

## ПОДСЕКЦИЯ «ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ»

### Некоторые аспекты изучения физиологической активности летучих эфирных соединений растений Якутии

Алексеева М.Н. (Якутск, [alekseevamaryan@mail.ru](mailto:alekseevamaryan@mail.ru))

Проведены серии полевых экспериментальных опытов на территории агроценозов районов Центральной Якутии по изучению воздействия тканевых соков и летучих эфирных соединений видов *Artemisia jacutica* Drob., *Artemisia vulgaris* L., *Achillea millefolium* L., *Pinus pumila* (Pall.) Regel на рост и развитие семян культурного (*Daucus carota* L.) и сорных видов растений (*Chenopodium album* L., *Elytrigia repens* (L.) Nevski, *Polygonum aviculare* L., *Plantago major* L., *Phlomis tuberosa* L., *Vicia cracca* L.). Виды растений выбраны в качестве носителей большего количества эфирных масел с биологически активным началом и как представленные в качестве доминантов при проведении геоботанических описаний фитоценозов. Фитомасса для исследования собрана в районах Центральной Якутии и Оймяконского района – полюса холода во время маршрутно-стационарных работ. Камеральная обработка фитомассы и выделение эфирных масел проведены на базе лаборатории экспериментальной биологии кафедры общей биологии. Опыты по биотестированию заложены в лабораторных условиях и в условиях агроценозов в качестве контрольных и опытных линий роста. Использованы методы: по учету проективного покрытия травостоя, выделения эфирных масел из фитомассы на основе парофазной перегонки, изучения аллелопатической активности тканевого сока на всхожесть семян, биотестирования на рост и развитие семян. При воздействии парами эфирного масла *Pinus pumila* наблюдается полное угнетение роста и развития семян у *Chenopodium album*, развитие семян *Vicia cracca* ингибировано на 85%, *Elytrigia repens* – на 55%. Эфирное масло *Artemisia jacutica* на 65% подавило развитие семян *Phlomis tuberosa*, на 50% ингибировало рост и развитие семян *Chenopodium album* и *Plantago major*. Пары летучих эфирных соединений *Artemisia vulgaris* на 75% подавили развитие семян *Vicia cracca*, и на 50% стимулировали развитие семян *Elytrigia repens*. Эфирное масло *Achillea millefolium* на 30% стимулировало рост и развитие семян пырея ползучего. По отношению к развитию семян *Daucus carota* наблюдалось стимулирование парами летучих эфирных соединений *Artemisia vulgaris* и *Achillea millefolium*. Предлагается использование эфирно-масличных растений в качестве регуляторов роста сорных и культурных видов растений в агроценозах.

### Гликолипиды фотосинтетических тканей представителей рода *Rhododendron* L. как показатель адаптивного потенциала интродуцентов

Антонюк Т.Н. (Киев, Украина, [antonyk\\_t@bigmir.net](mailto:antonyk_t@bigmir.net))

Развитие рододендронов, как и любого другого растения, зависит от климатических условий ареала их распространения. Они определяют эффективность вегетативного и репродуктивного развития растительного организма, которые предопределены системой защитных эндогенных механизмов, среди которых существенное внимание сегодня уделяется липид-пигментным компонентам фотосинтетических мембран, как наиболее чувствительным структурам растительной клетки к изменениям окружающей среды (Оканенко и др., 2007; Климов и др., 2008). Целью работы было исследование особенностей адаптивных реакций на уровне липидных компонентов фотосинтетических тканей рододендронов вечнозеленых (*Rh. fortunei*, *Rh. ponticum*, *Rh. amesiae*), полувечнозеленых (*Rh. obtusum*, *Rh. micranthum*, *Rh. ledebourii*) и листопадных (*Rh. occidentale*, *Rh. arborescens*, *Rh. retiulatum*) разновидностей, интродуцированных в климатических условиях Лесостепи Украины. Динамику содержания гликолипидов и ситостеролов исследовали на протяжении вегетационного

периода интродуцентов с апреля по ноябрь. Результаты исследований свидетельствуют об относительной стабильности фракции гликолипидов в фотосинтезирующих тканях рододендронов *Rh. amesiae*, *Rh. obtusum*, *Rh. micranthum*, *Rh. ledebourii* в течение вегетации. Лишь в июле, при резком повышении температуры (до +27°C), наблюдалось незначительное снижение содержания моногалактозилдиацилглицерола (МГДГ), и его стабилизация в течение последующей вегетации. Содержание дигалактозилдиацилглицерола (ДГДГ) и ситостерола оставалось на стабильном уровне, позволяя, учитывая имеющуюся в литературе информацию (Оканенко, 2007), охарактеризовать эти виды как стойкие к климатическим условиям нашего региона. В листьях листопадных видов (*Rh. occidentale*, *Rh. arborescens*, *Rh. retiulatum*) с сентября по ноября отмечено уменьшение содержания МГДГ, повышение содержания ДГДГ и стабильный уровень ситостерола. Такие трансформации липидов могут быть связанными с сезонными изменениями температуры, а также с деструктивными процессами в фотосинтетических тканях листопадных видов рододендронов. У видов *Rh. ponticum* и *Rh. fortunei* в октябре – ноябре наблюдалось повышение содержания стерола и ДГДГ. Отмечаем также, что у растений вида *Rh. ponticum* при высоких температурах в июле-августе, кроме пула ситостерола, наблюдалось снижение содержания МГДГ и ДГДГ. Выявленные трансформации в содержании гликолипидов и в их соотношении, а также в изменении соотношения гликолипидов/ситостерола определяют структурно-функциональные приспособительные реакции, корректирующие вязкость и обеспечивающие оптимальное липидное окружение для функционирования электрон-транспортных процессов в фотосинтетических мембранах. Анализ особенности липидного состава фотосинтетических органов представителей рода *Rhododendron* позволяет идентифицировать их по степени устойчивости к температурным условиям Лесостепи Украины: как устойчивые виды *Rh. amesiae*, *Rh. obtusum*, *Rh. micranthum*, *Rh. ledebourii*, чувствительные лишь в осенний период листопадные виды *Rh. occidentale*, *Rh. arborescens*, *Rh. retiulatum*, как чувствительные лишь в осенний период и наиболее чувствительные на протяжении всего вегетационного периода виды *Rh. ponticum* и *Rh. fortunei*. Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю Таран Наталии Юрьевне и Оканенко Олександру Аркадиевичу за методическую помощь.

### **Субстратный метод для оценки жизнеспособности клеток суспензионных и каллусных культур**

*Асташкина А.П., Асташкина М.П. (Томск, ara2004@mail.ru, aap1984@inbox.ru)*

При работе с каллусными и суспензионными культурами клеток растений необходимо знать их жизнеспособность как во время культивирования, так и для выявления их реакции на действия благоприятного факторов. Известен ряд методов, позволяющих определить жизнеспособность тканей растений и выразить ее в определенных величинах. Каждый из методов имеет свои недостатки и преимущества. Главным недостатком всех существующих методов является длительность во времени (от 5 часов до недели). Поэтому разработка новых вариантов определения жизнеспособности каллусных и суспензионных культур является актуальной задачей. Целью нашей работы – оценить жизнеспособность каллусной и суспензионной культуры *Centaurea scabiosa* L. (василек шероховатый) в течение культивирования в нормальных условиях при помощи нового недавно предложенного субстратного метода определения суммарной ферментной активности клеток и сравнение полученных данных с таковыми известных методов. В качестве субстрата была выбрана сахароза, как в сравнительном методе. Кроме того, исследована реакция анализируемых объектов на другие углеводы. Обнаружено, что внесение субстрата углеводного типа в анализируемую среду приводит к изменению электропроводности вследствие протекания ферментативных реакций по

утилизации углеводов. Отношение скорости изменения электропроводности во времени отнесенная к количеству клеток есть константа суммарной ферментативной реакции и пропорциональна активности культуры к внесенному субстрату. Полученные значения константы скорости реакции коррелируют с жизнеспособностью клеток по известному методу. Таким образом, предложен экспрессный метод определения жизнеспособности суспензионных и каллусных культур, основанный на изменении электропроводности культуральной среды клеток после внесения субстратов углеводного типа. Тезисы доклада основаны на материалах исследований каллусной и суспензионной культуры, предоставленной кафедрой физиологии растений и биотехнологии Томского государственного университета, проведенных на кафедре физической и аналитической химии Томского политехнического университета. Авторы выражают признательность к.х.н. А.Ю. Яговкину, профессору, д.х.н. А.А. Бакибаеву за помощь в подготовке тезисов; профессору, д.б.н. Р.А. Карначук, к.б.н. Е.С. Гвоздевой за помощь в проведении эксперимента.

**Сравнительный анализ анатомического строения корня и тканевого распределения никеля в растениях-гипераккумуляторах и исключателях из рода *Alyssum* L.**

*Бакланов И.А. (Москва, baklanov\_ia@list.ru)*

Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами является на сегодняшний день острой проблемой мегаполисов и крупных промышленных городов. Перспективной для целей восстановления загрязненных территорий представляется фиторемедиация – комплекс методов биологической очистки с использованием растений-гипераккумуляторов, способных, в отличие от исключателей, накапливать тяжелые металлы (и другие токсиканты) в своих надземных частях в значительных количествах. Для объяснения механизмов феномена гипераккумуляции необходимо всестороннее изучение указанных растений – в том числе на тканевом и клеточном уровнях. Нами были выявлены особенности распределения никеля в тканях растений-гипераккумуляторов и исключателей из рода *Alyssum* L. и определена структура и химический состав утолщений внутренних тангентальных стенок клеток периэндодермального слоя коры корня, характерных для гипераккумуляторов из этого рода. Для проведения экспериментов в качестве модельных объектов были выбраны *Alyssum lesbiacum* (Candargy) Rech.f. (гипераккумулятор) и *Alyssum saxatile* L. (исключатель). Растения выращивали в факторостатной камере на гидропонной культуре в присутствии или отсутствии нитрата никеля. Затем от руки приготавливали тонкие срезы отдельных органов растений. Для изучения распределения никеля в тканях растений срезы обрабатывали раствором диметилглиоксима. Временные препараты просматривали на световом микроскопе. О присутствии никеля судили по малиново-красному окрашиванию. Для определения состава утолщений стенок клеток коры срезы окрашивали аурамином О. Временные препараты просматривали на конфокальном микроскопе (Em 488 нм). О присутствии суберина судили по золотисто-желтому свечению. В растениях *A. lesbiacum* никель накапливался в тканях листьев, преимущественно в клетках эпидермы, причем больше в верхней эпидерме. Наиболее интенсивное накопление металла отмечалось для оснований и тел трихом верхней эпидермы листа. Также отмечалось присутствие никеля в эпидерме и проводящих тканях стебля и в малых количествах в тканях корня. В растениях *A. saxatile* никель накапливался, главным образом, в коре корня и в редких случаях в эпидерме и трихомах базальной части стебля. Причиной различий в накоплении и распределении никеля в тканях *A. lesbiacum* и *A. saxatile* может служить различное анатомическое строение корней у растений с разными стратегиями. Для гипераккумуляторов из семейства Brassicaceae описано образование утолщений внутренних тангентальных стенок клеток

коры корня, однако их структура и состав не были определены. Нами было установлено, что в состав этих утолщений входит суберин. Они образуют целостный сетчатый слой, окружающий стелу корня. Образование вторичных утолщений клеточных стенок со сложной структурой может служить для ограничения апопластного транспорта тяжелых металлов в корне и их перемещения в симпласт и участвовать в организации загрузки металлов в ксилему и их дальнего транспорта. Установление физиологической роли указанных анатомических структур и их роли в механизме гипераккумуляции никеля требует дальнейших исследований. Выражаю благодарность научному руководителю работы д.б.н., проф. В.Б. Иванову и сотрудникам лаборатории физиологии корня ИФР им. К.А. Тимирязева РАН, а также д.б.н. Т.А. Горшковой, заведующей лабораторией механизмов роста растительных клеток КИББ КазНЦ РАН и к.б.н. М.В. Агеевой, с.н.с. лаборатории микроскопии КИББ КазНЦ РАН за ценные консультации и помощь в проведении экспериментов. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ № 08-04-00031).

**Анализ содержания аквапоринов РРР-типа в стерин-обогащенных фракциях плазмалеммы корней и побегов этиолированных проростков гороха**

*Белугин Б.В. (Москва, hausen@yandex.ru)*

Исследования последнего десятилетия свидетельствуют о существовании в плазмалемме животных, грибов и растений функциональных микродоменов – липидных «рафтов», стерин и сфинголипид-содержащих структур. Протеомика липидных рафтов показала высокоспецифичный белковый состав этих надмолекулярных структур и их тесную связь с перцепцией и проведением сигналов, реакциями на стресс и патогены, с процессами эндоцитоза и организацией цитоскелета. Образование липидных «рафтов» в плазмалемме может быть способом оптимальной регуляции сразу нескольких процессов, протекающих в мембране, посредством изменения белок-белковых взаимодействий. В составе «рафтов» обнаруживаются и аквапорины – белки с функцией водных каналов. Наличие аквапоринов может указывать на существенную роль липидных «рафтов» в регуляции ионного и водного гомеостаза клетки. Цель работы состояла в выделении «рафтов» из плазмалеммы, изолированной из побегов и корней гороха (*Pisum sativum*), как Тритон X-100 устойчивой фракции, и анализе содержания стерина и аквапоринов РРР-типа в полученных препаратах. Фракции «рафтов» выделяли флотацией в ступенчатом градиенте плотности Optiprep после солюбилизации плазматических мембран 1% Тритоном X-100 на холоду. Степень обогащения фракций «рафтами» оценивали по величине отношения стерин:белок. Анализ содержания аквапоринов проводили методом вестерн-блот анализа. Установлено, что в присутствии Тритон X-100 солюбилизуется большая часть плазмалеммы – белок детергент-устойчивых мембран составлял менее 20% от общего содержания. При этом во фракции резко возрастала величина отношения стерин:белок и доля аквапоринов оказывалась существенно выше, чем в плазмалемме до солюбилизации детергентом. Такое преимущественное распределение аквапоринов РРР-типа в стерин-обогащенных доменах позволяет нам предположить, что: содержание аквапоринов в плазмалемме может регулироваться трафиком везикул, насыщенных стеринами; и/или взаимодействие аквапоринов с белками липидного «рафта» позволяет регулировать активность водного транспорта на мембранном уровне. Тезисы доклада основаны на материалах исследований проведенных при частичной поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-00548).

## Поступление солей кадмия и свинца в ткани проростков подсолнечника

Блок Ю.А. (Красноярск, [helianthus77@yandex.ru](mailto:helianthus77@yandex.ru))

Проведено исследование степени проникновения ионов кадмия и свинца в ткани 10-ти дневных проростков подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Подсолнечник выращивали в водных культурах в условиях искусственного освещения. Семена проращивались в термостате при  $t=20^{\circ}\text{C}$ . В возрасте четырех дней проростки пересаживались в вегетационные сосуды объемом 500 мл с затемненной корневой системой на водопроводную воду (контроль) и растворы солей кадмия ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ) и свинца ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) в концентрациях  $10^{-5}$  и  $10^{-3}$  М/л соответственно. На 10 день производили гистохимическое исследование распределения кадмия и свинца в тканях, для чего готовили серии поперечных срезов корней, побегов и листьев. В качестве реагента для гистологического выявления свинца и кадмия был использован раствор дифенилтиокарбазона или дитизон приготовленный на ацетоне с водой в соотношении 3:1, при подкислении ледяной уксусной кислотой. Тяжелые металлы обнаруживались в виде нерастворимых дитизонатов красного цвета. В контрольных растениях реакции с дитизоном были отрицательными. При гистохимическом исследовании проростков подсолнечника, инкубированных на растворах тяжелых металлов, отмечено проникновение ионов кадмия и свинца в ткани. Кадмий и свинец были обнаружены главным образом в клеточных стенках ризодермы и коре корня. Большую концентрацию этих элементов наблюдали в наружных слоях клеток и слизи окружающей корень. Окрашивание после инкубации на ионах кадмия было ярче, что указывало на более значительное его накопление в тканях. Ионы кадмия также вызвали сильное ослизнение клеток корня и потерю тургора, что свидетельствует об отравлении корней. На поперечных срезах было видно, что кадмий и свинец в больших количествах откладывались преимущественно в клеточных стенках тканей корня. В центральном цилиндре свинец не обнаруживался, в то время как кадмий был выявлен в клеточных стенках паренхимы, окружающей сосуда метаксилемы, и в стенках метаксилемы. При исследовании срезов стебля подсолнечника ионы свинца и кадмия были обнаружены в клетках эпидермы и паренхимы, а также в незначительных концентрациях в проводящих тканях. Окрашивались исключительно клеточные стенки, причем наиболее интенсивное окрашивание наблюдалось в клеточных стенках эпидермы. Окрашивание после инкубации на ионах кадмия, так же как и в корнях, было ярче, что свидетельствовало о более значительном его поступлении в ткани. Отмечено, что ионы кадмия также вызвали разрушение клеток центральной паренхимы. В листьях ионы свинца обнаружены не были, в то время как кадмий был выявлен в ксилеме и эпидермисе. Полученные результаты согласуются с данными, полученными для кукурузы в исследованиях И.В. Серегина и В.Б. Иванова. Таким образом, распределение окраски срезов и её интенсивность находились в зависимости от исследуемой ткани и степени проникновения ионов тяжелых металлов, а также от того какие элементы находились в среде выращивания. Выявлено, что ионы кадмия и свинца проникают в клетки корня и стебля подсолнечника, вызывая их отравление. Наибольшее угнетающее воздействие на проростки подсолнечника оказал кадмий, что связано с более значительным его проникновением в ткани и выражается в наибольшей степени поражения клеток. Автор выражает благодарность научному руководителю, к.б.н. И.А. Чаплыгиной за помощь в подготовке тезисов.

**Динамика генерации продуктов перекисного окисления липидов мембран  
хлоропластов гороха *Pisum sativum* L. в ответ на действие физических факторов  
различной природы**

*Васильева Е.А. (Нижний Новгород, katelyn@bk.ru)*

Мембраны – важный структурообразующий элемент клетки. Их целостность является необходимым условием нормального протекания всех клеточных процессов. Именно клеточным мембранам отводится главная роль в рецепции различных физических факторов. На биохимическом уровне восприятие физических факторов связывают с изменением процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран. Нами была исследована динамика генерации продуктов ПОЛ мембранами хлоропластов в ответ на действие низкоинтенсивного магнитного поля (МП), гипотермии, а так же совместного действия ионизирующего излучения (ИИ) в малых дозах и гипотермии. Объектом исследования служили 2-х недельные растения гороха *Pisum sativum* L., выращенные в лабораторных условиях. МП генерировалось магнитотерапевтической установкой УМТИ-3Ф «Колибри», создававшей вихревое импульсное низкоинтенсивное магнитное поле со значением магнитной индукции 3,5 мТл, частотой магнитного поля в соленоиде 100 Гц, максимальной амплитудой тока в соленоиде  $25 \pm 3$  А. Длительность экспозиции 15, 30, 60 и 120 мин. Обработке подвергались целые растения. Контролем служили растения, выдержанные в условиях нормального геомагнитного поля. Обработку суспензии хлоропластов ИИ (600 мкГр/ч, время экспозиции 5, 10, 15, 30 и 60 мин), проводили при 10°C, контролем служила суспензия, выдержанная при температуре 10°C (гипотермическая обработка). Действие МП на растения при коротких экспозициях не вызывало изменения содержания продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА). Дальнейшая обработка полем приводила к некоторому ингибированию окислительных процессов, что выражалось в снижении содержания продуктов ПОЛ: минимум содержания ДК и МДА приходился на 60 мин и составил 63,7% и 38,2% соответственно. К 120 мин воздействия эти показатели ПОЛ начинали возрастать, однако так и не достигали начальной величины. Гипотермическая обработка суспензии хлоропластов на протяжении всей экспозиции вызывала уменьшение содержания ДК, при этом минимальное содержание (60% от необработанного контроля) достигалось после 10 мин обработки, а после 60 мин количество ДК достигало контрольного уровня. Ответ мембран на совместное действие гипотермии и ИИ носил двоякий характер. На начальном этапе (5-10 мин) наблюдалось уменьшение содержания ДК относительно обработки только пониженной температурой (на 25 и 10% соответственно), затем этот показатель увеличивался и достигал максимума после 60 мин воздействия. Как гипотермия, так и совместное ее действие с ИИ вызывали увеличение содержания оснований Шиффа (ОШ), при этом 10-минутная совместная обработка вызывала более интенсивное накопление ОШ, чем гипотермия, в то время как 60-минутная, наоборот, уменьшала продукцию ОШ по сравнению с гипотермией. Таким образом, действие физических факторов различной природы вызывало схожее изменение состояния мембран хлоропластов гороха, носившее двухфазный дозозависимый характер.

**Влияние активных форм кислорода на передачу ауксинового сигнала**

*Вершинкин Д.А. (Москва, davershinkin@yahoo.com)*

Одной из актуальных проблем физиологии растений является выяснение механизмов трансдукции гормональных сигналов. В литературе приводятся данные об образовании активных форм кислорода (АФК) под действием ауксина на растения. Сообщалось о том, что АФК способны имитировать эффекты ауксина на ризогенез, деление и растяжение клеток. Однако неясно, участвуют ли они в трансдукции ауксинового

сигнала или задействованы на более поздних этапах. В нашей работе образование АФК детектировалась с помощью флуоресцентной микроскопии, с применением флуоресцентной метки 2,7'-дихлорфлуоресцина диацетата. Показано, что ауксин через 15–30 мин после внесения вызывал образование АФК в 3-4-дневных проростках арабидопсиса. Мы изучали также влияние этих свободных радикалов на экспрессию *in planta* ауксин-зависимой генетической конструкции *Dr5::GUS*, которая была создана на основе промотора гена первичного ответа на ауксин. Опыты проводили на 3-4-дневных проростках трансгенного арабидопсиса, при относительно короткой (4 часа) экспозиции. Индукторы и ингибиторы вносили в раствор, в котором инкубировали проростки. Влияние на экспрессию данной генетической конструкции определяли количественно по активности *GUS in vitro* флуорометрическим методом. Нами изучено влияние различных АФК: супероксида, гидроксил-радикала, пероксида водорода и пероксинитрита, – на экспрессию *Dr5::GUS*. Для получения супероксид-радикала использовали систему, состоящую из НАДН, феназинметасульфата и тетраэтилового нитросинего. В качестве альтернативы был использован метилвиологен, который способен восстанавливаться гем-содержащими ферментами. Гидроксил радикал получали с помощью реактива Фентона, а пероксинитрит – с помощью реакции нитрита и пероксида водорода в кислой среде. Пероксид водорода вносили в раствор инкубации до конечной концентрации от 100 мкМ до 10 мМ, в качестве альтернативы использовали систему, генерирующую пероксид водорода из глюкозы с использованием глюкозооксидазы. Образование пероксида водорода в системе лимитировалось количеством фермента, которое было подобрано из расчета, чтобы система генерировала пероксид водорода от 1 мкМ/мин до 100 мкМ/мин. Показано, что только супероксид-радикал достоверно индуцировал транскрипцию этой генетической конструкции (на 100-147%). Ни пероксинитрит, ни гидроксил-радикал не индуцировали *Dr5::GUS* и, наоборот, подавляли эффект ауксина на 48–58% и 34–62%, соответственно. Пероксид водорода сам по себе не оказал заметного эффекта. В то же время система с глюкозооксидазой в варианте, генерирующим 1 мкМ/мин пероксида водорода, вызывала ингибирование активности *GUS* как при индукции ауксином, так и в контроле. Дополнительно был поставлен ряд опытов со скевенджерами свободных радикалов и ингибитором НАД(Ф)Н-оксидазы. Было показано, что скевенджер супероксида  $\text{CuCl}_2$  подавлял эффект ауксина на экспрессию *Dr5::GUS* на 35–40%, а скевенджеры пероксида водорода KJ и пероксинитрита тиомочевина усиливали эффект ауксина на 72% и 62%, соответственно. Ингибитор НАД(Ф)Н-оксидазы  $\text{ZnCl}_2$  подавлял эффект ауксина на 24–54%. Таким образом, радикал супероксида способен активировать ауксин-чувствительный промотор, однако остается неясным, участвует ли эта АФК в трансдукции ауксинового сигнала. Исследования поддержаны грантом НШ-3444.2008.4.

### **Фотосинтетические показатели цикория корневого при различных уровнях минерального питания**

*Вороненко В.В., Комарова С.В., Леонова К.А. (Москва, zubkovnv@mail.ru)*

Элементы минерального питания прямо и косвенно влияют на интенсивность фотосинтеза. Действия их на фотосинтез обусловлено тем, что минеральные вещества входят в состав ферментов и пигментов или непосредственно участвуют в процессе фотосинтеза в качестве активаторов (1). Целью наших исследований являлось выявление зависимости фитометрических параметров посевов цикория корневого от уровня минерального питания. Исследования проводились в краткосрочном однофакторном микрополевым опыте, заложенном на дерново-подзолистой почве Балашихинского района Московской области. В схему опыта включались следующие варианты: 1) Контроль (без удобрений); 2)  $\text{N}_1\text{P}_1\text{K}_1$  –  $\text{N}_{100}\text{P}_{70}\text{K}_{155}$ ; 3)  $\text{N}_2\text{P}_2\text{K}_2$  –  $\text{N}_{125}\text{P}_{85}\text{K}_{195}$ . Доза минеральных удобрений приводится в килограммах на 1 га д. в-ва. Повторность опыта

четырежды. Учетная площадь делянки – 2 м<sup>2</sup>. Количество делянок – 12. Число вариантов – 3. Основным показателем фотосинтетической продуктивности растений является количество сухого вещества, синтезируемого 1 м<sup>2</sup> листовой поверхности за сутки, то есть чистая продуктивность фотосинтеза (ЧПФ). Полученные результаты свидетельствуют, что применение минеральных удобрений оказало существенное положительное влияние на массу листьев, к концу вегетации сухая масса листьев в варианте N<sub>1</sub>P<sub>1</sub>K<sub>1</sub> возросла по сравнению с неудобренным вариантом на 43,8%, варианте N<sub>2</sub>P<sub>2</sub>K<sub>2</sub> – на 59,6 %. Наиболее интенсивный прирост сухой массы листьев протекал на втором уровне минерального питания. Удобрения стимулировали рост ассимилирующих органов. В результате внесения минеральных удобрений в варианте N<sub>1</sub>P<sub>1</sub>K<sub>1</sub> площадь листьев относительно контроля увеличилась к концу вегетации на 59%, в варианте N<sub>2</sub>P<sub>2</sub>K<sub>2</sub> – на 89%. Удобрение способствовало нарастанию листовой поверхности и их массы, но величина ЧПФ при этом уменьшалась по мере увеличения дозы вносимых удобрений. Относительно контроля в среднем за вегетацию снижение ЧПФ составило в варианте с N<sub>1</sub>P<sub>1</sub>K<sub>1</sub> – 16%, в варианте N<sub>2</sub>P<sub>2</sub>K<sub>2</sub> – 22,7%. Полученные данные свидетельствуют также о снижении продуктивности работы листьев (ПРЛ) цикория по мере возрастания доз минеральных удобрений. Результаты исследований показывают, что внесение изучаемых доз минеральных удобрений обеспечило существенную прибавку урожая корнеплодов цикория. Таким образом, продуктивность фотосинтеза и продуктивность работы листьев цикория корневого снижались по мере увеличения уровня минерального питания, но урожайность корнеплодов при этом существенно возрастала.

#### **Участие жасмоновой кислоты в передаче сигналов зеленого света**

*Гавриленко О.Ю., Ефимова М.В. (Томск, stevia555@mail.ru)*

Морфогенез растительного организма находится под непосредственным контролем внешних и внутренних факторов. Свет, как внешний фактор, регулирует рост и развитие растений в зависимости от интенсивности и спектрального состава. Влияние зеленой области спектра на рост растений изучено меньше, чем действие красного и синего света, несмотря на то, что зеленый свет составляет значительную часть солнечной радиации. Фоторецепторами зеленого света (ЗС) являются криптохром, фитохром и, недавно обнаруженный, гелиохром. Однако восприятие света фоторецепторами не достаточное условие для действия света на растения. Передача светового сигнала в клетках растений не возможна без вторичных посредников. Среди недавно обнаруженных фитогормонов, которые возможно могут участвовать в трансдукции сигнала селективного света, является жасмоновая кислота. Доказательства гормональной природы жасмоновой кислоты (ЖК) были получены более 20 лет назад, но ее физиологическая и сигнальная функции исследованы меньше, чем других гормонов. Известно, что ЖК действует как ингибитор, подобно абсцизовой кислоте и этилену, и как индуктор роста, подобно ауксинам. Она задерживает удлинение проростков и корней, рост клеток в культуре ткани, эмбриогенез, некоторые реакции фотосинтеза, ускоряет клубнеобразование раннеспелых сортов картофеля. В более ранних исследованиях было отмечено взаимодействие красного и синего света с жасмоновой кислотой. Однако участие ЖК в передаче зеленого света не рассматривалось. Работа выполнена на модельном растении *Arabidopsis thaliana* экотипа *Landsberg erecta (Ler)* и его мутанте *hy4* с нарушениями рецептора криптохрома 1, поглощающего помимо синей области спектра зеленый свет.

Размеры гипокотилей 7-дневных проростков *hy4*, росших в темноте были меньше, чем у родительской линии *Ler*. Проростки *hy4* проявляли большую чувствительность к действию экзогенного жасмоната в концентрациях 10<sup>-8</sup> – 10<sup>-6</sup> М. Действие жасмоновой кислоты проявлялось в увеличении роста осевых органов и уменьшении размеров семядолей. Освещение зеленым светом (29 мкмоль/м<sup>2</sup>с) вызывало стимуляцию роста



семядолей у дикого типа *Ler* и незначительное подавление роста гипокотилей, видимых изменений в морфогенезе проростков мутанта не наблюдалось. Отмечена различная ростовая реакция проростков *A. thaliana* под влиянием ЖК и зеленого света. Так, жасмоновая кислота усиливала эффект зеленого света в отношении гипокотилей проростков *Ler*, причем с увеличением концентрации эффект усиливался. У мутанта *hy4*, ЗС снимал действие жасмоната ( $10^{-8}$  М и  $10^{-6}$  М) на размеры гипокотилия и семядолей. Таким образом, показано тканеспецифичное действие ЖК в фотоморфогенезе *A. thaliana* и взаимодействие регуляторных систем, контролируемых жасмоновой кислотой и зеленым светом. Работа поддержана грантом РФФИ (грант 08-04-90042-Бел\_а). Авторы выражают благодарность профессору, д-ру биол. наук Р.А. Карначук за помощь в подготовке тезисов.

### **Изменения липид-пигментного состава фотосинтетических мембран горчицы сарептской (*Brassica juncea* Czern.) при действии ионов кадмия**

*Гаврилюк О.В. (Киев, Украина, o\_gavriluk@ukr.net)*

Кадмий является одним из наиболее токсичных металлов. Он обуславливает инактивацию ферментов, проявляет мутагенные и канцерогенные свойства. Существуют растения-аккумуляторы, способные накапливать значительное количество тяжелых металлов, вынося их из почвы, тем самым, очищая почву биологическим методом. Горчицу сарептскую (*Brassica juncea*) рассматривают как один из перспективных видов – гипераккумуляторов кадмия. Поэтому возникает необходимость исследования влияния тяжелых металлов на физиологические процессы растений, обеспечивающих фиторемедиацию. Фотосинтетический аппарат формируется на ранних этапах роста и развития растительного организма. По литературным данным, ионы кадмия у нетолерантных видов приводят к существенным изменениям деятельности фотосинтетического аппарата. Это может лимитировать интенсивность метаболизма, а значит, и выживаемость растений. Поэтому целью наших исследований было определение содержания основных фотосинтетических пигментов – хлорофиллов *a* и *b*, каротиноидов, гликолипидов растения-гипераккумулятора горчицы сарептской при действии постоянной и переменной концентрации ионов кадмия. У опытных растений горчицы сарептской сорта Новинка, на седьмой день от начала проращивания, дистиллированную воду заменяли раствором нитрата кадмия в концентрации  $2 \times 10^{-4}$  М. В первом варианте опыта на протяжении всего периода экспозиции, раствор кадмия не заменяли, как и дистиллированную воду в контроле, корни от слизи не отмывали. Во втором варианте опыта раствор поллютанта заменяли каждые 24 часа, корни отмывали от слизи. Растения для измерений отбирали на протяжении трех дней от начала экспозиции. Проведенные нами опыты указывают на незначительное снижение у опытных вариантов содержания суммы хлорофиллов на первые сутки экспозиции, в то время как на вторые и третьи сутки мы наблюдали существенное снижение содержания хлорофилла *b*. Полученные результаты указывают на количественное изменение липидных компонентов фотосинтетических мембран. Нами отмечено уменьшение содержания дигалактозилдиацилглицерола (ДГДГ) и моногалактозилдиацилглицерола (МГДГ) при выращивании горчицы в среде с повышенным содержанием ионов кадмия и отмывании корней от слизи. Это может быть связано с реорганизацией мембранных структур фотосинтетического аппарата, направленных на поддержание оптимального уровня его функционирования при действии стрессового фактора.

## **Физиологическая роль brassinosterоидов в морфогенезе *Arabidopsis thaliana* на зеленом свете**

*Ефимова М.В., Литвиненко И.В., Ланкин А.В. (Томск, stevia555@mail.ru)*

Морфогенез растения находится под контролем внешних и внутренних факторов. С одной стороны, это свет, который регулирует рост и развитие растений. С другой стороны, имеются эндогенные регуляторы – фитогормоны, которые могут быть вовлечены в управление фотоморфогенезом. Было высказано предположение, что одними из них являются brassinosterоиды (БС). Brassinosterоиды – это фитогормоны нового поколения, которые обладают мощным фиторостостимулирующим действием в малых концентрациях и по сравнению с традиционными средствами защиты растений, снижают экологическую нагрузку на окружающую среду. В настоящее время имеется много работ по взаимодействию красной области спектра и фитогормонов, однако практически не изучено влияние зеленого света и brassinosterоидов на рост и развитие растений. Удобным модельным объектом для изучения регуляторной роли БС в фотоморфогенезе служат растения *Arabidopsis thaliana*, для которого получены мутанты с нарушениями в биосинтезе БС (*det2*) и проявляют световой фенотип в темноте. В работе использовали синтетические БС с высокой физиологической активностью – brassinolid, 24-эпibrassinolid и 28-гомоbrassinolid в концентрации 1 мкМ, выбранной при анализе влияния различных концентраций БС на морфогенез арабидопсиса. Исследования этиолированных проростков *A. thaliana* показали, что мутант *det2* отличался от дикого типа Col более укороченным гипокотилем, а также бóльшей площадью семядолей. Показано, что экзогенные БС могут имитировать действие света в темноте, запуская в растениях каскад реакций, приводящий к увеличению размеров семядолей и укорочению гипокотыля. Ингибирование роста гипокотыля наблюдалось при действии эпibrassinolida, brassinolid вызывал максимальное увеличение площади семядолей. Освещение проростков арабидопсиса зеленым светом вызывало процессы, аналогичные действию экзогенных БС. Кратковременная деэтиоляция на зеленом свете (15 минут,  $\lambda_{\max} = 553$  нм, 29 мкмоль/м<sup>2</sup>с) приводила к подавлению длины гипокотыля, распрямлению гипокотыльной петли и увеличению площади семядолей у Col и *det2*. Совместное действие БС и зеленого света привело к сложению эффектов на примере роста семядолей дикого типа и его мутанта. Таким образом, показана физиологическая активность зеленого света, а также brassinosterоидов в регуляции морфогенеза арабидопсиса на ранних этапах онтогенеза. Работа поддержана грантом РФФИ (грант 08-04-90042-Бел\_а). Авторы выражают благодарность профессору, д-ру биол. наук Р.А. Карначук за помощь в подготовке тезисов.

## **Видовые особенности накопления ионов меди фруктовой кожурой**

*Зеленый Ю.М., Красовский А.О., Логацкий В.Д. (stk71016@yandex.ru)*

Любое растение в течение своей жизни функционирует как ионообменник с окружающей средой. При этом набор обмениваемых ионов различен у различных видов и определяется потребностью растения в тех или иных макро- и микроэлементах. В тканях растения микроэлементы распределяются неравномерно. Местами их накопления могут выступать ткани, содержащие биополимеры с высокой сорбционной емкостью. В качестве такого депо может выступать кожура фруктов, содержащая значительное количество полисахаридов: целлюлозы и пектиновых веществ (ПВ). Целью работы являлась оценка потребности в ионах меди различных фруктовых растений на основании сорбционной емкости кожуры их плодов в концентрированных экспериментальных растворах. Было показано, что 1г сухой измельченной кожуры апельсина связывает  $180,5 \pm 4,6$  мг/г ионов меди, банана –  $154,0 \pm 4,6$  мг/г, яблока –

141,6 ± 5,0 мг/г, лимона – 151,1 ± 3,0 мг, и мандарина – 132,1 ± 2,3 мг/г. Таким образом, было отмечено, что сорбционная емкость фруктовой кожуры различна у различных видов. Причинами наблюдаемых различий могут быть как различия в пористости кожуры, так и в содержании в ней полисахаридов (ПС). Вклад пористой структуры в сорбцию ионов меди оценивали в тесте с метиленовым синим, концентрация которого в растворе определялась спектрофотометрически. Было показано, что 60% ионов, связанных кожурой мандарина, связывается за счет пористой структуры. Для кожуры лимона, апельсина и яблока достоверных различий обнаружено не было. За счет пористой структуры они связывают 30-35% ионов. Наименьший вклад пористой структуры в связывание ионов меди был показан для кожуры банана (28%). Оставшееся количество ионов меди может быть связано различными ПС, входящими в состав фруктовой кожуры: водорастворимыми полисахаридами (ВРПС), ПВ, целлюлозой и гемицеллюлозой. Методом гидролиза из образцов фруктовой кожуры были выделены ВРПС и определено их процентное содержание. Максимальное количество было получено из кожуры мандарина, а минимальное – из кожуры банана. Эти ПС в своем составе также имеют функциональные группы, способные к взаимодействию с ионами меди. Поэтому в значения сорбционной емкости фруктовой кожуры были внесены поправки на содержание в ней данных ПС. Оставшаяся доля ионов меди сорбируется за счет взаимодействия с целлюлозно-пектиновым комплексом. Так как сорбционная емкость целлюлозы по отношению к ионам меди менее 1 мг/г [1], то при дальнейших расчетах ею пренебрегали и считали, что оставшаяся доля ионов меди связывается в основном ПВ. Методом кислотного гидролиза из оставшихся после извлечения ВРПС образцов фруктовой кожуры были выделены ПВ и рассчитаны их сорбционные емкости. В результате по сорбционной емкости ПВ исследуемые растения были выстроены в следующий ряд: банан (114,6 ± 1,3 мг/г) > яблоко (57,7 ± 2,1 мг/г) > апельсин (55,3 ± 2,6 мг/г) > лимон (41,1 ± 1,9 мг/г) > мандарин (12,8 ± 2,8 мг/г). Это означает, что в процессе роста большинство функциональных групп в ПВ фруктовой кожуры мандарина занимают соответствующими ионами и при внесении этих биополимеров в экспериментальный раствор они могут связать дополнительно только небольшое количество меди. В отличие от мандарина, в ПВ бананов, яблок и апельсин содержится больше свободных функциональных групп, а, следовательно, в экспериментальных растворах они могут связать больше меди. Поэтому именно эти фрукты можно рекомендовать для применения в качестве сорбентов: как в медицине, так и в процессах биоремедиации.

### **Определение содержания лектинов у растений рода *Sedum* L.**

*Коцюба Я.В. (Киев, Украина, ja\_nochka@mail.ru)*

Биологически активные вещества растительного происхождения в последнее время находят широкое применение в биологии и медицине. Среди них значительное место занимают лектины соединения белково-углеводной природы, которые входят в состав клеточных мембран и обеспечивают идентификацию и взаимодействие между клетками, защищают от инфекций, выполняют рецепторные функции. Растения рода *Sedum* L. заслуживают особого внимания благодаря своим ценным биологическим, высоким декоративным качествам, нетребовательностью к условиям выращивания, высоким адаптационным возможностям, лекарственным свойствам (обезболивающего и регенерирующего действия). Поэтому изучение биохимического состава и наличия биологически-активных веществ, в частности лектинов, и возможностей использования интродуцированных видов *Sedum* L. является особенно актуальным и требует проведения соответствующих исследований. Целью нашей работы было определить наличие лектинов в вегетативных органах 7 представителей рода *Sedum* L. (*S. album* L., *S. aizoon* L. × *S. kamtschaticum* Fisch. et C.A. Mey., *S. ewersii* Lodd, *S. hybridum* L.,

*S. spectabile* Boreau, *S. spectabile* 'Herbstfreude', *S. telephium* L.), растущих в условиях открытого грунта Ботанического сада им. акад. О.В. Фомина. Исследования проводили в 2007–2008 годах в период весеннего отрастания растений после зимнего покоя. Содержание лектинов определяли в отфильтрованном соке листьев при помощи реакции гемагглютинации с использованием 2%-ой суспензии эритроцитов 4-х групп крови человека. Реакцию проводили в стандартных иммунологических планшетах. К серии последовательных двукратных разведений сока листьев добавляли 2%-ю суспензию эритроцитов. Учитывали титр агглютинирующей активности лектинов, который характеризовался максимальным разведением раствора, при котором ещё наблюдали агглютинацию эритроцитов. Результаты проведенных исследований показали, что показатели титра агглютинирующей активности исследованных растений отличались между собой. Относительно высокие показатели гемагглютинации отмечены у *S. aizoon* × *S. kamtschaticum* (2<sup>5</sup>) и *S. hybridum* (2<sup>4</sup>). У *S. telephium* (2<sup>2</sup>) и *S. ewersii* (2<sup>1</sup>) они были значительно ниже, а у *S. album*, *S. spectabile*, *S. spectabile* 'Herbstfreude' не наблюдали агглютинирующей активности. Таким образом, нами было установлено, что разные виды рода *Sedum* существенно отличаются по содержанию интересующих нас биологически-активных веществ, а наиболее перспективными для проведения дальнейших фармакологических исследований являются *S. aizoon* × *S. kamtschaticum* и *S. hybridum*.

#### **Изучение влияния АБК на экспрессию генов в ходе деэтиоляции ячменя**

*Кравцов А.К. (Москва, KravtsovAK@rambler.ru)*

Исследование гормональной регуляции жизни растений является одной из центральных задач физиологии и биохимии растений. Это объясняется тем, что весь жизненный цикл растительных организмов, начиная от оплодотворения яйцеклетки и кончая смертью, происходит под контролем фитогормонов. Усилия наших исследований направлены на изучение гормональной регуляции деэтиоляции ячменя (*Hordeum vulgare* L.). По мнению большинства авторов, деэтиоляция – один из важнейших этапов жизни растений. Ключевую роль в этом процессе играет свет, фитохромная система и фитогормоны. Практически доказанным можно считать участие цитокинина в процессе деэтиоляции ячменя. Так, нами ранее было показано, что цитокинин совместно со светом стимулируют деэтиоляцию, вызывая дифференциальное повышение интенсивности транскрипции хлоропластных генов, необходимых для превращения этиопластов в хлоропласты и для формирования фотосинтетического аппарата. Установлено, что цитокинин сокращает время перехода ячменя на автотрофное питание. Участие другого фитогормона, антагониста цитокинина абсцизовой кислоты (АБК) в ходе деэтиоляции остаётся недостаточно изученным. В ходе наших исследований установлено, что АБК ( $7,6 \times 10^{-5}$ М,  $7,6 \times 10^{-6}$ М и  $7,6 \times 10^{-10}$ М) практически не влияет на накопление хлорофилла в 6-дневных зеленеющих листьях ячменя. Однако с помощью run-on транскрипции нами было показано, что через 3 часа инкубации листьев на свету в растворе АБК ( $7,6 \times 10^{-5}$ М) существенно снижается интенсивность транскрипции как минимум шести из 28 изучаемых нами генов пластома. Среди них два гена рибосомальных белков (*rpl23-2*, *rps16*), два гена белков фотосистемы II (*psbA*, *psbD*), гены субъединиц ферментов РБФК и Матуразы К (*rbcL* и *matK* соответственно). Кроме того, с помощью метода ПЦР после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) было оценено содержание мРНК генов субъединиц Mg-хелатазы (ключевой фермент биосинтезы хлорофилла) ядерного кодирования. Для эксперимента были выбраны 6-дневные этиолированные листья ячменя. Инкубацию на свету проводили в кюветах на растворах с БАП ( $2,2 \times 10^{-5}$ М) и АБК ( $7,6 \times 10^{-5}$ М). Выделение РНК проводили через 2, 4, 8 часов после начала инкубации. В результате было установлено, что максимальное содержание мРНК генов *Xan f*, *Xan g* достигается через 4 часа после начала инкубации листьев на

свету, однако под влиянием БАП и АБК происходит снижение уровня мРНК гена *Xan f*, а уровень мРНК *Xan g* не регулируется фитогормонами. Уровень мРНК *Xan h* не изменялся на протяжении 8-ми часов эксперимента. На основании представленных результатов можно сделать вывод, что АБК ( $7,6 \times 10^{-5}$ М) ингибирует экспрессию ряда генов хлоропластных белков, увеличивая время деэтиоляции ячменя.

### **Определение динамики растворимых фенольных соединений в вечнозеленых растениях криолитозоны в годовом цикле роста и развития**

*Кычкина А.В. (Якутск, easya84@mail.ru)*

Растительность конкретного региона, как известно, формируется, живет и развивается на фоне и под воздействием различных абиотических и биотических стрессов окружающей среды. Все стрессы, в конечном счете, изменяют направление биохимических реакций, формируя стрессовый метаболизм. У древесно-кустарниковых растений процессы, связанные с переходом в состояние глубокого и длительного вынужденного покоя, сопровождаются выработкой специализированных механизмов адаптации. К их числу принадлежит биосинтез и накопление фенольных соединений. В работе приведены данные по изучению сезонной динамики суммы растворимых фенольных соединений (РФС) сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) и брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L), т.к. их фотосинтез сочетает низкую температуру и высокую инсоляцию как факторы фотоингибирования, а вынужденный покой приходится на экстремально низкие температуры. Также обсуждены возможные механизмы участия РФС в формировании их устойчивости в условиях криолитозоны. Выявлено, что минимальное содержание РФС у сосны и ели соответственно  $6,80 \pm 0,70$  и  $12,06 \pm 1,50$  (мг/г сырой массы) и совпадает по времени с набуханием почек, у брусники он составляет  $28,78 \pm 0,95$  (мг/г сырой массы) и приходится на период прохождения различных фенологических фаз. В вегетационный период на динамику накопления РФС в ассимилирующих органах вечнозеленых растений также накладываются видоспецифические свойства объектов. Необходимость защиты от УФ лучей является причиной более раннего повышения содержания РФС в хвое светлюбивой сосны, по сравнению с елью, брусникой, растущих в более затененных условиях. Максимальные содержание РФС в объектах исследования наблюдаются осенью: в хвое сосны и ели –  $18,33 \pm 0,62$  и  $22,53 \pm 1,20$ , для листьев брусники –  $132,35 \pm 3,84$  мг/г сырой массы соответственно. Проведен анализ зависимости содержания РФС от температуры воздуха. Влияние температуры на изменение содержания РФС в вечнозеленых растениях наиболее отчетливо проявляется на границах сезона – в ранневесенний (апрель-май месяцы) и осенний (после 1 сентября) периоды. Таким образом, фенольные соединения наряду с другими накапливающимися в клетке метаболитами (в первую очередь, сахарами, растворимыми белками и др.), могут выступать непосредственно в роли криопротекторов, понижая температуру замерзания содержимого клеток и таким образом увеличивая морозостойкость растений. Автор выражает признательность к.х.н. В.Е. Софроновой за помощь в подготовке тезисов.

### **Изучение кислой вакуолярной инвертазы осевых органов семян конского каштана при прорастании**

*Литягина С.В. (Москва, lityagina@mail.ru)*

Важнейшим условием прорастания семян является достаточное своевременное поступление воды в клетки. Приток воды обеспечивается накоплением веществ в вакуоли, создающих дополнительное осмотическое давление. Кислая инвертаза, локализованная в вакуоли, расщепляет поступившую сахарозу, на фруктозу и глюкозу,

способствуя тем самым поступлению воды. В качестве объекта исследования выбраны семена конского каштана (*Aesculus hippocastanum*). Характерная особенность семян конского каштана в том, что они прорастают только за счет растяжения клеток гипокотилия, без участия клеточного деления клеток. Свежесобранные семена подвергали холодной (+4°C) стратификации во влажном песке 16-18 недель, чтобы предотвратить потерю ими способности прорасти. Зависимость активности вакуолярной инвертазы от рН в осевых органах семян каштана была определена в предварительных экспериментах. Установлено, что оптимум рН для кислой вакуолярной инвертазы составляет 5.5. Для анализа белка вакуолярной инвертазы прорастающих семян изолировали осевые органы после 4, 9 и 14 недель стратификации; белки экстрагировали 0.1 М фосфатным буфером (рН 6.5), центрифугировали при 16 000 g, 20 мин, диализовали супернатант 24 ч при +4° С против того же буфера. После диализа супернатант разделяли при помощи нативного электрофореза. Нативный электрофорез проводили в 7%-ом полиакриламидном геле (рН 8,9) по методу Davis B.J. (1964). Для обнаружения активности инвертазы после электрофореза гель помещали в раствор фосфатно-цитратного буфера (рН 5,5) с 0,6 М сахарозой. Реакцию останавливали кипящей смесью, содержащей 0,2% 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид и 4% NaOH. Об активности вакуолярной инвертазы судили по розово-красной окрашенной полосе. Окрашенная полоса имела мол. массу 520 кДа. Для определения молекулярной массы субъединиц инвертазы окрашенную полосу вырезали и измельчали в 10% ТХУ. Центрифугировали при 16 000 g, 20 мин, супернатант удаляли, а осадок промывали 7% ТХУ, вновь центрифугировали (16 000 g, 20 мин). Осадок белка, промытый ацетоном для удаления ТХУ, растворяли в двукратном буфере для образцов для денатурирующего электрофореза (Laemmli, 1970). Денатурирующий электрофорез проводили в 10% полиакриламидном геле. На окрашенных Кумасси R-250 гелях проявлялась одна полоса с мол. массой 65 кДа. Впервые показано, что кислая вакуолярная инвертаза в осевых органах конского каштана имеет мол. массу 520 кДа и состоит из 8 субъединиц с мол. массой 65 кДа. В осевых органах семян конского каштана мол. массы, как нативного белка, так и его субъединиц не меняются в зависимости от длительности покоя и его глубины. Работа поддержана грантом РФФИ 08-04-00416-а.

### **Индукция каллусогенеза пажитника греческого**

*Логвина А.О. (Минск, anna.logvina@mail.ru)*

Стероидные гликозиды растений обладают широким спектром биологического действия на живые организмы. У этих соединений обнаружена способность тормозить рост некоторых форм злокачественных образований, снижать уровень холестерина в крови, а также фунгицидная, антибактериальная и противовирусная активности. Составная часть стероидных гликозидов – сапогенины, служат исходным сырьем для синтеза стероидных гормонов и их аналогов. Наибольшее значение среди сапогенинов имеет диосгенин. В нашей стране отсутствие сырья для медицинской промышленности, содержащего диосгенин, восполняется за счет импорта. Альтернативным источником получения диосгенина могут выступать культуры клеток растений, синтезирующие данное соединение, и в частности пажитника греческого (*Trigonella foenum-graecum* L.). Это одно из древнейших лекарственных растений. Лекарственным сырьем обычно служат семена, экстракты из которых обладают противовоспалительными, антихолестеринными, тонизирующими, антианемическими и другими терапевтическими эффектами. Использование вместо интактных растений их клеточных культур, имеет ряд преимуществ: независимость производства от погодных условий и болезней, возможность управления процессом биосинтеза и т.д. В связи с этим целью настоящей работы явилось получение культуры клеток пажитника греческого и установление

характера влияния фитогормонов на эффективность процессов дедифференциации и каллусогенеза у данного растения. Для индукции каллусогенеза были использованы листовые экспланты асептически выращенных 4-5 недельных растений пажитника греческого. Минеральная основа питательной среды соответствовала прописи Мурасиге и Скуга (МС). В работе было использовано 7 вариантов сред, которые различались соотношением регуляторов роста – ауксинов и цитокининов. В качестве ауксина в состав сред входила 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), в качестве цитокинина – кинетин. Концентрации указанных фитогормонов в питательных средах варьировали в диапазоне от 0,5 до 2,0 мг/л. Выращивание каллусов осуществлялось в условиях термостата при 24,5°C в темноте. Оценка эффективности каллусогенеза производилась на 28-е сутки после переноса эксплантов на питательные среды, содержащие фитогормоны. В результате проведенных экспериментов было установлено, что максимальная эффективность каллусогенеза (100 %) отмечалась на 28-е сутки культивирования у листовых эксплантов *Trigonella foenum-graecum* в присутствии 1,0 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина. Полученные каллусы имели светло-оранжевую либо желтую окраску, среднеплотную консистенцию. Для вариантов питательных сред, содержащих 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина, 1,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина, были также получены достаточно высокие значения анализируемого показателя, которые составили 92 % и 85 % соответственно. На питательной среде, включающей 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина, эффективность каллусогенеза снижалась незначительно и была равна в среднем 70 %. Наиболее низкая скорость инициирования первичного каллуса пажитника греческого была характерна для питательной среды, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина (59 %). Таким образом, среди протестированных комбинаций 2,4-Д и кинетина наиболее эффективной для каллусогенеза пажитника греческого является использование указанных фитогормонов в концентрации 1,0 мг/л. Увеличение содержания 2,4-Д в среде до 2,0 мг/л существенно ингибирует процессы дедифференциации и каллусогенеза у данного растения.

#### **Ультроструктура клеток культур *Panax ginseng* и *Panax japonicus* var. *repens***

*Макарова Д.В. (Москва, dmakarova@bk.ru)*

Женьшень является растением-продуцентом ценных вторичных метаболитов. В связи с резким сокращением природных запасов женьшеня во многих странах было начато его культивирование. Использование культур клеток обеспечивает получение экологически чистой продукции в гораздо больших объемах, по сравнению с интактными растениями. Специфичными для женьшеня являются тритерпеновые гликозиды даммаранового ряда, т.н. гинзенозиды. Изучение внутриклеточной локализации гинзенозидов в культуре с помощью ТЭМ является актуальной научной задачей. В связи с нашим предположением о том, что гинзенозиды являются электронноплотными соединениями, целью данной работы было проанализировать локализацию вторичных метаболитов в клетках культуры *Panax ginseng* и *Panax japonicus*, и соотнести данные химического анализа по содержанию гинзенозидов с ультроструктурой клеток культуры в зависимости от фазы цикла выращивания. В качестве объектов использовали культуры клеток *Panax ginseng* линии L-1 и *Panax japonicus* var. *repens* №62. Культуры выращивались на модифицированной среде Мурасиге и Скуга, цикл выращивания 21 день. Рост и физиологическое состояние клеток оценивали по изменению веса сухой и сырой биомассы и жизнеспособности. Анализ гинзенозидов проводили с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления. Для изучения ультроструктуры использовали трансмиссионную электронную микроскопию. Ультратонкие срезы изготовлены алмазным ножом на ультратоме LKB Ultratome V и смонтированы на медных сеточках, контрастированы цитратом свинца. Результаты: В культуре клеток *P. japonicus* на среде

с НУК синтезируется большое количество вторичных соединений – гинзенозидов, представленных 7 индивидуальными классами. В культуре клеток *P. ginseng* на среде с 2,4-Д синтез гинзенозидов очень низок, синтезируются только гинзенозиды Rg-группы. В клетках *P. japonicus* уже на 7 сутки находится большое количество осмиофильных соединений, липидных капель. Для обеих культур отмечено множество пластид, в которых содержатся темные, электронноплотные включения, лейкопласты располагаются рядом с ядром. Это может свидетельствовать об участии пластид в синтезе вторичных соединений. В целом, структура клеток характерна для синтетически активных клеток. К 14 суткам в клетках женьшеня настоящего начали образовываться крупные вакуоли с электронноплотным, осмиофильным содержимым, что может свидетельствовать о том, что культура находится в фазе замедления роста или стационара, а вакуоли являются местом депонирования вторичных соединений. В клетках женьшеня японского вакуоли еще мелкие, многочисленные. Клетки имеют активные ядра, но в цитоплазме уже практически не наблюдали плотных включений и липидных капель. Мелкие вакуоли сплошь заполнены темным содержимым, что также свидетельствует о процессах депонирования вторичных соединений, которые начались в клетке. К 21 суткам в культуре *P. ginseng* можно наблюдать явные процессы деградации содержимого клеток. Клетки культуры женьшеня японского обладают признаками синтетически активных клеток, клетки с признаками деградации встречались редко. Большая часть темных осмиофильных включений находится именно в вакуолях, что позволяет предположить ведущую роль вакуолей в депонировании вторичных соединений.

**Влияние сульфата кадмия на состояние гомеостаза проростков пшеницы**  
*Наумова М.М., Ерофеева Е.А. (Нижний Новгород, progresso.1812\_g@list.ru)*

Типичным проявлением токсического действия тяжелых металлов в отношении растений принято считать угнетение ростовых процессов, усиление свободнорадикального окисления и липопероксидации, нарушение процессов фотосинтеза и снижение содержания фотосинтетических пигментов. В то же время имеются данные, показывающие, что в некоторых дозах тяжелые металлы могут оказывать положительное влияние на состояние гомеостаза растений. В связи с этим целью работы явилось изучение действия сульфата кадмия в широком диапазоне доз на ряд физиолого-биохимических показателей проростков пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) (интенсивность липопероксидации, рост корневой системы и побега, содержание фотосинтетических пигментов). Растения 8 опытных групп выращивали в течение 7 дней на растворах сульфата кадмия в концентрации от  $6,25 \times 10^{-5}$  до  $0,80 \times 10^{-2}$  %. Каждая последующая концентрация соли была больше предыдущей в 2 раза. Растения контрольной группы выращивали на дистиллированной воде. На 8-е сутки эксперимента определяли максимальную длину корневой системы, длину побегов, а также интенсивность липопероксидации (по содержанию малонового диальдегида – МДА) и уровень хлорофиллов А, В и каротиноидов. Сульфат кадмия в области относительно низких концентраций ( $6,25 \times 10^{-5}$  –  $0,50 \times 10^{-3}$  %) не влиял на интенсивность липопероксидации, а при возрастании концентрации до  $0,10 \times 10^{-2}$  % уменьшал содержание МДА у проростков на 25% по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ). Дальнейшее увеличение концентрации сульфата кадмия до  $0,20 \times 10^{-2}$  % приводило к нормализации уровня липопероксидации ( $p > 0,05$  по отношению к контролю). И, наконец, в наиболее высоких концентрациях ( $0,40 \times 10^{-2}$  –  $0,80 \times 10^{-2}$  %) сульфат кадмия вызывал значительное увеличение интенсивности перекисного окисления липидов (уровень МДА увеличивался более, чем в 2 раза по отношению к контролю –  $p < 0,05$ ). В области наиболее высоких концентраций ( $0,20 \times 10^{-2}$  –  $0,80 \times 10^{-2}$  %) сульфат кадмия вызывал существенное угнетение ростовых процессов у пшеницы, как корневой системы, так и побега (более



чем в 2 раза по отношению к контролю;  $p < 0,05$ ). Влияния же остальных исследованных концентраций соли кадмия на рост пшеницы выявлено не было. Сульфат кадмия оказывал сходное действие на уровень хлорофиллов А, В и каротиноидов. В области относительно низких концентрация соли ( $6,25 \times 10^{-5} - 0,10 \times 10^{-2} \%$ ) отмечалось снижение содержания всех фотосинтетических пигментов (хлорофилла А – до 50% по сравнению с контролем; хлорофилла В – до 60%; каротиноидов – до 40%;  $p < 0,05$ ). В области наиболее высоких концентраций ( $0,20 \times 10^{-2} - 0,80 \times 10^{-2} \%$ ) уровень всех исследованных пигментов, напротив, нормализовался ( $p > 0,05$ ). Таким образом, изменение уровня липопероксидации и пигментов при действии сульфата кадмия в широком диапазоне концентраций имело немонотонный характер, в отличие от процессов роста корневой системы и побега пшеницы. Следует отметить наибольшую устойчивость содержания хлорофиллов и каротиноидов к токсическому эффекту кадмия. Возможно, что для выживания растения в экстремальных условиях наибольшее значение имеет поддержание процесса фотосинтеза, как основного источника энергии для растительного организма.

### **Исследование содержания флавоноидов в интактных растениях и культуре тканей рода *Gentiana* L.**

*Олиферчук И.В. (Киев, Украина, Iryn4ukk@ukr.net)*

Ценные лекарственные свойства растений рода *Gentiana* обусловлены синтезом в них широкого спектра биологически-активных веществ. Одной из основных групп соединений, которые синтезируются в растениях этого рода, являются флавоноиды. Известно, что биосинтез флавоноидов определяется видовой принадлежностью растений, является органоспецифическим процессом, а также сильно зависит от условий произрастания. Характерными флавоноидами для растений рода *Gentiana* являются изоветиксин, изоориентин, лютеолин, сапонарин и изосапонарин. Объектами исследований были интактные растения горечавки (*G. punctata* и *G. cruciata*) и их каллюсные ткани. В результате проведенного анализа выявлено, что среди исследованных частей растения *G. punctata* содержание флавоноидов было наивысшим в стеблях (9,055%), что в 26,9 раз превышало содержание в корнях. В каллюсе корневого происхождения содержание флавоноидов немного ниже, чем в корнях интактных растений, в то время как содержание этих веществ в каллюсе стеблевого происхождения на 61,1% превышало содержание в корнях растений. В корневом и стеблевом каллюсах содержание флавоноидов было значительно ниже (в 27,7 и 16,7 раз соответственно), чем в стеблях интактных растений. Исследование интактных растений *G. cruciata* показало, что суммарное содержание флавоноидов в листьях составляло 2,632 % от сухой массы и было наивысшим, в стеблях их количество снижалось, а в корнях было наименьшим: ниже в 18,4 раза, чем в листьях и в 15,5 раз, чем в стеблях. Исследования каллюсов корневого и стеблевого происхождения *G. cruciata* показали, что они способны синтезировать флавоноиды. К тому же, как и в случае с *G. punctata*, этот показатель был немного выше в каллюсе стеблевого происхождения. Нами выявлено, что суммарное содержание флавоноидов в каллюсах как стеблевого, так и корневого происхождения, превышает их содержание в корнях интактных растений в 4 и 3 раза соответственно, но ниже (в 3,8 и 5,1 раз соответственно), чем в стеблях интактных растений. Сравнительный анализ двух исследованных видов показал, что как в стеблях, так и в корнях интактных растений *G. punctata*, содержание флавоноидов превышало (в 3,6 и 2,4 раза соответственно) показатели у *G. cruciata*. Вместе с тем, обоим видам присуще то, что большее количество флавоноидов синтезируется в надземной части интактных растений и значительно меньшее – в корнях. Содержание флавоноидов в стеблевых каллюсах у обоих видов выше, чем в корневых, оно даже иногда превышает содержание в корнях интактных растений (*G. cruciata*).

## Температурная зависимость прироста биомассы каллусной культуры эхинацеи пурпурной

Савчук Е.В. (Минск, Беларусь, [katrin8787\\_87@mail.ru](mailto:katrin8787_87@mail.ru))

Промышленное получение экономически важных биологически активных соединений на основе культур растительных клеток и тканей зачастую ограничено недостаточно высокой их продуктивностью. Синтез вторичных метаболитов в условиях *in vitro* контролируется рядом факторов, один из которых температура. В большинстве случаев для накопления значительных количеств БАВ культивируемыми растительными клетками используют двухстадийное культивирование, сущность которого заключается в обеспечении на первом этапе максимального прироста клеточной биомассы, а на втором – создании условий для активного синтеза метаболитов. Каждый из этих процессов имеет характерную температурную зависимость. Данные о влиянии температуры на рост и биосинтезы клеточных культур немногочисленны, хотя, очевидно, что это важный фактор, требующий изучения, поскольку температурные оптимумы для роста культуры клеток и образования вторичных метаболитов зачастую не совпадают. Более того, температурные сдвиги в процессе культивирования могут приводить к изменениям не только количества продуцируемых соединений, но также и их качественного состава. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение температурной зависимости прироста биомассы каллусной культуры эхинацеи пурпурной как продуцента различных биологически активных веществ (гидроксикоричных кислот и их производных, флавоноидов, водорастворимых полисахаридов и др.), проявляющих иммуностимулирующее, противомикробное, противовоспалительное действие. Каллусная культура эхинацеи пурпурной была инициирована из листовых эксплантов, изолированных из асептически выращенных трехнедельных проростков. В работе использовали питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов: 2,0 мг/л индолилуксусной кислоты, 0,1 мг/л 2,4-дихлорфеноксисуksусной кислоты и 0,5 мг/л кинетина. Выращивание каллусов производили в темноте в условиях термостата при температурах 18, 21, 24, 27 и 30 °С. Продолжительность ростового цикла составляла 28 суток. Определение показателей роста каллусов проводили на 6-е сутки (лаг-фаза), 17-е сутки (лог-фаза) и 28-е сутки (стационарная фаза). Все эксперименты выполнены в трехкратной повторности. Согласно полученным данным на начальных этапах ростового цикла (лаг-фаза) прирост биомассы каллусов эхинацеи пурпурной не имел четко выраженной температурной зависимости. В ходе логарифмической фазы отмечалось резкое замедление скорости ростовых процессов каллусов, культивируемых как при пониженных температурах – 18-21°С, так и в условиях ее повышения до 30°С. В стационарную фазу ростового цикла максимальные величины удельной скорости роста каллусов эхинацеи пурпурной были обнаружены при 27°С. Снижение температуры до 18 °С вызывало падение прироста клеточной биомассы более чем в 5 раз, при 21°С – в среднем в 2 раза по сравнению с оптимальной температурой. Ингибирование ростовых процессов при действии повышенной температуры 30°С достигало 1,3-1,4 раза. Таким образом, температурный оптимум для роста каллусов эхинацеи пурпурной составляет 27°С, что необходимо учитывать при разработке биотехнологий получения БАВ на основе культуры клеток данного лекарственного растения.

## Функциональное состояние фотосинтетического аппарата двух видов *Deshampsia* с различным ареалом выращивания в условиях жесткого ультрафиолетового излучения

Светлова Н.Б., Стороженко В.А., Топчий Н.Н. (Киев, Украина, [vstoro@mail.ru](mailto:vstoro@mail.ru))

Исследование видов растений с одинаковым генетическим происхождением, но различным ареалом произрастания является важной вехой в изучении стратегий адаптации растений к стрессовым условиям. Изучение реакции фотосинтетического аппарата (ФСА) на стрессовые воздействия, является основополагающим в исследовании механизмов стрессовой устойчивости. Жесткое ультрафиолетовое излучение (УФ-В) – стрессовый фактор, индуцирующий существенные изменения в жизнедеятельности растений. В связи с этим целью нашей работы было изучение функционального состояния ФСА растений *Deshampsia antarctica* (природный ареал – прибрежная зона Антарктиды) и *Deshampsia caespitosa* (природный ареал – умеренные широты Европы, Сибири, Кавказа) в условиях жесткого ультрафиолетового излучения (УФ-В). Флуоресценцию хлорофилла в листьях измеряли при помощи ХЕ-РАМ флуорометра (Walz, Германия). Максимальный квантовый выход фотохимических реакций ФСII ( $F_v/F_m$ ) является одной из основных характеристик комплексов ФСII. Используется эта величина для оценки эффективности работы ФСII в адаптированных к темноте листьях, когда хиноновые акцепторы  $Q_A$  полностью окислены. Полученные нами результаты показали, что параметр  $F_v/F_m$  существенно снижался в листьях *D. antarctica*, экспонированных в условиях УФ-В излучения. Вместе с тем,  $F_v/F_m$  в листьях *D. caespitosa*, не отличался в пределах достоверности для контроля и опыта. Эффективный квантовый выход ФСII ( $F'_v/F'_m$ ) используется для оценки максимальной эффективности фотохимических реакций при действии света, когда часть хиноновых акцепторов  $Q_A$  находится в восстановленном состоянии. В листьях *D. antarctica*, этот параметр снижался почти в 2,5 раза, тогда как для *D. caespitosa* значение  $F'_v/F'_m$  оставалось неизменным. Не менее важными параметрами функционального состояния ФСА является  $q_p$  и  $\phi_{f_{cII}}$ .  $q_p$  характеризует степень окисленности первичных хиноновых акцепторов  $Q_A$ , которая зависит от скорости восстановления  $Q_A$  и редокс-состояния пластохинонового пула.  $\phi_{f_{cII}}$  отображает квантовый выход электронного транспорта. УФ-В индуцировало снижение  $q_p$  и  $\phi_{f_{cII}}$  в листьях *D. antarctica* и повышение этих показателей в листьях *D. caespitosa*, что в определенной степени может свидетельствовать о большей резистентности ФСА *D. caespitosa* к УФ-В, естественным ареалом которой являются умеренные широты Европы, Сибири и Кавказа, в сравнении с эндемическим видом Антарктиды *D. antarctica*. Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла,  $qN$ , характеризует степень тепловой диссипации энергии света в светособирающих комплексах. Уровень  $qN$  в листьях *D. caespitosa* был меньшим при действии УФ-В, что свидетельствует о более эффективной утилизации солнечной энергии в фотохимических процессах. Исходя из полученных результатов можно сделать вывод о меньшем деструктивном действии УФ-В на ФСА листьев *D. caespitosa* в сравнении *D. antarctica*, эндемичного вида Антарктиды, что, скорее всего, обусловлено особенностями интродукции *D. antarctica* в наших условиях, а также генетически запрограммированной стойкостью *D. caespitosa* к УФ-В.

## Влияние условий азотного питания на накопление биомассы и активность антиоксидантных ферментов пшеницы *Triticum aestivum* L. при засолении

Сидоренко Е.С. (Москва, [kleo80@yandex.ru](mailto:kleo80@yandex.ru))

Условия азотного питания оказывают сильное влияние на жизнедеятельность растений, наиболее очевидным результатом которого является разная стратегия ростовых процессов, а также способность к адаптации при действии стрессовых

факторов. Целью данной работы являлось исследование влияния азотного питания на скорость накопления биомассы и активность антиоксидантных ферментов растений пшеницы в условиях засоления. Пшеницу *Triticum aestivum* L. сорта «Инна» выращивали на водной культуре в течение 21 дня в условиях различного азотного питания на  $\frac{1}{4}$  среды Хогланда ( $\text{NO}_3^-$ -вариант),  $\frac{1}{2}$  среды Прянишникова ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -вариант) и  $\frac{1}{2}$  модифицированной среды Прянишникова ( $\text{NH}_4^+$ -вариант). Часть растений в возрасте 14 дней подвергали воздействию стресса, добавляя в питательный раствор 150 мМ NaCl. Среди контрольных растений наибольшую сырую массу надземной части накапливали растения  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -варианта, масса надземной части растений  $\text{NO}_3^-$ -варианта превышала массу пшеницы, выращенной на среде с аммонием; корни растений  $\text{NO}_3^-$ - и  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -вариантов не различались по этому показателю, наименьшая масса корней была у пшеницы  $\text{NH}_4^+$ -варианта. Данный солевой стресс не оказывал влияния на накопление биомассы растений пшеницы. Таким образом, накопление биомассы растениями пшеницы зависело только от условий азотного питания. В тканях корня и второго листа определена активность глутатионредуктазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы. Уровень активности глутатионредуктазы в тканях растений, получавших аммонийный азот, был самым высоким. Активность глутатионредуктазы в листе была выше, чем в корнях у растений всех вариантов, причем при засолении активность фермента в листе возрастала, а в корнях убывала. Уровень активности гваяколовой пероксидазы в корнях и листьях был примерно одинаков, при засолении активность фермента в корне растений  $\text{NH}_4^+$ -варианта возрастала, у  $\text{NO}_3^-$ -варианта не изменялась, у  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -варианта снижалась; в листе всех вариантов солевой стресс вызывал увеличение активности фермента. Активность СОД в тканях контрольных растений аммонийного варианта была самой низкой. Под действием солевого стресса активность СОД в листе растений всех вариантов не изменялась, в корнях  $\text{NO}_3^-$ -варианта снижалась. Таким образом, форма азотного питания влияла на изменение активности антиоксидантных ферментов у растений пшеницы при засолении.

**Возможности использования дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* для сенсibilизации растений на примере фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*)**

Симонова А.А., Терехина Л.Д. (Ульяновск, [aleksa-simonova@mail.ru](mailto:aleksa-simonova@mail.ru))

Для сельскохозяйственных растений экзогенные стимуляторы роста в сверхмалых дозах являются мощным биологическим раздражителем, стрессовым фактором, мобилизующим иммунную систему и процессы роста. Возможность иммунизации растений авирулентными патогенами и их метаболитами достаточно изучена, однако такие исследования имеют в основном теоретическое значение. В этой связи нами была исследована возможность использования дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* для сенсibilизации растений. *B. thuringiensis* – спорообразующая бактерия, различные подвиды которой обладают избирательным действием в отношении не только насекомых, но и некоторых микроорганизмов. Токсический агент *B. thuringiensis* – специфические дельта-эндотоксины, входящие в состав параспоральных включений. Установлен механизм действия токсина на клетки кишечника насекомых, заключающийся в разобщении процессов окислительного фосфорилирования и дыхания, дезэнергизации и последующем разрушении клеток. Была проведена серия экспериментов, направленная на выявление ростостимулирующего действия дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на фасоль. Исследования проводились как в полевых условиях, в течение всего вегетационного периода фасоли, так и *in vitro*. В лабораторных условиях, на ювенильных растениях, показана способность токсина стимулировать развитие проростков. Для этого трехдневные проростки фасоли обыкновенной сорта «Журавушка» с равными морфометрическими показателями, стерилизовали поверхностно 0,5%-ным раствором  $\text{KMnO}_4$  и осуществляли дальнейшее проращивание в

пробирках на стерильном увлажненном песке при 28-30°C в условиях 16-часового светового дня. Растения обрабатывались токсином в ультра малой концентрации однократно, в момент закладки опыта. Использовали несколько контрольных вариантов. В первые три дня наблюдений происходило незначительное угнетение проростков под влиянием раствора кристаллов, которое проявлялось, прежде всего, в замедление роста. По окончании эксперимента показатели выровнялись, и, отмечалось опережение по морфометрическим и биохимическим показателям у образцов, обработанных раствором дельта-эндотоксина. В полевых опытах при исследовании урожайности, оказалось, что наибольшая продуктивность у образцов, обработанных раствором дельта-эндотоксина. Известно, что в случае кратковременного воздействия микробных метаболитов на растение может развиваться системная устойчивость, фенотипически схожая с индуцированной. Таким образом, характер влияния дельта-эндотоксина на растения сходен с действием иммунизаторов. Следует отметить, что обнаружение сенсibiliзирующих свойств дельта-эндотоксина открывает новые возможности для практического применения этого агента в защите растений и в целом указывает на перспективность разработки на основе дельта-эндотоксинов *B. thuringiensis* средств индукции устойчивости растений к патогенам. Автор выражает признательность научному руководителю д.б.н., профессору Л.К. Каменек за помощь в подготовке тезисов. Работа выполнена при поддержке гранта УлГУ на лучшую студенческую работу.

### **Фосфорилирование белков в листьях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. при действии ультрафиолета В**

Степанченко Н.С. (Москва, [stepnats@gmail.com](mailto:stepnats@gmail.com))

Быстрое и транзиторное увеличение содержания этилена – один из самых ранних ответов клетки на обучение УФ-В. Ранее было установлено, что рост продукции этилена не зависит от функциональной активности компонентов пути передачи этиленового сигнала. Это позволило сформулировать гипотезу о том, что в растениях пути передачи сигналов этилена и УФ-В могут иметь общий сигнальный компонент. В качестве объекта исследования использованы растения *A. thaliana* дикого типа (экотип Col-0), а также этилен-нечувствительных мутантов *etr1-1* и *ctr1-1*. Мы предположили, что одной из наиболее ранних точек взаимодействия между сигналами этилена и УФ-В могут быть протеинкиназы и, в частности, МАП-киназы. При низких и средних дозах УФ-В фосфорилирование МВР – основного субстрата МАП-киназ *in vitro* – снижалось у растений дикого типа, тогда как у этилен-нечувствительных мутантов фосфорилирование МВР усиливалось в зависимости от дозы УФ-В. Определение мол. массы белка, фосфорилирующего МВР, было проведено при помощи фосфорилирования МВР *in situ* (в геле). Установлено, что МВР-фосфорилирующая активность ассоциирована с полипептидом 45±2 кДа. У *Arabidopsis* такой мол. массе соответствует МАП-киназы AtMPK6 и AtMPK3. Величина мол. массы предполагаемой УФ-В-регулируемой МАП-киназы сходна с мол. массами LeMPK1/2/3, которые в культивируемых клетках томатов активируются УФ-В. Чтобы выяснить, сколько индивидуальных ферментов способно фосфорилировать МВР *in vitro*, мы провели реакцию фосфорилирования в геле, но после разделения белков при помощи 2-DE. При помощи Progenesis удалось идентифицировать у дикого типа по крайней мере 13 полипептидов, фосфорилирующих МВР, находящихся в диапазоне рI 5,3-5,7 и мол. масс 40-60 кДа. Такое количество полипептидов не противоречит результатам об экспрессии генов МАП-киназ в листьях *Arabidopsis*. Чтобы «исключить» те МАП-киназы, активность которых регулируется этиленом, мы провели *in situ* анализ МАП-киназной активности белков, выделенных из листьев растений *Arabidopsis*, обработанных *in vivo* этиленом. Обнаружено, что обработка этиленом вызывала активацию МАП-киназы с рI

4,2 и мол.массой  $47 \pm 2$  кДа. Используя в качестве критериев поиска близость величин  $pI$  и мол. массы, наличие у белков предполагаемых сайтов фосфорилирования, а также анализ экспрессии генов, регулируемых УФ-В, в доступных базах данных выбраны возможные «кандидаты», которые могли соответствовать анализируемым пятнам на гелях. Совокупность полученных данных позволяет предположить, что УФ-В сигнал низкой и/или средней интенсивности воспринимается пока неидентифицированным рецептором УФ-В. После восприятия УФ-В сигнала может включаться МАП-киназный каскад с AtMPK3/6. В результате работы AtMPK6 может увеличиваться фосфорилирование и активность АЦК-синтазы 6, что приводит к росту продукции этилена. Образующийся этилен включает МАП-киназный каскад с этилен-активируемой МАП-киназой. Если в УФ-В-зависимом МАП-киназном каскаде работает AtMPK3, то активируются фосфолипазы, в результате чего растёт содержание фосфатидной кислоты, которая, вероятно, может инактивировать путь передачи этиленового сигнала с функционирующей этилен-активируемой МАП-киназой. Чтобы сделать выбор между двумя названными МАП-киназами, необходимы дополнительные генетические исследования, проводимые в нашей лаборатории. Работа выполняется при частичной поддержке гранта РФФИ №08-04-000643.

### **Светозависимая регуляция активности пероксидазы в побегах проростков пшеницы**

*Томилиן М.В. (Нижний Новгород, Tom0990@yandex.ru)*

Пероксидаза (ПО) – один из важных ферментов «двойного назначения», вовлечённых как в процесс генерации, так и детоксикации активных форм кислорода (АФК). Полифункциональность данного фермента позволяет предполагать его активное участие в контроле уровня АФК и, как следствие, процессов роста, механизмов формирования реакций растений на действия экологических факторов, основной из которых – свет. Цель настоящей работы – исследовать модифицирующее действие света на динамику активности пероксидазы в побегах пшеницы. Опытными объектами служили 5-6 дневные проростки яровой пшеницы сорта «Московская 35» (водная культура), выращенные в темноте и при 14 часовом фотопериоде. Ферментативную активность ПО определяли в растворимых (цитозольных) и ионсвязанных (связанных с клеточной стенкой) фракциях, выделенных из зелёных и этиолированных побегов проростков пшеницы. Общую активность определяли спектрофотометрически (590 нм), активность,  $K_m$  и  $V_m$  отдельных изоформ ПО – после проведения электрофореза в ПААГе. В качестве субстрата использовали раствор 3,3'-диаминобензидина (0,005M). Активность ПО выражали в условных единицах в расчёте на мг белка за 1 мин. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Lowry et al (1951). Используя два вышеуказанных метода, удалось показать, что как растворимые, так и ионсвязанные фракции ПО проявляет наибольшую ферментативную активность в этиолированных побегах. В изоферментных спектрах у зелёных и этиолированных проростков пшеницы было выявлено общие белковые зоны. Для растворимых фракций это зоны с  $R_f$  0,02; 0,84 и 0,93, а для ионсвязанных – с  $R_f$  0,02 и 0,93. Кроме описанных зон выявлены три дополнительные светозависимые изоформы. При этом в изоферментных спектрах ПО зелёных побегов исчезает одна медленно движущаяся зона с  $R_f$  0,09, и появляются две новые, которые отсутствуют у ПО этиолированных побегов ( $R_f$  0,14 и 0,29). Таким образом, можно сделать вывод, что светозависимые изменения активности ПО сопровождаются модификацией изоферментных спектров. Согласно результатам кинетического анализа выявлено увеличение сродства ( $K_m$ ) ряда изоформ к 3,3'-диаминобензидину: для растворимых фракций – это кислые (быстро движущиеся), для ионсвязанных – щелочные (медленно движущиеся белковые зоны). Соотношение суммы чисел  $V_m/K_m$  исследуемых изоформ зелёных/этиолированных побегов составило для

растворимых 1,36, а для ионсвязанных соответственно – 2,46. Следовательно, из этого соотношения можно сделать вывод, что наибольшая светозависимость характерна для фракций, связанных с клеточной стенкой. Несоответствие данных, полученных при анализе общей, а также активности отдельных белковых зон с анализом сродства (K<sub>m</sub>) к 3,3'-диаминобензидину исследуемых изоформ в спектре ПО, по-видимому, можно трактовать ингибирующим (для этиолированных побегов) или активирующим (для зелёных побегов) действием субстрата на отдельные изоформы. Механизм влияния света на активность пероксидаз неизвестен. В любом случае, поскольку реакция растений на свет опосредована через систему фоторецепторов, их возбуждение может вызвать: 1) изменения в окислительно-восстановительном режиме, одним из компонентов которого является ПО; 2) через цепь сигналов привести к сдвигу в балансе фитогормонов. Зависимость активности ПО от присутствия ИУК была продемонстрирована *in vitro*, а также показана в наши экспериментах *in vivo*.

**Цитокинин-связывающий белок *Synechocystis* sp. PCC 6803**  
*Шевченко Г.В., Каравайко Н.Н., Селиванкина С.Ю., Зубкова Н.К.*  
(Москва, [okulaeva@mail.ru](mailto:okulaeva@mail.ru))

Известно, что цианобактерии являются предшественниками хлоропластов растений, биогенез которых регулируется фитогормонами, в частности цитокинином и абсцизовой кислотой. В связи с этим задачей настоящей работы было показать наличие элементов гормональной системы у цианобактерий, характерных для растений. Ранее было показано, что в клетках *Synechocystis* sp. PCC 6803 присутствуют физиологически активные цитокинины в количествах сопоставимых с их содержанием в высших растениях. О наличии гормон-связывающих белков в *Synechocystis* sp. PCC 6803 данных не было. Выделение цитокинин-связывающих (ЦСБ) белков проводили, используя сложную многоступенчатую систему очистки и разделения белков, включающую гидрофобную хроматографию на фенил-сефарозе и аффинную хроматографию на колонке с зеатином-рибозидом, а также использовали разделение белков по Р<sub>i</sub> в нативных условиях на приборе Rotofor (Bio-Rad, США) и с помощью двумерного электрофореза в денатурирующих условиях. Идентификация ЦСБ проводилась с помощью полученных нами и очищенных антиидиотипических антител (АТа-и) к цитокинину, которые фактически являются антителами к рецептору гормона. Белки, связывающиеся с АТа-и, не взаимодействуют с преиммунными АТ и АТ, полученными к зеатину, что говорит о высокой специфичности взаимодействия ЦСБ с АТа-и. ЦСБ активировали в присутствии транс-зеатина тотальную транскрипцию *in vitro* в системе, содержащей лизированные клетки цианобактерий. Исследование белков в одномерном и двумерном электрофорезе с последующим иммуноферментным анализом показало наличие белка в области 67 кДа, связывающегося с АТа-и.

**Влияние 24-эпибрассинолида и 6-бензиламинопурина на уровень экспрессии гена *TADHN* дегидрина пшеницы и концентрацию аминокислоты пролина в проростках пшеницы при стрессе**

*Юлдашев Р.А., Сафутдинова Ю.В., Авальбаев А.М. (Уфа, [shakirova@anrb.ru](mailto:shakirova@anrb.ru))*

Ранее нами было выявлено, что обработка 24-эпибрассинолидом (ЭБ) индуцирует в растениях пшеницы заметное накопление гормонов цитокининовой природы на фоне отсутствия каких-либо изменений в уровне ИУК и АБК. Это позволило предположить, что большое значение в проявлении физиологической активности ЭБ имеют цитокинины. Известно, что обезвоживание, и как следствие повреждение структуры клеток, лежит в основе таких стрессовых факторов как засуха, засоление и дефицит влаги. Основываясь на том, что важнейшими осмопротектантами являются белки

дегидрины и аминокислота пролин, был проведен сравнительный анализ влияния ЭБ и цитокинина 6-бензиламинопурина (БАП) на уровень экспрессии *TADHN* гена дегидрина пшеницы и концентрацию свободного пролина в проростках пшеницы. В результате опытов была выявлена сходная по уровню чувствительность гена *TADHN* к ЭБ и БАП, правда, динамика его экспрессионной активности в ответ на гормоны различалась: ЭБ индуцировал быстрое усиление экспрессии этого гена с максимумом, приходящимся на 6 ч, тогда как БАП вызывал постепенную активацию транскрипции *TADHN* гена, которая достигала максимума к 24 ч. При этом, в отличие от действия ЭБ, БАП-индуцированной активации экспрессии *TADHN* гена дегидрина пшеницы предшествует транзитное накопление АБК. Это указывает на существование альтернативных путей гормональной регуляции экспрессии *TADHN* гена дегидрина. В то же время, выявлено, что обработка БАП и ЭБ также индуцировала накопление пролина в проростках в 1.5 и 2 раза, соответственно. Поскольку АБК играет ключевую роль в регуляции синтеза и накопления пролина, важно было оценить вклад эндогенной АБК в БАП- и ЭБ-индуцированном повышении содержания свободного пролина. С этой целью были предприняты опыты с обработкой растений пшеницы ингибитором синтеза АБК флуридоном. Опыты с совместной с гормонами обработкой проростков флуридоном показали, что ингибитор предотвращал вызываемое БАП, но не ЭБ, повышение уровня пролина, что, вероятно, обусловлено тем, что сама обработка БАП, в отличие от ЭБ, приводит к транзитному увеличению уровня АБК. Аналогичная картина наблюдалась и в предобработанных ЭБ и БАП в смеси с флуридоном растениях в условиях дефицита влаги. Так, воздействие хлорида натрия или маннита приводило к возрастанию концентрации пролина в проростках, что является характерным ответом растений на факторы среды, вызывающие нарушение водного режима. Предобработанные ЭБ и БАП проростки в условиях обезвоживания также характеризовались повышенным уровнем пролина. Однако флуридон при совместной предобработке с гормонами в отличие от варианта с ЭБ полностью предотвращал стресс-индуцированное накопление пролина в варианте с предобработкой проростков БАП. Таким образом, способность и ЭБ, и БАП активно воздействовать на уровень осмопротектантов в ходе предобработки, вероятно, вносит важный вклад в реализацию их преадаптирующего к последующему обезвоживанию действия, что, в конечном счете, отражается в снижении уровня повреждающего действия обезвоживания на растения пшеницы. При этом проявление защитного действия ЭБ в отличие от БАП, вероятно, может осуществляться независимо от стресс-индуцированного накопления АБК. Работа проведена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-04-01563 и грантов Президента РФ МК-4081.2008.4 и НШ-915.2008.4.