ru*

Одной из ранних ответных реакций растений на изменение условий является генерация активных форм кислорода (АФК), в том числе перекиси водорода, которая рассматривается как посредник в трансдукции сигналов [1]. Одним из ферментов, способным генерировать супероксид, является белок плазмалеммы НАДФН-оксидаза. Согласно молекулярно-биологическим исследованиям, гены НАДФН-оксидаз растений имеют гомологию с каталитической субъединицей gp91phox фагоцитов, содержат два EF-мотива в N-терминальной области и по этим признакам отнесены к семейству NOX5 [2]. В растениях с участием белков этого семейства связывают реализацию фитоиммунитета, апоптоза, роста и адаптации. В апопласте растительной клетки АФК способны продуцировать, по крайней мере, еще пероксидазы и аминоксидазы. Поэтому выявление индивидуальной роли НАДФН-оксидазы в указанных процессах представляет существенную методическую проблему. Поэтому целью исследования стала иммуноидентификация НАДФН-оксидазы и уровня ее активности в клетках корней и побегов проростков кукурузы. Плазмалемму получали разделением микросомальных мембран в двухфазной полимерной системе. Супероксид-продуцирующую активность плазмалеммы в присутствии НАДФН оценивали спектрофотометрически по восстановлению ХТТ. Белки плазмалеммы, способные генерировать супероксид, идентифицировали по определению молекулярной массы полос после нативного электрофореза, которые окрашивались формазаном, как продуктом восстановления NBT в НАДФН-оксидазной реакции. Присутствие НАДФН-оксидазы в плазмалемме подтверждали методом вестерн-блот анализа с использованием антител к каталитической субъединице gp91phox фагоцитов. Согласно результатам кинетики восстановления ХТТ НАДФН-оксидазной активностью обладали как плазмалемма клеток корней, так и побегов. При этом активность в обоих вариантах снижалась в среднем на 60% под влиянием дифенилфенелен иодониума (ДФИ) – ингибитора флавин-содержащих оксидаз. Белки в плазмалемме клеток побегов, способные продуцировать супероксид в присутствии НАДФН, имели молекулярные массы 50, 70 и 105 кД; а в плазмалемме корней – 50 и 70 кД. Только белки с массой 50 и 105 кД были чувствительны к ДФИ и выявлялись с антителами к gp91phox. Значение 105 кД, полученное нами, соответствует массам известных НАДФН-оксидаз плазмалеммы растительных клеток. Полоса 50 кД, скорее всего, является продуктом протеолиза этого белка. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности использования наших подходов для последующего выяснения механизмов участия белков этого типа в ответе растения на биотические и абиотические воздействия.

Литература: 1. Torres M.A., Dangl J.L.(2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interaction, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 397. 2. Kawahara T., Quinn M.T., Lambeth J.D. (2007) Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evol. Biol.* 7: 109.

Некоторые особенности изолированных культур *Ajuga genevensis* L. и *Ajuga chia* Schreb. и перспективы получения из них биологически активных веществ

Саакян Наира Жораевна¹

сотрудник

Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

E-mail: physiol@ysu.am

На питательной среде Мурасиге–Скуга получены изолированные культуры некоторых принадлежащих к роду *Ajuga* мало изученных видов растений, растущих в Армении и находящихся широкое применение в народной медицине как противовоспалительные, противомаларийные, гемостатические, ранозаживляющие, противохорадоочные средства и содержащих такие биологически активные вещества, как иридоиды, флавоноиды, терпеноиды, стероиды, дубильные вещества, эфирные масла [1, 2]. Культуры проявляли высокую антибактериальную активность в отношении различных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов - если диаметры зон отсутствия роста тест-микроорганизма вокруг лунок с экстрактом интактного растения составляли около 1,5 см, то вокруг колодцев с экстрактом каллусной ткани они превышали 3 см. Результаты тестирования интактных растений *A. chia* и *A. genevensis* и полученных из них каллусных культур на наличие цитотоксичности показали, что они не обладали подавляющим действием на клетки моноцитарной лейкемии человека (линия L-41). Возможное содержание экдистероидов в каллусной культуре *A. genevensis* было выявлено определением состава свободных аминокислот (на аминокислотном анализаторе (ААА Т-339 М), т.к. ацетил-КоА, служащий предшественником синтеза экдистероидов и стероидов, через пировиноградную кислоту синтезируется из аланина, серина, цистина и цистеина [3]. Общее содержание свободных аминокислот и в каллусной культуре и в интактном растении было довольно высоким. При этом их количество в 2 – 3 раза было выше в каллусной культуре по сравнению с интактным растением.

Литература: 1. Золотницкая С. Я. - Лекарственные ресурсы флоры Армении, том II, Ереван, 1965. 2. Dinan L., Whiting P., Bourne P., Coll J. // *Insect Biochem Mol Biol.* 2001 Oct; 31 (11): 1077-82. 3. Алиева М.И., Бездудная О.А., Володина С.О., Филиппова В.Н., Потапова Г.П., Володин В.В. Сравнительный аминокислотный состав растений-продуцентов экдистероидов // *Химия растительного сырья.* 2002., N1., С. 63-68.

Автор выражает признательность к.б.н. Петросян М.Т. за помощь в подготовке тезиса.

Факторы и характер аккумуляции металлов-поллютантов лекарственными растениями.**Сибгатуллина Мадина Шавкатовна²**

аспирант

*Институт экологии природных систем Академии наук Татарстана, Казань, Россия**E-mail: sibmad@list.ru*

В связи с нарастанием техногенной нагрузки на окружающую среду возрастает загруженность лекарственных растений поллютантами. Загруженность растительных ресурсов, в том числе лекарственных растений, является и биологической и экологической проблемой. В работе исследовалась аккумуляция Cu, Fe, Zn, Pb, Cd лекарственными растениями 33 видов 19 семейств. Лекарственные растения были отобраны с шести пробных площадок площадью 10 м² в луговых и лесных фитоценозах пригородной зоны г. Казани. Собранные растения расчленили на отдельные органы, высушивали до воздушно-сухого состояния, разлагали методом сухого озоления. Содержание металлов анализировалось методом атомно-абсорбционной спектроскопии на приборе ААС-30. Определение подвижных форм металлов в почвенных образцах осуществляли в ацетатно-аммонийной вытяжке с рН 4,8. Характер распределения элементов в органах растений оценивали по индексу ОСОР, представляющего собой величину относительного содержания элементов в органах растения. Особенности аккумуляции тяжелых металлов растениями сопряжены с содержанием доступных форм элементов в почве, что в свою очередь в значительной степени зависит от типа биотопа. Почвы луговых биотопов характеризуются пониженным по сравнению с почвами лесных биотопов содержанием доступного железа, но повышенным содержанием цинка, а также свинца и кадмия. Почвы с опушки леса по содержанию доступных форм металлов занимают промежуточное положение. Подавляющее большинство видов аккумулирует медь в генеративных органах, цинк и свинец аккумулируются в генеративных органах у половины исследованных видов. Аккумуляция железа носит акропетальный характер практически у всех видов. Обнаружено превышение ПДК кадмия в растениях вьюнка полевого и земляники лесной в 4,41 и 4,09 раза соответственно. Наиболее перегруженными свинцом видами оказались вьюнок полевой (33,17 мг/кг), зверобой продырявленный (12,65 мг/кг), лапчатка серебристая (12,61 мг/кг) и нивяник обыкновенный (12,02 мг/кг), превышение ПДК свинца в которых составило в 2 – 5,52 раза. Превышение ПДК свинца и кадмия в лесных растениях не обнаружено. В растениях ландыша майского, произраставшего на опушке леса, обнаружено превышение ПДК кадмия в 1,96 раз. В результате проведенного исследования выявлена барьерная функция древесного яруса лесных фитоценозов, в результате которой лесные виды оказались менее загруженными поллютантами. Показано, что корневой барьер при поступлении химических элементов в растения интенсивнее проявляется в растениях луговых видов.

² Автор выражает признательность научному руководителю – профессору, д.б.н. Зялалову А.А. за помощь в подготовке тезисов.

Влияние гена *ntsm10* на органогенез в культуре тканей табака¹

Страхова Маргарита Владимировна, Дудникова Ирина Александровна

студентки

*Московский городской педагогический университет, ф-т химико-биологический,
г.Москва, Россия*

e-mail: Odivanchikova-Rita@rambler.ru

Перспективным подходом к исследованию ранних этапов дифференцировки является выявление генов, специфически транскрибируемых при индукции морфогенеза, и изучение их влияния на регенерацию растений. В Венском университете была выделена последовательность ДНК, специфически транскрибируемая в микроспорах растений табака, индуцированных к соматическому эмбриогенезу холодным стрессом. Первичный анализ функции исследуемого гена с помощью инактивации антисмысловой конструкцией (RNAi) показал необходимость *ntsm10* для образования и развития эмбриоидов из микроспор. Целью данной работы было изучение влияния гена *ntsm10* на индукцию органогенеза у тканей табака. Объектами работы было 6 трансгенных гомозиготных линий табака (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1), в том числе две с инактивированным геном *ntsm10* и две – с восстановленной активностью гена. В качестве контроля использовали интактные нетрансформированные растения того же сорта табака. Для оценки морфогенетического потенциала листовые диски или каллусы одинакового размера культивировали в стандартных условиях на среде Мурасиге-Скуга, содержащей 20 г/л сахарозы, а также ауксины и цитокинины в разных концентрациях. Учитывая большую роль фитогормонов в индукции морфогенеза, важно было оценить, не связана ли функция *ntsm10* с восприятием или передачей гормонального сигнала. После месячного культивирования определяли долю эксплантов с побегами или с корнями и подсчитывали среднее число побегов на эксплант. На каждом варианте среды культивировали не менее 20 эксплантов одной линии. Если ген *ntsm10* участвует в регуляции роста растений или морфогенеза, то его инактивация должна была вызывать отличия от интактных растений, а восстановление активности – возвращение к норме. Исходя из этого предположения оценивали результаты экспериментов. Листовые диски всех линий на всех 10 использованных средах образовывали каллус, побеги и корни. Частота каллусообразования составила 100% для всех линий и всех вариантов сред. Интенсивность побегообразования и корнеобразования зависела от соотношения ауксина и цитокинина. На большинстве сред доля листовых дисков, образовавших побеги, составила 90-100%. Частота корнеобразования в зависимости от соотношения гормонов варьировала от 0-100%. Уменьшение частоты ризогенеза у вариантов с инактивированным *ntsm10* и восстановление до уровня контроля у линий с восстановленной активностью гена наблюдали у листовых дисков культивируемых на среде 0,5 НУК и 1 БАП. Каллусные ткани полученные из листовых эксплантов характеризовались на этой среде довольно активным побегообразованием при полном отсутствии ризогенеза. Инактивация гена *ntsm10* вызывала увеличение доли каллусов с побегами до 100% и увеличение количества побегов на каллус в 3-4 раза по сравнению с контролем и вариантами с восстановленной активностью исследуемого гена. В стрессовых условиях, вызванных трехдневной инкубацией тканей при 6°C или добавлением в среду 0,6 М маннита, влияние гена *ntsm10* на органогенез проявлялось сильнее. Таким образом, на среде с 0,5 мг/л НУК и 1,0 мг/л БАП инактивация исследуемого гена приводила к уменьшению частоты ризогенеза и усилению побегообразования. Выявленные в ходе работы различия между морфогенетическими реакциями растений с разной степенью экспрессии *ntsm10*

дают основание предполагать, что этот ген играет роль не только в регуляции эмбриогенеза, но и в других видах дифференциации клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 06-04-90604 БНТС_а.

Получение и исследование физиологических характеристик культур клеток *Polyscias filicifolia* и *Polyscias fruticosa*

Суханова Елена Сергеевна

научный сотрудник

Осипьянц Андрей Игоревич

студент

Титова Мария Владимировна

научный сотрудник

Носов Александр Михайлович

профессор

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева (ИФР) РАН, Москва, Россия

E-mail: ossip@gmail.com

Культура клеток высших растений – это экспериментально созданная популяция соматических клеток, которая является экспериментальной биологической системой, нуждающейся в тщательном изучении. Помимо теоретического интереса к исследованию поведения растительных клеток вне организма, культура клеток имеет прямое практическое значение, что обуславливает необходимость введения в культуру ценных для медицины, ветеринарии, парфюмерии и пищевой промышленности видов высших растений. Одними из наиболее интересных объектов являются растения семейства Аралиевых – к ним относятся разные виды женьшеня, аралии, элеутерококк. В последнее время активно изучаются растения рода *Polyscias* (полисциас), экстракты которых обладают лекарственными свойствами: тонизирующим и стимулирующим действием, адаптогенной активностью, антибактериальным и, как следствие, противовоспалительным действием. Биологическое действие растений рода *Polyscias* объясняют присутствием в них различных тритерпеновых гликозидов. В настоящее время получена культура клеток *Polyscias filicifolia* и изучен химический состав ее экстрактов. На основе экстрактов данной культуры созданы биологически активные добавки. Вид *Polyscias fruticosa* изучен гораздо меньше, чем *Polyscias filicifolia*, и химический состав его экстрактов исследован в меньшей степени. Целью настоящей работы явилось получение и исследование ростовых характеристик культур клеток *Polyscias fruticosa* и *Polyscias filicifolia*. В результате проведенной работы из листовых эксплантов были получены суспензионные культуры *P. fruticosa* и *P. filicifolia*, изучены их ростовые характеристики при периодическом культивировании по различным критериям роста (сырой и сухой вес, концентрация клеток в суспензии). По всем исследуемым критериям получены S-образные кривые роста, определены ростовые параметры и отмечены характерные различия. В частности жизнеспособность культур в среднем составляла 95% для *P. filicifolia* и 90% для *P. fruticosa*, максимальное накопление биомассы по сухому весу к концу цикла культивирования достигало 9г/л для *P. filicifolia* и 8,5г/л для *P. fruticosa*. Было проведено сравнение основных ростовых характеристик культур: удельная скорость роста (0,2 сут.⁻¹ для *P. filicifolia* и 0,26 сут.⁻¹ для *P. fruticosa*), время удвоения (2,29 сут. для *P. filicifolia* и 2,03 сут. для *P. fruticosa*), индекс роста (5,72 для *P. filicifolia* и 6,48 для *P. fruticosa*), экономический коэффициент (0,23 для *P. filicifolia* и 0,28 для *P. fruticosa*). Также в процессе субкультивирования были отмечены общие закономерности изменения pH среды (увеличение значений pH в лаг-фазе и в стадии деградации).

Изучения эффекта генов короткостебельности пшеницы в культуре соматических клеток *in vitro* на основе изогенного анализа**Ткаченко О.В., Гаврюшова О.С.***молодой ученый, студент**ФГОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова»**bio@sgau.ru, oktkachenko@yandex.ru*

Изогенный анализ основан на использовании почти изогенных сестринских линий, различающихся аллелями только одного гена. Это наиболее точный инструмент, позволяющий установить прямые и плейотропные эффекты конкретных генов на различные признаки. С использованием этого метода возможен поиск генов с сильным положительным эффектом на интересующие признаки. Сравнение эффектов одного и того же гена в разных генотипах позволяет определить норму реакции гена. В результате экстраполяции результатов становится возможным прогнозирование эффекта гена на изученные признаки при внесении его в любые генотипы. При культивировании тканей *in vitro* основной проблемой остается высокая степень зависимости результативности тех или иных методик от генотипа донорных растений. До сих пор не удалось установить генетическую детерминацию *in vitro* морфогенетических процессов и разработать на этой основе приемы оптимизации метода культивирования соматических тканей. На основе QTL-анализа выявлено несколько генов, связанных с эффективностью культивирования клеток и тканей *in vitro*. Однако, на наш взгляд, с точки зрения практического использования имеет значение определение эффектов генов известных генетических систем, обладающих четким фенотипическим проявлением и хозяйственным значением. Серьезным ограничением в использовании метода изогенного анализа является сложность создания наборов почти изогенных линий. Набор почти изогенных линий, альтернативных по генам короткостебельности, созданный профессором Ю.В. Лобачевым, был использован для изучения эффектов генов на этапы соматического эмбриогенеза *in vitro* мягкой и твердой пшеницы. Соматические каллусы получали из незрелых зародышей на среде Линсмайера-Скуга с 2,4-Д 2 мг/л. Морфогенные каллусы пассировались на среду того же состава каждые 30 суток. Общее время культивирования составило 120 суток. Во время анализа культур определялось количество каллусов с очагами меристематической активности или с начавшейся регенерацией побегов. Определение эффектов генов на признаки проводилось путем попарного сопоставления величины изучаемых признаков у сестринских линий. Величина эффектов генов в % рассчитывалась только в случае достоверных различий, определяемых на основе дисперсионного анализа. Установлено, что гены системы Rht, а также sl и Q при внесении в генофон сорта мягкой пшеницы Саратовская 29 могут оказывать существенное влияние на формирование меристематических очагов в соматических каллусах и способность к сохранению регенерационной активности в процессе длительного культивирования таких каллусов. Выявлен ген Rht-B1c, обладающий сильным положительным эффектом на формирование морфогенных каллусов и сохранение регенерационной способности в процессе пассирования. Кроме того, проведено сравнительное изучение влияния гена Rht-B1b на этапы культивирования пыльников и соматических тканей *in vitro* трех сортов твердой пшеницы.

Участие аквапорин-содержащих доменов плазматической мембраны растительной клетки в осмотически индуцируемом эндо/экзоцитозе

Шевырева Т.А.

аспирант

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва, Россия

E-mail: tasya-80@mail.ru

В последнее время особое значение в системе механизмов адаптации растений к изменяющимся условиям окружения придается аквапоринам – мембранным белкам с функцией водных каналов. Регуляция аквапорин-опосредованного трансмембранного водного потока может осуществляться за счет изменения, как активности этих белков, так и их содержания в единице площади мембраны [1]. Ранее нами было показано, что кратковременный осмотический стресс активирует как экзо-, так и эндоцитоз в протопластах из клеток суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы. Кроме того, обнаружено, что транспортируемые везикулы слабо обогащены аквапоринами РІР-типа. Это позволило предположить, что РІР-аквапорины локализованы в малоподвижных доменах плазмалеммы [2]. Целью настоящего исследования стало подтверждение латеральной гетерогенности аквапорин-содержащих доменов плазмалеммы. Для экспериментального обоснования этого предположения было использовано несколько подходов. Первый состоял в наблюдении за локализацией флуоресцентного маркера стеринов – филипина. Второй – в анализе распределения РІР-аквапоринов после солюбилизации плазмалеммы разными типами неионных детергентов. Третий – в анализе содержания РІР-аквапоринов во фракциях клеточных мембран, изолированных из протопластов, подвергнутых осмотическому стрессу. Проведенная с помощью флуоресцентной микроскопии оценка интенсивности окрашивания стерин-обогащенных участков плазмалеммы с помощью филипина показала, что поведение этих мембранных доменов при кратковременном осмотическом стрессе повторяет таковое у аквапорин-содержащих участков плазматической мембраны. В гиперосмотических условиях происходит концентрирование окрашивания в плазмалемме, а в гипоосмотических – снижение. Это позволило предположить, что аквапорины могут локализоваться в доменах плазмалеммы, обогащенных стеринами. Согласно литературным данным стеринины в большом количестве содержатся в так называемых липидных «рафтах». Одной из характеристик «рафтов» является их устойчивость к неионному детергенту Тритону Х-100. Поэтому нами были выделены препараты плазмалеммы, подвергнутые воздействию двух неионных детергентов – додецилмальтозида и Тритона Х-100. Последующий вестерн-блот анализ РІР-аквапоринов показал их концентрирование в мембранных фракциях, устойчивых к действию Тритона Х-100. После выделения плазмалеммы из протопластов, подвергнутых осмотическому сжатию, содержание РІР-аквапоринов увеличивалось в сравнении с контролем. Полученные результаты свидетельствуют, что аквапорины РІР-типа локализуются в «рафт»-подобных структурах плазматической мембраны, для которых характерна относительно низкая скорость везикулярного транспорта при осмотически индуцируемом эндо/экзоцитозе.

Литература: 1. Verkman A.S., Mitra A.K. (2000) Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol.* 278: F13. 2. Шевырева Т.А., Жесткова И.М., Трофимова М.С. (2007) Иммунолокализация РІР-аквапоринов в протопластах из суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы в изоосмотических условиях и при осмотическом стрессе. *Физиология растений.* 54:356.

Аквапорины в осевых органах прорастающих семян**Шижнева Ирина Александровна***научный сотрудник**Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия**E-mail: shijneva@list.ru*

Прорастание семян - это переход семени от состояния покоя к активному росту. При прорастании разворачивается во времени активация метаболизма и подготовка ростовых процессов. Вода играет пусковую роль в прорастании семян, поскольку при набухании постепенно достигаются пороговые для каждого процесса уровни оводненности. Изучение механизмов поступления воды в семена необходимо для понимания прорастания. Вода может проникать в клетку в результате диффузии через липидный бислой, а также через интегральные белки – аквапорины, функционирующие как водные каналы, которые пропускают воду без затраты энергии, по градиенту водного потенциала. Данная работа посвящена выяснению роли аквапоринов в поступлении воды в прорастающие семена. Объектами исследования служили ортодоксальные семена кормовых бобов *Vicia faba minor* и рекальцитрантные семена конского каштана *Aesculus hippocastanum*, прорастание которых происходит только за счет растяжения клеток. Эти семена отличаются по водному статусу. Семена кормовых бобов в состоянии вынужденного покоя имеют низкую влажность (8-10%), дальнейшее возрастание влажности до 66 % происходит за счет матричных сил, увеличение влажности до 74 % при инициации роста происходит за счет осмотических сил. Осевые органы каштана поддерживают в покое влажность 63% - уже на уровне насыщения матричных сил и к моменту прорастания влажность возрастает за счет накопления осмотиков до 74%. Из осевых органов семян были выделены мембраны путем дифференциального центрифугирования гомогената и разделения микросом в водной двухфазной полимерной системе. Мембранные белки подвергали ДДС-Na-ПААГ электрофорезу и вестерн блоттингу с поликлональными антителами к аквапоринам плазмалеммы PIP1 и PIP2 и к аквапоринам тонопласта TIP2 и TIP3;1. Аквапорины присутствовали на блотах в виде мономеров, димеров и мультимеров. В осевых органах набухающих и прорастающих семян бобов и каштана обнаружены все изученные аквапорины. В период интенсивного набухания, происходящего за счет физических процессов и на следующем этапе, когда поступление дополнительных количеств воды связано с накоплением осмотически-активных веществ до момента проклевывания содержание аквапоринов PIP1, PIP2 и TIP2 не менялось в осевых органах каштана и бобов. Содержание аквапорина тонопласта TIP3;1 поддерживалось на одном уровне при набухании осевых органах бобов, значительно уменьшалось при инициации роста. Аквапорин TIP3;1 является маркером тонопласта в вакуолях созревающих семян и в белковых телах. В растущих растяжением осевых органах бобов этот аквапорин исчезал, что могло быть связано с превращением белковых тел в вакуоли. TIP3;1 сохранялся в осевых органах каштана в связи с сохранением вакуолей и поддержанием высокого уровня оводненности. Однако тест на участие аквапоринов в поступлении воды показал, что, несмотря на присутствие аквапоринов в период набухания и инициации роста в осевых органах обоих видов семян, они не участвуют в поступлении воды. Поглощение воды происходит при участии аквапоринов только после инициации роста клеток растяжением.

Влияние форм азотного питания на рост и GUS-активность растений *Arabidopsis thaliana*, трансформированных конструкцией *pARR5::GUS*³

Штратникова Виктория Юрьевна⁴

аспирант

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: vtosha@yandex.ru

Цель работы состояла в изучении роста растений и экспрессии GUS-гена под контролем цитокинин-зависимого промотора ARR5-гена в растениях *Arabidopsis thaliana*, трансформированных конструкцией *pARR5::GUS* [1], выращенных в условиях нитратного или аммонийного азотного питания. Система позволяет по экспрессии гена *pARR5::GUS* получить представление о содержании в растениях активных форм цитокининов [2]. Растения выращивали в течение трёх недель на среде Мурасиге-Скуга с половинным содержанием солей и эквимолярным количеством азота (20 мМ), представленным ионом аммония или нитрата. Экспрессию GUS-гена оценивали по синей окраске продукта GUS-реакции с субстратом X-Gluc. Количественная оценка окраски получена методом обработки изображений [3]. На нитратном источнике азота наблюдался более активный рост и закладка листьев. Накопление активных форм цитокининов в листовой пластинке предшествовало интенсивному увеличению площади листа. Снижение GUS-активности происходило до окончания интенсивного роста, что совпадало по времени с закладкой новых листьев. По мере развития листа GUS-активность смещалась из апикальных частей пластинки в базальные, сохраняясь в гидатодах. Показана связь GUS-активности с сосудистой системой и участками её разгрузки, что отражает транспорт цитокининов из корней в листья и из стареющих органов в более молодые. GUS-активность растений, выращенных на аммонийной среде, сосредотачивалась в семядолях. На второй неделе развития наблюдалось увеличение GUS-активности в семядолях, предшествующее закладке листьев и формированию боковых корней. В листьях GUS-активность локализовалась только в сосудистой системе. Замедленному развитию листьев растений на аммонийном азоте соответствовало пониженное содержание активных форм цитокининов. Определение GUS-активности позволило выявить время и место действия активных форм цитокининов в ходе развития растений, связанного с их морфологическими особенностями на разных формах азотного питания.

Литература: 1. D'Agostino I.B., Deruère J., Kieber J.J. (2000) Characterization of the Response of the *Arabidopsis* Response Regulator Gene Family to Cytokinin. // *Plant Physiology*, vol.124, pp.1706-1717. 2. Aloni R., Langhans M., Aloni E., Dreieicher E. and Ullrich C.I. (2005) Root-synthesized cytokinin in *Arabidopsis* is distributed in the shoot by the transpiration stream // *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, No. 416, pp. 1535–1544. 3. Пожванов Г.А., Батов А.Ю., Медведев С.С. (2007) Метод количественной оценки содержания ИУК по гистохимическому окрашиванию GUS-активности. // *Современная физиология растений: от молекул до экосистем. Матер. докл. международной конф. Сыктывкар, Ч. 1.*, с. 347—348.

³ Работа выполнена в рамках гранта президента Российской Федерации по поддержке ведущих научных школ НШ-3692.2006.4.

⁴ Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Кулаевой О.Н. за помощь в работе и в подготовке тезисов.