



САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ

Общество физиологов растений России  
Всероссийский институт растениеводства имени Н. И. Вавилова  
Санкт-Петербургский государственный университет

Годичное собрание общества  
физиологов растений России  
Научная конференция  
с международным участием  
и школа молодых ученых

21-24 июня 2016  
Санкт-Петербург, Россия



# СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ: ОТ РЕЦЕПТОРА ДО ОТВЕТНОЙ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА



УДК [ ]  
ББК [ ]  
[ ]

Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма. 21–24 июня 2016, С.-Петербург, Россия / Медведев С.С. Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета, 2016. – X с.  
ISBN

И. Медведев, С.С. П. Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма (2016; С.-Петербург)

С 21 по 24 июня 2016 года в г. Санкт-Петербурге (Россия) будет проходить Годичное собрание Общества физиологов растений России. Запланировано проведение научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма». Конференция будет проходить на базе ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ) и Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова РАН (ВИР). Предполагается 6 пленарных и более 90 устных докладов, а также более 50 постерных презентаций. Работа будет проходить по 5 симпозиумам: «Системная биология растений», «Гормональная и генетическая регуляция роста, развития и продуктивности растений», «Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений», «Современные технологии сохранения генетических ресурсов растений», «Микробиота растений». В рамках школы молодых ученых запланировано проведение 3-х круглых столов: «Системная биология растений: основные подходы и решения», «Современные методы молекулярно-генетических исследований» и «Современные методы визуализации биологических структур и физиологических процессов».

Верстка, подготовка электронного издания: Пожванов Г.А.

УДК [ ]  
ББК [ ]

© Издательство Санкт-Петербургского университета, обложка, 2016  
ISBN [ ]

# Содержание

Программа конференции.....	4
Заседания симпозиумов.....	8
Программный комитет .....	20
Локальный программный комитет.....	24
Организационный комитет .....	25
Пленарные доклады.....	26
Симпозиум 1. Системная биология растений: геномика, протеомика, метабомика, биоинформатика .....	32
Устные доклады .....	32
Стендовые доклады.....	54
Заочное участие.....	76
Симпозиум 2. Гормональная и генетическая регуляция роста, развития и продуктивности растений .....	91
Устные доклады .....	91
Стендовые доклады.....	150
Заочное участие.....	189
Симпозиум 3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений .....	216
Устные доклады .....	216
Стендовые доклады.....	261
Заочное участие.....	317
Симпозиум 4. Микробиота растений, симбиотические отношения растений с бактериями и грибами .....	362
Устные доклады .....	362
Стендовые доклады.....	390
Заочное участие.....	412
Симпозиум 5. Современные технологии сохранения генетических ресурсов растений: проблемы и перспективы.....	417
Устные доклады .....	417
Стендовые доклады.....	426
Заочное участие.....	436
Индекс авторов.....	448

# Программа конференции

## 20.06.16 (понедельник), 14<sup>00</sup>-18<sup>00</sup> – Регистрация

Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб.  
7/9, фойе перед актовым залом

## 21.06.16 (вторник)

9.00–14.00 **Регистрация:** СПбГУ, Университетская наб. 7/9, фойе перед  
актовым залом СПбГУ

14.00 **Открытие** (*актовый зал СПГУ*): член-корр. РАН Вл.В. Кузнецов,  
проф. С.С. Медведев

**Приветственное слово:** проректор СПГУ по научной работе,  
профессор С.В. Аплонов,

декан биологического факультета СПбГУ, академик РАН

И.А. Тихонович, член-корр. РАН А.Ф. Титов, проф. Н.И. Дзюбенко

### **Пленарные доклады (актовый зал СПГУ)**

**Председатели:** Кузнецов Владимир Васильевич, Тихонович Игорь  
Анатольевич

15.00-15.50 **Шишова Мария Федоровна**, *СПбГУ, Санкт-Петербург*  
Ауксиновая биология: от Ч. Дарвина до PINов и TIRов.

15.50-16.40 **Новикова Галина Викторовна**, *Институт физиологии*  
*растений имени К.А.Тимирязева РАН*

Этилен – оксид азота: разделяя неразделяемое.

17.00- 17.50 **Демидчик Вадим Викторович**, *Белорусский государственный*  
*университет, Минск*

Роль АФК-активируемых ионных каналов в регуляции физиологических  
процессов в растениях.

16.40-17.00 Кофе-брейк – (фойе 3 этажа главного здания СПбГУ)

18. 00 Фотографирование

18. 30 – 21.00 Фуршет (ВИР, ул. Большая Морская, 44 – Розовый зал)

## 22.06.16 (среда)

09.00-10.00 **Постерная сессия – симпозиум 1** (коридор главного здания СПбГУ)

### **Пленарные доклады (актовый зал СПбГУ)**

**Председатели:** Дзюбенко Николай Иванович, Медведев Сергей Семенович

10.00-10.50 **Цыганов Виктор Евгеньевич**, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург

Симбиосомы – временные клеточные органеллы микробного происхождения.

10.50-11.40 **Дзюбенко Николай Иванович**, Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург  
Современные технологии сохранения генетических ресурсов растений.

12.00-12.50 **Горшкова Татьяна Анатольевна**, Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН

Функции сложных углеводов в растениях.

11.40-12.00 Кофе-брейк (фойе 3 этажа главного здания СПбГУ)

13.00 -14.30 Обед

14.30- 17.30 **Симпозиум 1. Системная биология растений** (актовый зал СПбГУ)

15.40-16.00 Кофе-брейк (фойе 3 этажа главного здания СПбГУ)

17.30-18.30 **Постерная сессия, симпозиумы 4, 5** (коридор главного здания СПбГУ)

18.30-19.30 **Круглый стол** в рамках Школы молодых ученых:

**«Системная биология растений: основные подходы и решения»**

(аудитория 70 СПбГУ).

**Модераторы:** проф. С.С. Медведев, к.б.н. А.Л. Шаварда, к.б.н. В.А. Жуков, к.б.н. Г.А. Пожванов, Р.К. Пузанский

## 23. 06.16 (четверг)

09.00-10.00 **Постерная сессия – симпозиумы 2, 3** (коридор главного здания СПбГУ)

10.00- 13.00 **Симпозиум 2. Гормональная и генетическая регуляция роста, развития и продуктивности растений** (актовый зал СПбГУ).

10.00- 13.00 **Симпозиум 3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений** (аудитория 70 СПбГУ)

11.40-12.00 Кофе-брейк (фойе 3 этажа главного здания СПбГУ)

13.00-14.30 Обед

14.30-17.30 **Симпозиум 2. Гормональная и генетическая регуляция роста, развития и продуктивности растений** (актовый зал СПбГУ).

14.30-17.30 **Симпозиум 3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений**  
(аудитория 70 СПбГУ)

15.40-16.00 Кофе-брейк (фойе 3 этажа главного здания СПбГУ)

17.30- 18.30 **Круглый стол** в рамках школы молодых ученых:  
*«Современные методы молекулярно-генетических исследований»* и  
*«Современные методы визуализации биологических структур и физиологических процессов»* (ауд. 70 СПбГУ).

**Модераторы:** проф. Т.В. Матвеева, к.б.н. К.Н. Демченко

19.00-22.00 **Товарищеский ужин**

#### **24. 06.16 (пятница)**

- 10.00 - 13.00     **Симпозиум 4. Современные технологии сохранения генетических ресурсов растений** (ВИР, ул. Большая Морская, 44 – Помпейский зал)
- 12.05-12.25*     Кофе-брейк (ВИР, ул. Большая Морская, 44)
- 12.25 - 13.00     **Экскурсия в криохранилище растений ВИРа**
- 13.00-14.30*     Обед
- 14.30-17.30     **Симпозиум 5. Микробиота растений** (актовый зал СПбГУ)
- 15.40-16.00*     Кофе-брейк (фойе 3 этажа главного здания СПбГУ)
- 17.30-18.00     **Заседание Общества физиологов растений:** (актовый зал СПбГУ)
- 18.00-18.30     **Доклады (5 мин) и награждение победителей постерной сессии**
- 18.30-18.50     **Закрытие конференции** (актовый зал СПбГУ)

#### **25. 06.16 (суббота)**

Экскурсионная программа

#### **25. 06.16 (воскресенье)**

Отъезд

# Заседания симпозиумов

22 июня (среда)

**Симпозиум 1. Системная биология растений: геномика, протеомика, метаболомика, биоинформатика** (актовый зал СПбГУ)

**Председатели:** Новикова Галина Викторовна, Медведев Сергей Семенович

14<sup>30</sup>-15<sup>00</sup> Горина Светлана Сергеевна, *Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН*

Комплексный подход к изучению липоксигеназной сигнальной системы: от экспрессии генов к ферментам.

15<sup>00</sup>-15<sup>20</sup> Билова Татьяна Евгеньевна, *СПбГУ*

Гликированный протеом растений и его изменение в условиях абиотического стресса.

15<sup>20</sup>-15<sup>40</sup> Чернова Татьяна Евгеньевна, *Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН*

Растительные «мускулы»: эволюционные аспекты формирования.

15<sup>40</sup>-16<sup>00</sup> **Кофе-брейк**

**Председатели:** Горина Светлана Сергеевна, Чернова Татьяна Евгеньевна

16<sup>00</sup>-16<sup>15</sup> Бударин Сергей Николаевич, *Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва*

Морфофизиологические реакции тест-растений при воздействии веществ вторичного метаболизма некоторых представителей семейства Сельдерейные (Ariaceae L.).

16<sup>15</sup>-16<sup>30</sup> Мотылева Светлана Михайловна, *Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Москва*

Содержание фенольных соединений и антиоксидантная активность листьев *Prunus cerasus* L. (*Cerasus vulgaris* Mill.) в разных эколого-географических условиях.

16<sup>30</sup>-16<sup>45</sup> Осмоловская Наталия Глебовна, *СПбГУ*

Метаболомный ответ на действие Cd в надземных органах растений *Amaranthus caudatus*.



- 16<sup>45</sup>-17<sup>00</sup> Пузанский Роман Константинович, *СПбГУ*  
Сравнительный анализ динамики метаболома и транскриптома *Chlamydomonas reinhardtii* при различных трофических режимах культивирования.
- 17<sup>00</sup>-17<sup>15</sup> Огородникова Анна Владимировна, *Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН*  
Оксилипиды в корнях растений семейства *Rosaceae*.
- 17<sup>15</sup>-17<sup>30</sup> Фоменков Артем Алексеевич, *Институт физиологии растений имени К.А.Тимирязева РАН, Москва*  
Пролиферация клеток *in vitro* – нужны ли газы?
- 17<sup>30</sup>-17<sup>45</sup> Селиванова Наталья Владимировна, *Воронежский государственный университет*  
Роль фитохром-индуцируемых факторов PIF1 и PIF3 в регуляции экспрессии генов каталитического димера сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы.
- 17<sup>45</sup>-18<sup>00</sup> Галибина Наталья Алексеевна, *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса Карельского научного центра РАН, Петрозаводск*  
Аномальный морфогенез камбиальной зоны карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica*).

23 июня (четверг)

**Симпозиум 2. Гормональная и генетическая регуляция роста, развития и продуктивности растений (актовый зал СПбГУ)**

**Председатели:** Кузнецов Виктор Васильевич, Чесноков Юрий Валентинович

- $10^{00}-10^{15}$  Артемьева Анна Майевна, *ВИР, Санкт-Петербург*  
Ассоциативное картирование хромосомных локусов, определяющих содержание свободных аминокислот у культур стержневой коллекции *Brassica rapa* L. ВИР в контролируемых условиях.
- $10^{15}-10^{30}$  Бабак Ольга Геннадьевна, *Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск*  
Генетическая регуляция накопления каротиноидов в плодах томата.
- $10^{30}-10^{45}$  Касаткин Михаил Юрьевич, *Саратовский национальный исследовательский государственный университет*  
Световая модуляция морфогенеза проростков пшеницы.
- $10^{45}-11^{00}$  Новицкая Людмила Людвиговна, *Институт леса Карельского научного центра РАН, Петрозаводск*  
Гормональная и генетическая регуляция дифференцировки структурных элементов древесины карельской березы.
- $11^{00}-11^{15}$  Обручева Наталья Владимировна, *Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва*  
Физиологическая стратегия рекальцитрантных семян.
- $11^{15}-11^{25}$  Битаршвили София Валерьяновна, *Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск*  
Изучение содержания ауксинов, цитокинина и абсцизовой кислоты в динамике прорастания семян ячменя после гамма-облучения малыми дозами.
- $11^{25}-11^{35}$  Чэнь Тинчжо, *СПбГУ*  
Изменение активности протонной АТФазы тонопласта на транскрипционном уровне в ходе роста растяжением клеток табака суспензионной культуры *VBI-0*
- $11^{35}-11^{45}$  Кирпичникова Анастасия Алексеевна, *СПбГУ*  
Изменение гидролитической и транспортной функций протонной АТФазы плазмалеммы в ходе роста растяжением клеток табака суспензионной культуры *VBI-0*.

## 11<sup>45</sup>-12<sup>00</sup> Кофе-брейк

**Председатели:** Войцеховская Ольга Владимировна, Чиков Владимир Иванович

- 12<sup>00</sup>-12<sup>15</sup> Войцеховская Ольга Владимировна, *Ботанический институт им. В.Л.Комарова РАН, Санкт-Петербург*  
Индукция автофагии в клетках мезофилла мутантов *chlorina* с нестабильной фотосинтетической антенной.
- 12<sup>15</sup>-12<sup>30</sup> Чиков Владимир Иванович, *Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН*  
Донорно-акцепторные отношения и регуляция фотосинтеза в системе целого растения.
- 12<sup>30</sup>-12<sup>45</sup> Смоликова Галина Николаевна, *СПбГУ*  
Фотохимическая активность семян *Pisum sativum L.* с желтой и зеленой окраской.
- 12<sup>45</sup>-13<sup>00</sup> Ветчинникова Лидия Васильевна, *Институт леса Карельского научного центра РАН, Петрозаводск*  
Влияние цитокинина на физиолого-биохимические показатели карельской березы *in vitro*.

## 13<sup>00</sup>-14<sup>30</sup> Обед

**Председатели:** Лутова Людмила Алексеевна, Демченко Кирилл Николаевич

- 14<sup>30</sup>-14<sup>55</sup> Лутова Людмила Алексеевна  
Роль транскрипционных факторов в формировании нерегулярных меристем.
- 14<sup>55</sup>-15<sup>10</sup> Ильина Елена Леонидовна, *Ботанический институт им .В.Л.Комарова РАН, Санкт-Петербург*  
Изучение роли отдельных транскрипционных факторов в генетическом контроле инициации бокового корня у кабачка.
- 15<sup>10</sup>-15<sup>25</sup> Киселев Константин Вадимович, *Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток*  
Регуляция биосинтеза резвератрола в культурах клеток винограда *Vitis amurensis RUPR.* с помощью генов кальций-зависимых протеинкиназ.
- 15<sup>25</sup>-15<sup>40</sup> Дубровина Александра Сергеевна, *Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток*  
Влияние сверхэкспрессии полноразмерных и сплайсированных вариантов мРНК генов *СРК3а* и *СРК9* на

рост, продукцию стилибенов и устойчивость к стрессам клеток *Vitis amurensis* Rupr.

### 15<sup>40</sup>-16<sup>00</sup> Кофе-брейк

**Председатели:** Шпаковский Георгий Вячеславович, Степанов Сергей Александрович

16<sup>00</sup>-16<sup>15</sup> Шпаковский Георгий Вячеславович, *Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва*

Прогестерон как эндогенный регулятор роста, развития и продуктивности растений.

16<sup>15</sup>-16<sup>30</sup> Степанов Сергей Александрович, *Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского*

Фитомерный принцип регуляции гомеостаза пшеницы.

16<sup>40</sup>-16<sup>50</sup> Суслов Дмитрий Владимирович, *СПбГУ*

Новые способы оценки растяжимости клеточных стенок методом крипа, предсказывающие скорость роста растительных клеток.

16<sup>50</sup>-17<sup>00</sup> Творогова Варвара Евгеньевна, *СПбГУ*

Гены *WOX* и *PIN* в соматическом эмбриогенезе у *Medicago truncatula*.

17<sup>00</sup>-17<sup>10</sup> Пожванов Григорий Александрович, *СПбГУ*

Этилен вовлечён в реорганизацию актинового цитоскелета в ходе гравитропической реакции корней *Arabidopsis thaliana*.

17<sup>10</sup>-17<sup>20</sup> Мякушина Юлия Александровна, *Институт физиологии растений имени К.А.Тимирязева РАН, Москва*

Гены рецепции и трансдукции цитокининового сигнала у картофеля *Solanum tuberosum*.

17<sup>20</sup>-17<sup>30</sup> Ханды Мария Терентьевна, *МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

Влияние синтетических ауксинов на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионных культур клеток якорцев стелющихся и пажитника греческого.

23 июня (четверг)

**Симпозиум 3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений (СПбГУ, аудитория 70)**

**Председатели:** Креславский Владимир Данилович, Лукаткин Александр Степанович

- $10^{00}-10^{20}$  Креславский Владимир Данилович, *Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пуццино-на Оке*  
Роль фитохромной системы в регуляции фотосинтетических процессов.
- $10^{20}-10^{40}$  Ведяшкина Ольга Александровна, Лукаткин Александр Степанович, *Мордовский государственный университет, Саранск*  
Регуляция роста и стрессоустойчивости растений и клеточных культур экзогенными аналогами гормонов.
- $10^{40}-11^{00}$  Залуцкая Жаннета Михайловна, *СПбГУ*  
Альтернативная оксидаза 1 *Chlamydomonas reinhardtii*: регуляция в стрессовых условиях.
- $11^{00}-11^{15}$  Синькевич Максим Сергеевич, *Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва*  
Антиоксидантная система растений арабидопсиса при закаливании к холоду.
- $11^{15}-11^{30}$  Любимов Владимир Юрьевич, *Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пуццино-на Оке*  
Фитохром-В-зависимое переключение энергетики клетки с темного дыхания на фотосинтетическое восстановление углерода.
- $11^{30}-11^{40}$  Бессолицына Елена Константиновна, *Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Москва*  
Изменение экспрессии генов ферментов липоксигеназного каскада растений разных таксонов в различных условиях.

**11<sup>40</sup>-12<sup>00</sup> Кофе-брейк**

**Председатели:** Мошков Игорь Евгеньевич, Емельянов  
Владислав Владимирович

- 12<sup>00</sup>-12<sup>10</sup> Игнатенко Анна Анатольевна, *Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск*  
Роль низкомолекулярных протекторов в процессе повышения устойчивости растений пшеницы к низкотемпературным воздействиям разной интенсивности.
- 12<sup>10</sup>-12<sup>20</sup> Казакова Елизавета Александровна, *Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск*  
Оценка изоферментного полиморфизма и антиоксидантного статуса хронически облучаемых популяций сосны обыкновенной.
- 12<sup>20</sup>-12<sup>30</sup> Никерова Ксения Михайловна, *Институт леса Карельского научного центра РАН, Петрозаводск*  
Донорно-акцепторные отношения листового аппарата и тканей ствола у разных форм березы повислой (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* и var. *carelica* (Mercklin)
- 12<sup>30</sup>-12<sup>40</sup> Неделеяева Ольга Игоревна, *Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва*  
Функциональная роль белка CLCe *Arabidopsis thaliana* (L.) Neuhf в светозависимом закислении люмена тилакоидов.
- 12<sup>40</sup>-12<sup>50</sup> Огнева Злата Владимировна, *Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток*  
Изменение уровня метилирования ДНК и экспрессии генов метилтрансфераз и деметилаз при старении растений *Arabidopsis thaliana*.
- 12<sup>50</sup>-13<sup>00</sup> Нилова Ирина Александровна, *Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск*  
Изменение содержания транскриптов генов *TaHSP70*, *TaHSP90* и *BI-1* в листьях проростков пшеницы при действии высоких температур.

**13<sup>00</sup>-14<sup>30</sup> Обед**

**Председатели:** Чиркова Тамара Васильевна, Минибаева Фарида Вилевна

- 14<sup>30</sup>-14<sup>50</sup> Емельянов Владислав Владимирович, *СПбГУ*  
Пути приспособления растений к недостатку кислорода и последующему окислительному стрессу.
- 14<sup>50</sup>-15<sup>10</sup> Минибаева Фарида Вилевна, *Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН*  
Роль растительных пероксидаз в метаболизме и сигналинге активных форм азота.
- 15<sup>10</sup>-15<sup>30</sup> Баташева Светлана Николаевна, *Казанский институт биохимии и биофизики РАН*  
Участие азотного метаболизма в ответной реакции растений на изменение уровня освещенности.
- 15<sup>30</sup>-15<sup>40</sup> Клушевская Елена Сергеевна, *Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, Воронеж*  
Изменение нормы реакции физиолого-биохимических параметров при исследовании устойчивости сосны обыкновенной к техногенному стрессу.

#### 15<sup>40</sup>-16<sup>00</sup> Кофе-брейк

**Председатели:** Головкин Тамара Константиновна, Попова Лариса Геннадьевна

- 16<sup>00</sup>-16<sup>20</sup> Кудоярова Гузель Радомесовна, *Уфимский институт биологии РАН*  
Роль рецептора нитратов в регуляции содержания цитокининов и роста корней растений арабидопсиса
- 16<sup>20</sup>-16<sup>40</sup> Попова Лариса Геннадьевна, *Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва*  
Na<sup>+</sup>-транспортирующие АТФазы водорослей.
- 16<sup>40</sup>-16<sup>55</sup> Тюнин Алексей Петрович, *Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток*  
Изменение уровня цитозинового метилирования в составе генов биосинтеза стильбенов в клетках винограда *Vitis amurensis* Rupr. под действием ультрафиолета.
- 16<sup>55</sup>-17<sup>10</sup> Горшков Владимир Юрьевич, *Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН*  
Физиологическая гетерогенность клеток пектобактерий при взаимодействии с растениями.

- 17<sup>10</sup>-17<sup>20</sup> Рогожин Евгений Александрович, *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*  
Семейство антимикробных гевеино-подобных пептидов WAMP представляет собой новый структурный тип ингибиторов секретлируемых протеаз мицеллиальных грибов.
- 17<sup>20</sup>-17<sup>30</sup> Комарова Анна Владимировна, *Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова*  
Участие кислорода в ответной реакции на механический стресс клеток *Chara corallina*.
- 17<sup>30</sup>-17<sup>40</sup> Супрун Андрей Романович, *Дальневосточный федеральный университет, Владивосток*  
Структура и экспрессия генов стильбен синтаз у ели аянской *Picea jezoensis* (Sieb. et Zucc.)



24 июня (пятница)

**Симпозиум 4. Современные технологии сохранения генетических ресурсов растений: проблемы и перспективы**

*на базе Федерального исследовательского центра Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР)  
ул. Большая Морская, 44 - Помпейский зал*

**Председатели:** Дзюбенко Николай Иванович, Филипенко Галина Ивановна

10<sup>00</sup>-10<sup>20</sup>

Филипенко Галина Ивановна, *ВИР им. Н.И Вавилова, Санкт-Петербург*

Совершенствование технологий сохранения семенных коллекций в ВИР: ультрасухие семена и методика ускоренного старения.

10<sup>20</sup>-10<sup>40</sup>

Смоликова Галина Николаевна, *СПбГУ*

Механизмы повреждения семян при ускоренном старении.

10<sup>40</sup>-11<sup>00</sup>

Гавриленко Татьяна Андреевна, *ВИР им. Н.И Вавилова, Санкт-Петербург*

Использование методов биотехнологии для сохранения генетических ресурсов вегетативно размножаемых культурных растений в контролируемых условиях среды.

11<sup>00</sup>-11<sup>20</sup>

Гончарова Эльза Андреевна, *ВИР им. Н.И Вавилова, Санкт-Петербург*

Репродуктивная физиология культурных растений (эколого-генетические основы плодоношения и селекции).

11<sup>20</sup>-11<sup>35</sup>

Вержук Владимир Георгиевич, *ВИР им. Н.И Вавилова, Санкт-Петербург*

Разработка и использование современных технологий сохранения генофонда плодовых и ягодных культур ВИР с помощью методов криоконсервации растений.

11<sup>35</sup>-11<sup>50</sup>

Чернов Владимир Евгеньевич, *ВИР им. Н.И Вавилова, Санкт-Петербург*

Дикорастущие виды *Hordeum*: сохранение и физиологическая идентификация.

11<sup>50</sup>-12<sup>05</sup>

Ухатова Юлия Васильевна, *ВИР им. Н.И Вавилова, Санкт-Петербург*

Сохранение генетического разнообразия представителей рода *Rubus* в ВИРе в условиях *in vitro* и в условиях сверхнизких температур.

**12<sup>05</sup>-12<sup>25</sup> Кофе-брейк**

**12<sup>25</sup>-13<sup>00</sup> Экскурсия в криохранилище ВИР**

группами не более 20 человек, запись при регистрации

**13<sup>00</sup>-14<sup>30</sup> Обед**

### **Симпозиум 5. Микробиота растений (актовый зал СПбГУ)**

**Председатели:** Тихонович Игорь Анатольевич, Цыганов Виктор Евгеньевич

*14<sup>30</sup>-14<sup>45</sup>*

Бухарина Ирина Леонидовна, *Удмуртский государственный университет, Ижевск*

Исследование пределов устойчивости микроскопических грибов и формирование коллекции перспективных изолятов.

*14<sup>45</sup>-15<sup>00</sup>*

Штарк Оксана Юрьевна, *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург*

Развитие арбускулярной микоризы у не формирующих клубеньки мутантов гороха по генам – предполагаемым ортологам генов транскрипционных факторов NSP1 и NSP2.

*15<sup>00</sup>-15<sup>15</sup>*

Цыганова Анна Викторовна, *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург*

Развитие инфекционной нити в зрелом симбиотическом клубеньке.

*15<sup>15</sup>-15<sup>30</sup>*

Веселова Светлана Викторовна, *Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН*

Роль фитогормонов в развитии защитных реакций растений пшеницы при грибном патогенезе.

*15<sup>30</sup>-15<sup>40</sup>*

Маркова Оксана Вячеславовна, *Башкирский государственный университет, Уфа*

Экологическая и микробиологическая характеристика штаммов эндофитных бактерий, выделенных из клубеньков фасоли.

**15<sup>40</sup>-16<sup>00</sup> Кофе-брейк**

**Председатели:** Штарк Оксана Юрьевна, Цыганова Анна Викторовна

- 16<sup>00</sup>-16<sup>15</sup> Гарипова Светлана Равилевна, *Башкирский государственный университет, Уфа*  
Изучение межмикробных и микробно-растительных взаимоотношений бактериальных эндофитов бобовых растений.
- 16<sup>15</sup>-16<sup>30</sup> Душков Владимир Юрьевич, *Институт химической физики им. Н.Н. Семенова, Москва*  
Опосредованное управление самоорганизацией биоты макро- и микромицетов в искусственных лесных биогеоценозах.
- 16<sup>30</sup>-16<sup>40</sup> Шелякин Михаил Анатольевич, *Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар*  
Функциональное взаимодействие автотрофного и гетеротрофного компонентов лишайников как устойчивой симбиотической системы при действии стресс факторов.
- 16<sup>40</sup>-16<sup>50</sup> Иванова Кира Андреевна, *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург*  
Роль низкомолекулярных тиолов при формировании эффективного и неэффективного бобово-ризобияльного симбиоза.
- 16<sup>50</sup>-17<sup>00</sup> Серова Татьяна Александровна, *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург*  
Анализ экспрессии маркерных «генов старения» и локализации гиббереллинов в симбиотических клубеньках гороха (*Pisum sativum* L.).
- 17<sup>00</sup>-17<sup>10</sup> Юрков Андрей Павлович, *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург*  
Симбиотические отношения *Medicago lupulina* с грибами арбускулярной микоризы.
- 17<sup>10</sup>-17<sup>20</sup> Демина Ольга Сергеевна, *Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва*  
Роль корневых выделений в ризосфере растений.
- 17<sup>20</sup>-17<sup>30</sup> Валиулина Альбина Фаритовна, *Сибирский федеральный университет, Красноярск*  
Взаимодействие С<sub>4</sub>-растений с грибами рода *Trichoderma*.

# Программный комитет

**Кузнецов Владимир Васильевич**, член-корреспондент РАН, профессор  
Сопредседатель, директор Института физиологии растений РАН  
(Москва)

**Медведев Сергей Семенович**, доктор биологических наук, профессор  
Сопредседатель, Санкт-Петербургский государственный  
университет (Санкт-Петербург)

**Дзюбенко Николай Иванович**, доктор биологических наук, профессор  
Сопредседатель, директор Всероссийского института  
растениеводства РАН (Санкт-Петербург)

**Шишова Мария Федоровна**, доктор биологических наук, профессор  
Зам председателя, Санкт-Петербургский государственный  
университет (Санкт-Петербург)

**Зарипова Нелли Раилевна**, кандидат биологических наук,  
Ученый секретарь, Институт физиологии растений РАН (Москва)

**Бахтенко Елена Юрьевна**, доктор биологических наук, профессор, зав.  
кафедрой ботаники Вологодского государственного университета (Вологда)

**Веселов Александр Павлович**, доктор биологических наук, профессор,  
заведующий кафедрой биохимии и физиологии Нижегородского  
государственного университета, (Нижний Новгород)

**Войников Виктор Кириллович**, доктор биологических наук, профессор,  
директор Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН,  
(Иркутск)

**Гаевская Елена Ивановна**, кандидат биологических наук, заместитель  
директора Всероссийского института растениеводства РАН, (Санкт-  
Петербург)

**Гавриленко Татьяна Андреевна**, доктор биологических наук, профессор,  
заведующая отделом биотехнологии Всероссийского института  
растениеводства РАН, (Санкт-Петербург)

**Головко Тамара Константиновна**, доктор биологических наук, профессор,  
зав. лабораторией экологической физиологии растений Института биологии  
Коми научного центра Уральского отделения РАН, (Сыктывкар)

**Гончарова Эльза Андреевна**, доктор биологических наук, профессор,  
Всероссийский институт растениеводства РАН, (Санкт-Петербург)

**Горшкова Татьяна Анатольевна**, доктор биологических наук, профессор,  
зав. лабораторией механизмов роста растительных клеток Казанского  
института биохимии и биофизики КазНЦ РАН, (Казань)

**Гречкин Александр Николаевич**, академик РАН, доктор биологических наук, профессор директор Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН, (Казань)

**Демидчик Вадим Викторович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений Белорусский государственный университет, (Минск)

**Ермаков Игорь Павлович**, доктор биологических наук, профессор, Московский государственный университет, (Москва)

**Жиров Владимир Константинович**, член-корреспондент РАН директор Полярного-альпийского ботанического сада Кольского научного центра РАН, (Апатиты)

**Журавлев Юрий Николаевич**, академик РАН, директор Биолого–почвенного института Дальневосточного отделения РАН (Владивосток)

**Киселева Ирина Сергеевна**, кандидат биологических наук, заведующая кафедрой физиологии и биохимии растений Уральского федерального университета, (Екатеринбург)

**Кондратьев Михаил Николаевич**, доктор биологических наук, профессор, Российский государственный аграрный университет -МСХА, (Москва)

**Кузнецов Виктор Васильевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией экспрессии генома растений Института физиологии растений РАН, (Москва)

**Лось Дмитрий Анатольевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярных основ внутриклеточной регуляции Института физиологии растений РАН, (Москва)

**Лукаткин Александр Степанович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой ботаники и физиологии растений, Национального исследовательского Мордовского государственного университета, (Саранск)

**Лутова Людмила Алексеевна**, доктор биологических наук, профессор, Санкт-Петербургский государственный университет, (Санкт-Петербург)

**Максимов Трофим Христофорович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биогеохимических циклов мерзлотных систем Института биологических проблем криолитозоны СО РАН, (Якутск)

**Марковская Евгения Федоровна**, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой ботаники и физиологии растений Петрозаводского государственного университета, (Петрозаводск)

**Мошков Игорь Евгеньевич**, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе Института физиологии растений РАН, (Москва)

**Новикова Галина Викторовна**, доктор биологических наук, Институт физиологии растений РАН (Москва)

**Носов Александр Михайлович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии растений Московского государственного университета, зав. отделом биологии клетки и биотехнологии Институт физиологии растений РАН, (Москва)

**Романов Георгий Александрович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией сигнальных систем контроля онтогенеза им. акад. М.Х. Чайлахяна Института физиологии растений РАН, (Москва)

**Роньжина Елена Степановна**, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой агрономии Калининградского государственного технического университета, (Калининград)

**Саляев Рюрик Константинович**, член-корреспондент РАН, заведующий отделом клеточной биологии и инженерии Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск)

**Соколов Олег Игоревич**, доктор биологических наук, зав. лабораторией физиологии растительной клетки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, (Саратов)

**Тараканов Иван Германович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии растений Российского государственного аграрного университета – МСХА, (Москва)

**Тарчевский Игорь Анатольевич**, академик РАН, доктор биологических наук, профессор, советник РАН, главный научный сотрудник, заведующий группой белкового метаболизма Казанского Института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (Казань)

**Титов Александр Федорович**, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, председатель Карельского научного центра РАН, руководитель лаборатории экологической физиологии растений Института биологии КарНЦ РАН, заведующий кафедрой биологии и методики обучения Петрозаводского государственного университета (Петрозаводск)

**Тихомиров Александр Аполлинарьевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией управления биосинтезом фототрофов Института биофизики Сибирского отделения РАН, (Красноярск)

**Тихонович Игорь Анатольевич**, академик РАН, доктор биологических наук, профессор директор Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии, (Санкт-Петербург)

**Хрянин Виктор Николаевич**, доктор биологических наук, профессор, Пензенский государственный университет, (Пенза)

**Шакирова Фарид Миннихановна**, доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом Физиологии растений Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, (Уфа)

**Усманов Искандер Юсуфович**, доктор биологических наук, профессор,  
Башкирский государственный университет, (Уфа)

**Цыдендамбаев Владимир Дылыкович**, кандидат биологических наук, ,  
заместитель директора по научной работе регуляции Института физиологии  
растений РАН, (Москва)

## Локальный программный комитет

- Медведев Сергей Семёнович**, д.б.н., профессор, СПбГУ - председатель  
**Шишова Мария Фёдоровна**, д.б.н., профессор, СПбГУ - зам. председателя  
**Билова Татьяна Евгеньевна**, к.б.н., ассистент, СПбГУ  
**Войцеховская Ольга Владимировна**, к.б.н., Ботанический институт РАН (БИН)  
**Гавриленко Татьяна Андреевна**, д.б.н., профессор, Всероссийский институт растениеводства РАН, (ВИР)  
**Гаевская Елена Ивановна**, к.б.н., зам директора по научной работе, Всероссийский институт растениеводства РАН, (ВИР)  
**Гончарова Эльза Андреевна**, профессор, Всероссийский институт растениеводства РАН, (ВИР)  
**Демченко Кирилл Николаевич**, к.б.н., Ботанический институт РАН, (БИН)  
**Емельянов Владислав Владимирович**, к.б.н., СПбГУ  
**Осмоловская Наталья Глебовна**, к.б.н., СПбГУ  
**Пожванов Григорий Александрович**, к.б.н., ассистент, СПбГУ  
**Пузанский Роман Константинович**, младший научный сотрудник, СПбГУ  
**Романюк Дарья Андреевна**, к.б.н., научный сотрудник, СПбГУ  
**Смоликова Галина Николаевна**, к.б.н., доцент, СПбГУ  
**Тараховская Елена Роллановна**, к.б.н., доцент, СПбГУ  
**Цыганов Виктор Евгеньевич**, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, (ВНИИСХМ)  
**Чесноков Юрий Валентинович**, д.б.н., Всероссийский институт растениеводства РАН, (ВИР)  
**Чиркова Тамара Васильевна**, д.б.н., профессор, СПбГУ  
**Шарова Елена Игоревна**, к.б.н., доцент, СПбГУ  
**Липчинский Андрей Анатольевич**, инженер-исследователь, СПбГУ  
**Шевцов Юрий Иванович**, инженер-исследователь, СПбГУ  
**Банкин Михаил**, аспирант  
**Нюкалова Мария**, аспирант  
**Ильин Александр**, студент  
**Мильруд Светлана**, студент  
**Романова Александра**, студент  
**Чанцева Вероника**, лаборант



# Организационный комитет

Председатель:

**Наталья Петровна Несмеянова**, начальник Управления по организации публичных мероприятий и сотрудничества с партнерами

Члены Оргкомитета:

**Давыдова Т.А.**, Главный специалист Управления научных исследований

**Жамойдо А.Б.**, И.о. начальника Управления-службы информационных технологий

**Дацкевич Ю.Вл.**, Заместитель главного инженера

## Пленарные доклады

Ауксиновая биология: от Ч. Дарвина до PINов и TIRов

Auxin biology: from Ch.Darvin to PINs and TIRs

Шишова М.Ф.

Санкт-Петербургский Государственный Университет, Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д.7-9

+79219036777, [mshishova@mail.ru](mailto:mshishova@mail.ru)

Многообразие морфофизиологических реакций, вызываемых фитогормоном ауксином определяется как на транскрипционном, так и посттрансляционном уровне. Восприятие гормонального сигнала осуществляется при участии ядерного рецептора TIR1, приводящего к инициации трансдукционного каскада и последующей активации экспрессии ранних ауксин-зависимых генов. Этот трансдукционный каскад подразумевает участие убиквитин-лигазной системы. Нарушение кодирования одного из ее компонентов белка AXR1 приводит не только к нарушению чувствительности к ауксину, но и к изменению концентрации фитогормона в тканях в результате изменения интенсивности его синтеза, а также модуляции числа переносчиков PIN на плазмалемме. Нельзя не рассмотреть еще один трансдукционный каскад, начинающийся при участии AVP1. Возможная рецепторная роль этого белка неоднократно подвергалась ревизии, однако большое число экспериментальных данных подтверждает физиологическую значимость этого белка в механизме действия ауксина.

Этилен – оксид азота: разделяя неразделяемое

Ethylene – Nitric Oxide: Separating the Inseparable

Новикова Г.В., Мошков И.Е.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, ул. Ботаническая, дом 35, 127276, Москва, РФ

+7 499 231-83-68, +7 499 977-80-18, [gv.novikova@mail.ru](mailto:gv.novikova@mail.ru)

Одна из самых актуальных задач современной физиологии растений – исследование проблемы взаимодействия (cross-talk) между разными фитогормонами и регуляторами роста. Имеется в виду не химическое взаимодействие этих веществ, а взаимное влияние на синтез, транспорт, деградацию, модификацию белков, функционирующих в путях передачи сигналов, а также влияние на эффекторы, как правило, факторы транскрипции, путей передачи соответствующего сигнала. Какие молекулярные механизмы обеспечивают взаимодействие этилена и NO?

Известно, что в результате работы цикла Янга образуется S-аденозилметионин, донирующий метильные группы, которые необходимы

для продукции ряда метаболитов, включая этилен. Показано, что NO-зависимое S-нитрозилирование аминокислотного остатка Цис в сайте активации метионин-аденозил-трансферазы1 (MAT1, At1g02500) ведёт к снижению энзиматической активности MAT1, в результате чего продукция этилена падает.

Установлено, что мономерные ГТФ-связывающие белки (мГТФазы) участвуют в передаче сигнала этилена. Могут ли мГТФазы вовлекаться и в передачу сигнала NO? При помощи протеомного подхода мы показали, что в листьях растений *Arabidopsis thaliana* имеется группа мГТФаз, активируемых и этиленом, и NO. Кластерный анализ этих мГТФаз показал, что ГТФ-связывающие белки можно разделить на две группы: мГТФазы, активируемые как этиленом, так и NO, а также мГТФазы, которые дифференциально активируются изучаемыми газами. Рассматривая мГТФазы, активируемые обоими газами, можно заключить, что различия состоят не столько в наборе этих белков, сколько в уровне их активации. С другой стороны, такой результат может быть следствием влияния NO на синтез этилена, а именно: обработка донором NO ведёт к увеличению продукции этилена, который влияет на ГТФ-связывающую активность. То есть, в этом случае степень активации этих мГТФаз NO может либо снижаться, либо не выявляться вовсе. Вместе с тем, некоторые белки проявляли «предпочтение» либо к этилену, либо к NO. Следовательно, можно допустить, что каждый из газов может иметь «собственный» набор белков, ГТФ-связывающую активность которых они могут регулировать.

Малые ГТФазы подвергаются NO-зависимым посттрансляционным модификациям, в частности, S-нитрозилированию. В результате изменяется их локализация внутри клетки, а также ГТФ-связывающая активность. Модификация NO аминокислотного остатка Цис в C-концевой части инактивирует мГТФазу, которая, оставаясь в цитозоле, теряет способность передавать сигнал. Связывание ГТФ мГТФазами может изменяться также вследствие модификации Цис в мотиве NKCD, что влияет на взаимодействие мГТФазы с GEF.

В путях передачи сигналов мГТФазы работают выше протеинкиназ, в частности, МАПК. Способен ли NO вмешиваться в работу МАПК, участвующих в синтезе этилена или передаче его сигнала? В литературе имеются данные о влиянии NO на активность МАПК ERK1/2, аналогами которых является 12 из 23 МАПК *A. thaliana*. Мы выяснили, что нитрирование ингибирует ферментативную активность МАПК AtMPK3/4/6, но увеличивает их способность активироваться МАПКК AtMKK1. То есть, нитрирование происходит не в сайте фосфорилирования AtMPK3/4/6. S-Нитрозилирование не изменяет активность AtМАПК3/4/6, тогда как ферментативная активность AtMKK1 существенно снижается. Более того, S-нитрозилирование нарушает способность AtМАПК4/6 активироваться AtMKK1.

Таким образом, мы показали NO-зависимые изменения как ферментативной активности белков МАПК, так и способности МАПКК фосфорилировать МАПК *in vitro*. Эти сведения свидетельствуют, во-первых, о принципиальной возможности NO-зависимых посттрансляционных модификаций МАПК,

которые вовлечены в синтез этилена и передачу его сигнала. Во-вторых, указывают, что интервенция NO в передачу сигнала этилена может осуществляться путём вмешательства в работу МАПК, функционирующих в составе МАПК модуля на разных уровнях.

Поскольку в отличие от этилена NO выполняет функцию вторичного сигнала, крайне важно упомянуть о белках, которые могут выполнять функции сенсоров NO. Сейчас имеются данные о том, что у *A. thaliana* в основе механизма восприятия NO может лежать осуществляемая по правилу N-конца избирательная деградация факторов транскрипции ERF седьмой группы. Белки ERF седьмой группы *A. thaliana* характеризуются наличием консервативного N-концевого домена, включающего Met-Цис. В отсутствие NO эти факторы транскрипции стабильны. В присутствии NO происходит S-нитрозилирование ERF по аминокислотному остатку Цис, который становится доступным для убиквитинирования, что ведёт к деградации ERF. В результате таких изменений, NO влияет на экспрессию ERF-зависимых генов. Насколько универсальным окажется этот механизм, покажет время, но можно не сомневаться, что эти новые данные будут способствовать решению вопроса о самых ранних событиях, происходящих у растений в ответ на действие NO. Работа выполняется при частичной поддержке грантов РФФИ (№ 14-24-00020) и РФФИ (№ 14-04-00333).

## Симбиосомы – временные клеточные органеллы микробного происхождения

Symbiosomes, temporary cell organelles of microbial origin

Цыганов В.Е.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной  
микробиологии Российской академии наук, 196608, ш. Подбельского, 3, г.  
Пушкин 8, г. Санкт-Петербург, Россия  
+7 812 476-16-01, [tsyganov@arriam.spb.ru](mailto:tsyganov@arriam.spb.ru)

В основе бобово-ризобияльного симбиоза лежит взаимодействие бобовых растений с почвенными бактериями порядка *Rhizobiales* – ризобиями. В результате симбиотического взаимодействия на корнях бобовых растений формируются азотфиксирующие клубеньки. Для размещения бактерий в клубеньке формируются специализированные инфицированные клетки, которые в результате эндоредупликации увеличиваются в размерах и способны дать приют тысячам бактерий. Необходимо отметить, что бактерии остаются изолированными от цитоплазмы растительной клетки мембраной растительного происхождения с включениями бактериальных белков – симбиосомной мембраной. При этом они дифференцируются в специализированную для азотфиксации форму – бактериоды, которые вместе с окружающей их симбиосомной мембраной, формируют симбиосомы.

Развитие симбиосом зависит от клубенек-специфичного пути секреции. Так, мутант *Medicago truncatula dnf1*, мутация в котором приводит к формированию дефектного комплекса сигнальной пептидазы, ответственной за отщепление сигнальных пептидов в эндоплазматическом ретикулуме и доставку растительных полипептидов к симбиосомам, формирует неэффективные клубеньки с инфицированными клетками, содержащими недифференцированные бактериоиды. Для бобовых, принадлежащих к кладе IRLC (Inverted Repeat-Lacking Clade), таких как горох, люцерна, вика, характерны ярко выраженные морфологические изменения бактериоидов, сопровождаемые амплификацией генома при их дифференцировке, которая необратима и приводит к потере бактериоидами способности к делению. У других бобовых, таких как *Lotus japonicus*, бактериоиды сохраняют свой нормальный размер, размер генома и репродуктивную способность. Было предположено, что необратимая дифференцировка бактериоидов опосредуется действием клубенек-специфичных цистеин-богатых пептидов (NCR пептидов). NCR пептиды бобовых растений сходны с группой антимикробных пептидов – эффекторов врожденного иммунитета как у растений, так и у животных. Со стороны ризобий в необратимой дифференцировке бактериоидов важную роль играет белок VasA, который, вероятно, участвует в изменении состава симбиосомной мембраны, обеспечивая слияние секреторных везикул, содержащих NCR пептиды, с симбиосомами либо модифицирует клеточную оболочку, меняя восприимчивость бактерий к NCR пептидам.

На поздних стадиях развития симбиосомная мембрана приобретает маркеры, свойственные для тонопласта и эндосом, включая малую ГТФазу Rab7 и вакуолярный белок семейства SNARE, участвующий в слиянии мембран. Симбиосомы имеют некоторые свойства вакуоли, но они не сливаются с вакуолью в инфицированных клетках. Недавно было показано, что в инфицированных клетках во время созревания симбиосом происходят изменения в развитии вакуоли. Так была показана супрессия экспрессии генов *VPS11* и *VPS39*, кодирующих члены семейства белков HOPS комплекса (for homotypic fusion and vacuole protein sorting complex), вовлеченного в формирование вакуоли и определяющего правильность слияния мембран с вакуолью. Это ведет к сокращению вакуоли и позволяет экспансию симбиосом. В инфицированных клетках также изменен транспорт белков к тонопласту, так, например, аквапорин TIP1g из мембраны тонопласта перемещается в симбиосомную мембрану.

Зрелая симбиосома состоит из 3 различных компонентов: симбиосомной мембраны, симбиосомного пространства и бактериоида. Каждый из этих компонентов проходит различные стадии дифференцировки. Наиболее сильно дифференцировка выражена для бактериоидов, которые входят в инфекционную нить как почвенные сапрофиты и дифференцируются в азотфиксирующие неспособные к размножению бактериоиды. Транскриптомный анализ показал, что примерно одна треть ризобияльного генома участвует в становлении и поддержании симбиоза с бобовым растением. Среди этих генов, активирующихся во время формирования и функционирования симбиосом, присутствуют гены, кодирующие нитрогеназу

и поддерживающие сопутствующие метаболические активности, в то же время большое количество выявленных генов кодируют белки, которые идентифицированы как неизвестные, или с гипотетической функцией, что указывает на необходимость проведения дальнейших исследований изучения механизмов функционирования симбиосом.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (16-16-10035).

## Функции сложных углеводов в растениях

### Functions of complex carbohydrates in plants

Горшкова Т.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, 420111, Лобачевского 2/31, Казань, Россия

+7 843 292-53-32, +7 843 292-73-47, [gorshkova@kibb.knc.ru](mailto:gorshkova@kibb.knc.ru)

Высшие растения – безусловные чемпионы по созданию и использованию сложных и разнообразных углеводов. Растение «умеет» формировать и использовать сложные разветвленные полисахариды нерегулярного строения, специализированные под выполнение различных функций. Именно благодаря растениям, углеводы – класс соединений, наиболее широко представленных в биосфере. Основная масса углеводов сосредоточена в клеточных стенках растений.

Клеточная стенка – особая структура для растительного организма. В ходе эволюции она сформировалась после приобретения способности к фотосинтезу, в результате функционирования которого появилась необходимость выведения (связывания) части метаболически и осмотически активных моносахаридов, образующихся на свету. Эта задача была решена путем иммобилизации моносахаридов в относительно инертные полисахариды и отложение их за пределами плазмалеммы. Формирование своеобразного скелета из полисахаридов вокруг каждой растительной клетки во многом определило особенности биологии растений, в частности в таких процессах как рост, морфогенез, передача сигнала. Более того, эти процессы в растительном организме во многом базируются именно на свойствах полимеров клеточной стенки. В ходе эволюции в растениях появились исключительно разнообразные полисахаридные структуры, обладающие тканевой и функциональной спецификой.

Ключевыми составляющими клеточной стенки у высших растений служат целлюлоза, связующие гликаны, такие как ксилан, глюкан со смешанным типом связей или глюкуроноарабиноксилан, различные маннаны, а также пектиновые вещества – полигалактуроновая кислота и рамногалактуронаны. Декорирование этих остовов разнообразными заместителями приводит к формированию бесконечного множества углеводных структур. На основании одной базовой структуры остова растение формирует полимеры с совершенно разными свойствами и функциями,

которые активно «эксплуатируются» в ходе развития индивидуального растения. Осознание этого разнообразия, ставшее возможным благодаря развитию методов анализа строения сложных углеводов, остро поставило вопрос об изучении взаимосвязи структуры полисахарида с его свойствами и функцией в растительном организме.

Растительная клеточная стенка – динамичная структура, в которой не только откладываются новые слои, но и постоянно идут процессы модификации уже отложенных полисахаридов. Эти модификации приводят к формированию большого числа олигосахаридных фрагментов, из которых, по крайней мере, часть обладает физиологической активностью, запуская или ингибируя различные процессы. Регуляторные свойства выявлены лишь у небольшого числа фрагментов, образующихся при расщеплении любого из полимеров растительной клеточной стенки, причем при гидролизе одного полисахарида могут получаться фрагменты с противоположным действием. Совокупность физиологически активных продуктов расщепления полисахаридов клеточной стенки может приводить к формированию своеобразного информационного поля, колебания в котором составляют важный компонент сигнальных систем растения.

Исследование функций полисахаридов клеточной стенки часто затруднено гетерогенностью образцов, которые, как правило, содержат различные типы тканей, а также клетки, находящиеся на разных стадиях развития. Однако использование различных модельных систем позволило в ряде случаев выявить ткане- и стадияспецифичные варианты полисахаридов и связать их наличие с определенной функцией.

В последние годы появились методические возможности, которые позволяют существенно расширить и углубить исследования сложных углеводов и их физиологических функций. Эти подходы можно подразделить на две основные группы: одна связана с анализом непосредственно углеводов, а вторая использует возможности молекулярно-генетических методов. В докладе будут представлены результаты использования таких подходов, а также обобщенные представления о молекулярных механизмах реализации физиологических процессов с участием сложных углеводов.

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты 14-04-01591 и 15-44-02606\_p\_поволжье).

# Симпозиум 1. Системная биология растений: геномика, протеомика, метаболомика, биоинформатика

## Устные доклады

Гликированный протеом растений и его изменения в условиях абиотического стресса

Plant glycated proteome and its changes under environmental stress

Билова Т.Е.,<sup>1,2</sup> Паудель Г.,<sup>2,4</sup> Лукашева Е.,<sup>1,3</sup> Грайфенхаген У.,<sup>4</sup>  
Брах Д.,<sup>4</sup> Тараховская Е.Р.,<sup>1</sup> Митташ Ю.,<sup>5</sup> Дидио А.,<sup>2,3</sup> Соболева А.,<sup>2,3</sup>  
Гришина Т.В.,<sup>3</sup> Осмоловская Н.Г.,<sup>1</sup> Балке Г.У.,<sup>6</sup> Фогт Т.,<sup>6</sup>  
Милковски К.,<sup>5</sup> Биркемайер К.,<sup>4</sup> Вессйоханн Л.А.,<sup>2</sup> Фролов А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский Государственный Университет, Кафедра Физиологии и Биохимии Растений, Санкт-Петербург, Россия, <sup>2</sup>Лейбниц-Институт Биохимии Растений, Департамент Биоорганической Химии, Галле/Заале, Германия; <sup>3</sup>Санкт-Петербургский Государственный Университет, Кафедра Биохимии, Санкт-Петербург, Россия; <sup>4</sup>Университет Лейпцига, Факультет Химии и Минералогии, Лейпциг, Германия; <sup>5</sup>Мартин-Лютер Университет Галле-Виттенберг, Междисциплинарный Центр Исследований Сельскохозяйственных Растений (IZN), Галле/Заале, Германия; <sup>6</sup>Лейбниц-Институт Биохимии Растений, Департамент Биологии и Метаболизма Клетки, Галле/Заале, Германия

*bilova.tatiana@gmail.com*

Гликирование белков представляет собой неферментативную посттрансляционную модификацию, обусловленную взаимодействием нуклеофильных аминокислотных остатков с углеводами и соединениями α-дикарбонильного ряда. На первом этапе, восстанавливающие сахара (альдозы и кетозы) реагируют с аминогруппами лизиновых остатков, что приводит к образованию продуктов Амадори и Хайнса. Эти продукты раннего гликирования нестабильны и легко вовлекаются в гликоокисление, приводящее к образованию структурно гетерогенной группы дериватов - конечных продуктов глубокого гликирования (КППГ), недавно описанных и у растений. В роли предшественников КППГ также могут выступать α-дикарбонильные интермедиаты аутоокисления углеводов, обладающие высокой реактивностью в отношении остатков лизина и аргинина (так называемое окислительное гликозилирование). Показано, что в организме животных КППГ обладают выраженным провоспалительным и токсическим действием. Поскольку абиотический стресс вызывает увеличение продукции активных форм кислорода (АФК) на фоне увеличения содержания сахаров в тканях, представляется необходимым рассмотреть вопрос о возможном увеличении степени гликирования растительных белков в условиях



абиотического стресса, а также охарактеризовать возможные механизмы и интермедиаты стресс-зависимого гликирования. Для этого были разработаны экспериментальные модели засухи, светового стресса (*Arabidopsis thaliana*), а также стресса, вызванного солями тяжелых металлов (кадмия) (*Brassica napus*). Все стрессоры вызывали увеличение содержания АФК и углеводов в тканях. Многие из этих сахаров показали высокий гликирующий потенциал в *in vitro* тестах с синтетическими пептидами. Во всех моделях было показано увеличение доли белков, гликированных  $\alpha$ -дикарбонильными соединениями (глиоксалем и метилглиоксалем) по остаткам аргинина. Однако, это не сопровождалось повышением содержания глиоксаля и метилглиоксаля в тканях, что может быть объяснено их высокой реакционной способностью. Анализ гликированного протеома выявил лишь несколько совпадений в последовательностях содержащих продукты раннего и глубокого гликирования. Этот факт показывает, что вклад гликоокислительного пути в образование КППГ у растений, в отличие от животных, крайне низок.

## Морфофизиологические реакции тест-растений при воздействии веществ вторичного метаболизма некоторых представителей семейства Сельдерейные (*Apiaceae* L.)

Morphological reaction of test plants under the influence of substances of secondary metabolism of some representatives of the family Celery (*Apiaceae* L.)

Бударин С.Н.<sup>1</sup>, Кондратьев М.Н.<sup>2</sup>, Загуменникова Т.Н.<sup>1</sup>, Зайко Л.Н.<sup>1</sup>, Калашникова Е.А.<sup>2</sup>, Лизунова И.Е.<sup>2</sup>, Кунакова Н.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений,

<sup>2</sup> Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, агрономический факультет, Москва, Россия

[snegin20000@rambler.ru](mailto:snegin20000@rambler.ru)

Растения семейства Сельдерейные (*Apiaceae* L.) содержат большое количество [кумаринов](#) и их производных ([амми](#), [укроп](#), [борщевики](#)). Некоторые виды засоряют посевы ([бутень](#), [снить](#), [укроп](#)), особенно борщевик Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* Manden.), и некоторые из них обладают инвазивностью и тем самым являются объектами исследований проблемы аллелопатии, т.е. взаимоотношений растений в агро- и фитоценозах. В этой связи выделения фуранокумаринов могут обладать аллелопатическим характером.

Цель работы – изучение влияния экстрактов из плодов борщевика и амми большой ([Ammi majus](#) L.) и влияния водных растворов смеси фуранокумаринов на рост и развитие проростков некоторых культивируемых и лекарственных видов растений.

Исследования проводились с помощью методики био-тестов, в качестве тест-растений использовались: редис посевной (*Raphanus sativus* L.), овес

## С-1. Системная биология растений

обыкновенный (*Avena sativa* L.), ромашка аптечная (*Matricaria chamomilla* L.), шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.) и салат посевной (*Lactuca sativa* L.)

Так, слабые разбавления водных (1:10) экстрактов из плодов борщевика заметно ингибировали энергию прорастания редиса (> 28%), овса (> 25%), салата (на 20), ромашки (на 44%) и шалфея (на 31%). Сильно разбавленные водные экстракты борщевика (1:100) оказывают ощутимое стимулирующее действие на энергию прорастания и всхожесть тест-растений редиса (> 10%), овса (> 15%), салата (на 13%) и шалфея (на 12%). Наблюдаемые эффекты вызваны содержанием в плодах борщевика аллелохимикалий, которые при совместном прорастании с семенами других видов могут оказывать негативный или стимулирующий эффект.

Экстракты из плодов амми при слабом разбавлении (1:10) также обладают ингибирующими эффектами для редиса и овса (на 40%), ромашки и салата (до 75%), шалфея (на 25%). При сильном разбавлении (1:100) только ромашка аптечная испытывала слабое ингибирование (на 2,5%), тогда как редис (на 7%) и овес (на 10%) испытывали некоторую стимуляцию. Подобные результаты получены и с водными растворами смеси фуранокумаринов.

Таким образом, в следствии, проведенных экспериментов с биотестированием растений было установлено, что водорастворимые вещества плодов борщевика и амми являются ингибиторами прорастания тест-растений примерно в равной степени. Очевидно, что в плодах растений борщевика и амми содержатся аллелохимикалии, слаборазбавленные водные растворы которых негативно влияют на энергию прорастания и всхожесть семян тест-растений.

Содержащиеся в экстрактах из плодов растений и водные растворы смеси фуранокумаринов семейства Сельдерейные аллелопатически активные вещества играют определенную роль в естественных фитоценозах. Лабораторные условия показывают утрированные эффекты, тогда как природные условия сглаживают эти взаимоотношения в фитоценозе.

Эти данные иллюстрируют характер взаимоотношений растений и в дальнейшем станут ключом в раскрытии механизмов взаимодействий в растительном сообществе.

## Метаболомный ответ на действие Cd в надземных органах растений *Amaranthus caudatus*

### Metabolomic response on Cd exposure in shoots of *Amaranthus caudatus* plants

Осмоловская Н.Г.<sup>1</sup>, Ву Вьет Зунг<sup>1</sup>, Кучаева Л.Н.<sup>1</sup>, Сазанова К.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН

+7 812 328-96-95, natalia\_osm@mail.ru

Кадмий является одним из наиболее опасных загрязнителей среды и занимает особое место в ряду тяжелых металлов (ТМ) ввиду высокой подвижности в системе почва- растение и легкости передвижения по пищевым цепям. Его характеризует широкий спектр повреждающего действия на растительный организм, что проявляется в торможении роста и нарушении процессов фотосинтеза, дыхания, водного обмена и минерального питания растений. В то же время растения способны выживать в условиях повышенного содержания Cd и других ТМ в окружающей среде, устойчивость к воздействию которых во многом определяется функционированием ряда адаптационных механизмов, принципиальная роль среди которых отводится механизмам транспорта, хелатирования и секвестирования ионов ТМ в клеточных компартментах, а также активации работы специфических защитных систем клетки. Одним из наиболее информативных подходов к исследованию ответных реакций растения на действие ТМ является метаболомный метод, позволяющий охарактеризовать относительные изменения большого числа низкомолекулярных метаболитов растения. В нашей работе был исследован характер метаболомных ответов в зрелых и ювенильных листьях 42-дневных растений амаранта хвостатого *Amaranthus caudatus* на действие Cd в концентрации 90 мкмоль/л при выращивании в условиях гидропонной культуры. Анализ и определение концентраций метаболитов проводили с использованием метода хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на газовом хроматографе Agilent 6850GC с масс-селективным детектором 5975C (США). Идентификацию соединений осуществляли с использованием программы AMDIS и библиотеки масс-спектров NIST 2005. Статистическую обработку выполняли методом главных компонент в программе Microsoft Excel 2010 с использованием Multibase 2015. Среди более 100 размеченных пиков идентифицировано 44 соединения, относящихся к углеводам, органическим кислотам, спиртам и аминокислотам, для которых проанализированы изменения в величинах их пулов в онтогенезе листа и в ответ на Cd воздействие и охарактеризован их вклад в формирование различий между метаболомами контрольных и «стрессированных» растений. Результаты исследования показали, что характер метаболомного отклика на стрессовое действие Cd и степень его реализации в надземных органах амаранта во многом определялись стадией онтогенеза листа и в целом проявлялись сильнее в ювенильных листьях. Установлено, что среди

## С-1. Системная биология растений

идентифицированных соединений существенный вклад в изменение метаболомных профилей в листьях амаранта под влиянием воздействия Cd внесли, прежде всего, органические кислоты (яблочная, глицериновая, щавелевая, фумаровая, янтарная, кофейная, эритроновая, треоновая), сахара (глюкоза, фруктоза, сахароза), спирты (мио-инозитол, глицерол) и в меньшей степени - аминокислоты (аланин, оксипролин). Показано, что в контроле в ювенильных листьях амаранта из 16 идентифицированных органических кислот наиболее обильны глицериновая и глюконовая кислоты, высоко содержание янтарной и яблочной, а также эритроновой и треоновой кислот при низких уровнях фумаровой и лимонной кислот. В онтогенезе листа отмечено увеличение пулов яблочной, щавелевой, фумаровой и кофейной кислот при относительной неизменности пулов сукцината и цитрата и снижении вдвое - глицерата. В метаболомном ответе зрелых и ювенильных листьев на 7 сут. действие Cd прослеживаются как общие закономерности, так и онтогенетические различия. Особенностью ответа в ювенильных листьях явилось снижение пулов глицериновой и бензойной кислот при заметном, до 1,5-2 раз увеличении пулов малата, сукцината, эритроновой, треоновой и рибоновой кислот, а также существенное возрастание пулов фумаровой и особенно кофейной кислоты (в 10 раз). В зрелых листьях метаболомный отклик на Cd воздействие со стороны органических кислот имел существенные отличия и наряду с увеличением содержания яблочной, бензойной и в меньшей степени - щавелевой, эритроновой и фумаровой кислот характеризовался отсутствием значимых изменений в уровнях треоновой и кофейной кислот, одновременно демонстрируя снижение уровня сукцината и особенно - рибоновой кислоты. Среди углеводов особо значимый вклад в формирование метаболомного отклика на Cd в ювенильных листьях вносили сахароза, глюкоза и фруктоза, пулы которых возросли соответственно в 23, 12 и 3 раза, в то время как в зрелых листьях при умеренном возрастании содержания глюкозы и сахарозы со стороны фруктозы выявлен альтернативный ответ снижения ее уровня в 2 раза по отношению к контролю. Полученные данные обсуждаются с позиции оценки влияния кадмия на метаболомные профили в листьях амаранта с учетом значимости фактора онтогенеза в определении характера и интенсивности биохимических перестроек в листе. Дается оценка вклада отдельных метаболитов в изменение метаболомных профилей на уровне зрелых и ювенильных листьев амаранта с учетом их возможной функциональной роли в ответных реакциях растения на Cd воздействие. Обсуждается функциональная значимость метаболомных перестроек в надземных органах амаранта как механизма адаптации растений при хроническом действии Cd. Делается заключение, что метаболомные перестройки, наблюдаемые под влиянием кадмия в ювенильных листьях амаранта, более значимы, чем изменения в зрелых листьях, для активирования защитных механизмов, направленных на повышение устойчивости этого растения в условиях хронического Cd воздействия.

## Аномальный морфогенез камбиальной зоны карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica*)

Abnormal morphogenesis of cambial zone in Karelian birch (*Betula pendula* Roth var. *carelica*)

Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Мощенская Ю.Л., Никерова К.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса Карельского научного центра Российской академии наук, г. Петрозаводск  
+7 8142 76-81-60, galibina@krc.karelia.ru

Карельская березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica*) – форма березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*), у которой нарушение в деятельности камбия приводит к образованию аномальной по строению ксилемы. В период активного формирования тканей ствола в отдельных участках камбиальной зоны карельской березы, главным образом среди лучевых клеток камбия, нарушается упорядоченный характер деления. Часть инициальных и материнских клеток ксилемы претерпевает необычные деления, в результате которых клеточная пластинка закладывается не в срединной части клеток, а в различных зонах их цитоплазмы. Вследствие этого вновь образовавшиеся клетки значительно отличаются между собой размерами. Подобная дезориентация в заложении клеточной пластинки при цитокинезе приводит к изменению обычного порядка в расположении ксилемных производных и нарушению присущей им формы.

Камбий – гетеротрофная ткань, для его деятельности необходим приток сахарозы, донорами которой выступают фотосинтезирующие листья. Сахароза может вступать в метаболические процессы только после утилизации ее инвертазой (Инв) и сахарозосинтазой (СС). В фазу активного деления камбиальных инициалей метаболизация поступающей сахарозы происходит с участием апопластной инвертазы (АпИнв), которая создает и поддерживает акцепторную силу проводящих тканей ствола у обычной и карельской березы на высоком уровне. Образующаяся глюкоза может в свою очередь стимулировать митотическую активность стволовых клеток камбия, в частности контролируя экспрессию генов циклина D.

При переходе камбиальных клеток от фазы деления к фазе дифференцировки, вместо инвертазного пути начинает доминировать сахарозосинтазный путь метаболизации поступающей сахарозы, что сопровождается снижением содержания свободной глюкозы. Наши исследования показали, что у обычной березы повислой в формирующейся ксилеме наблюдается высокая активность СС, а активность АпИнв практически равна нулю. В связи с этим, высказано предположение, что разгрузка ситовидных трубок и латеральный транспорт дисахарида до зоны роста и развития ксилемы осуществляются, главным образом, по симпласту. Критическое снижение концентрации сахарозы в апопласте активирует белковые ингибиторы инвертазы, что, в свою очередь, приводит к инактивации фермента. Отличительной особенностью карельской березы является высокая активность АпИнв на фоне пониженной активности СС. Это дает основание считать, что в данном случае дифференцировка тканей

## С-1. Системная биология растений

ксилемы происходит на фоне интенсивного гидролиза сахарозы в апопласте. Высокий уровень дисахарида в апопласте инактивирует белковые ингибиторы инвертаз, тем самым, стимулируя активность АпИInv.

Долго господствовало представление о том, что синтез полисахаридов клеточных стенок в основном осуществляется с помощью СС, мембраносвязанная форма которой образует комплекс с целлюлозосинтазой, что дает возможность прямого использования УДФ-глюкозы для биосинтеза целлюлозы. В последнее время появились работы, в которых обсуждается роль инвертаз в синтезе клеточных стенок. Более того, на *Arabidopsis thaliana* (L.) показано, что ингибирование СС не приводит к изменению в структуре клеточной стенки и не влияет на содержание целлюлозы, тогда как отсутствие изоформ нейтральных инвертаз сопровождается сильным угнетением роста. Данные о высокой активности АпИInv в дифференцирующейся ксилеме карельской березы также указывают на возможность участия инвертазы в синтезе компонентов клеточных стенок.

Высокая активность СС в ксилеме *B. pendula* var. *pendula* поддерживается за счет изоформы SuSy1, о чем свидетельствует высокая экспрессия кодирующего ее гена. Растения *B. pendula* var. *carelica*, не проявившие признаков аномального строения, имели пониженный уровень мРНК гена *SUS1* и повышенное количество мРНК генов *SUS2* и *SUS3*, по сравнению с *B. pendula* var. *pendula*. При этом на фоне сравнительно низкой активности СС наблюдали уменьшение процентного содержания целлюлозы в ксилеме.

Формирование узорчатой древесины у карельской березы сопровождается низким уровнем транскрипта генов *SUS1* и *SUS2*. Содержание транскрипта гена *SUS3* достоверно не отличалось от такового у обычной березы. Подавление экспрессии генов *SUS1* и *SUS2* у карельской березы наблюдалось локально только в узорчатой части ствола. В безузорчатой части дерева количество транскриптов генов *SUS1*, *SUS2*, *SUS3* было значительно больше, по сравнению с узорчатой частью того же дерева и по сравнению обычной березой повислой.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-44-100639 p\_a

## Изменение транскриптомного профиля растений табака в ходе инфекционного процесса, вызванного *Pectobacterium atrosepticum*

Transcriptomic profile changes of the tobacco plants during the infection process caused by *Pectobacterium atrosepticum*

Губаев Р.Ф.<sup>1,2</sup>, Горшков В.Ю.<sup>1,2</sup>, Даминова А.Г.<sup>1</sup>, Петрова О.Е.<sup>1</sup>, Гоголева Н.Е.<sup>1</sup>, Гоголев Ю.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, 420111, Лобачевского 2/31, Казань, Россия

+7 843 292 72 22, +7 843 292 73 47, [rim.gubaev@kibb.knc.ru](mailto:rim.gubaev@kibb.knc.ru)

<sup>2</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Кремлевская 18, Казань, Россия

+ 7 843 233 78 26, +7 843 233 78 14

Взаимодействие растений и патогенов представляет собой сложный процесс, в результате которого макро- и микроорганизм начинают функционировать как единая патологическая система. В результате такого взаимодействия происходят изменения физиологического статуса как растения-хозяина, так и паразита. Патоген-индуцируемые ответные реакции растения могут быть условно классифицированы либо как защитный ответ, либо как реакция восприимчивости. Первый тип реакций сдерживает развитие патогена в организме хозяина, в то время как второй тип – преобразует растения, адаптируя их внутреннюю среду для жизни микроорганизмов. Понимание процессов, связанных как с устойчивостью, так и восприимчивостью, происходящих в растениях в ответ на инвазию патогенного организмов, во-первых, может предоставить ценную информацию о том, как формируется и развивается патологическая система и, во-вторых, сформировать основу для разработки способов контроля бактериозов растений.

Пектобактерии, которых называют «чумой растений», являются одними из наиболее вредоносных фитопатогенов. Основной стратегией взаимодействия этих микроорганизмов считается «грубая сила», то есть массивная продукция экстраклеточных ферментов, разрушающих растительную клеточную стенку и вызывающих обширный некроз клеток и мацерацию тканей. Генетические детерминанты устойчивости растений к пектобактериям на сегодняшний день неизвестны. Неисследованными остаются и критерии восприимчивого ответа растений на инвазию пектобактерий, что, по всей видимости, определяется особым «отношением» к пектобактериям как к патогенам, использующим силу, а не тактику. В связи с этим, сложно ожидать, что для их взаимодействия с растениями могут требоваться специфические восприимчивые ответы хозяина, как это необходимо для формирования систем биотроф/растение. Тем не менее, в исследованиях сотрудников нашей лаборатории было показано, что пектобактерии могут использовать при взаимодействии с растениями более

## С-1. Системная биология растений

тонкие механизмы и индуцировать специфические восприимчивые ответы, связанные с кондиционированием внутренней среды растений.

Для комплексной характеристики ответов растений при пектобактериальных инфекциях в нашем исследовании был применен транскриптомный анализ с использованием метода высокопроизводительного секвенирования следующего поколения на платформе Illumina HiSeq 2500. Этот подход позволяет визуализировать экспрессию всего генома и осуществить поиск дифференциально экспрессирующихся генов, продукты которых могут потенциально участвовать в формировании патосистем.

Из образцов контрольных и инфицированных пектобактериями растений табака была выделена тотальная РНК, которая была использована для синтеза библиотек кДНК и последующего секвенирования. Полученные прочтения были отфильтрованы по качеству и выровнены при помощи программы TopHat2 на референсный геном растений табака, опубликованный в базе данных геномов пасленовых SolGenomics. Оценка дифференциально экспрессирующихся генов и аннотирование генов были выполнены с помощью программ Cuffdiff и Cufflinks, а также с использованием авторских скриптов в программе RStudio. Полученные данные о дифференциально экспрессирующихся генах были визуализированы с помощью стандартных биоинформационных пакетов в RStudio.

В результате транскриптомного анализа был выявлен широкий спектр генов, уровень экспрессии которых изменяется в ходе инфекционного процесса. Дифференциально экспрессирующиеся гены были классифицированы по метаболическим путям и функциональным категориям. Были обнаружены гены, активация экспрессии которых может являться критерием восприимчивости растений к пектобактериям. Ранее нами было показано, что инфекционный процесс, вызванный пектобактериями сопряжен с активацией экспрессии маркерных генов жасмонат- и этилен-зависимого гормонального пути и репрессией АБК-зависимого. Результаты транскриптомного анализа подтвердили эти закономерности.

Таким образом, нами была проведена глобальная характеристика изменения транскриптомного профиля растений при инфекции, вызванной пектобактериями, на основе которой был сформирован «физиологический портрет» растения при формировании системы паразит/хозяин. Кроме того, был выявлен широкий спектр патоген-индуцируемых генов, не имеющих аннотации в базах данных, продукты которых могут являться потенциальными участниками процесса формирования растительно-микробных патосистем и информативными мишенями для исследования процессов взаимодействия патогенов и хозяев.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект №15-14-10022); раздел исследований, связанный с анализом уровня экспрессии генов-маркеров при помощи ПЦР поддержан РФФИ (проект № 14-04-01750).



## Роль возможной динамики гликозилирования как сигнальной системы в супраструктурах протеома клеточных ядер при индукции прорастания зрелых зародышей пшеницы

The possible role of glycosylation as the dynamics of the signal system in the suprastructures of the proteome of the cell nuclei during induction of germination of mature wheat germ

Вафина Г.Х., Иванов Р.С., Иванова Э.А.

Уфимский институт биологии Российской академии наук, пр. Октября, 69, г. Уфа, Россия

2355362, 2356247, [evilina@anrb.ru](mailto:evilina@anrb.ru)

Еще в 70-е годы прошлого века было доказано, что углеводные компоненты находятся в поровых комплексах, в скелетных структурах клеточного ядра и играют роль связующего компонента ядерного матрикса. Впоследствии появились работы по гликозилированию гистонов. Опыты *in vitro* показали, что в тотальном гистоне 45% лизина гликозилировано, и что фракции гистонов обладают гемагглютинирующей активностью. Также известно, что в клеточном ядре имеется полная система гликолиза. Пространственная реорганизация хроматина в ядре при сохранении доступности определенных участков ДНК для регуляторных факторов и ферментов транскрипции способна выполнять важную роль в работе эпигенетических механизмов, которые работают на уровне N-концевых аргининовых и лизиновых остатков гистонов, не входящих в состав нуклеосомной глобулы. Ковалентная связь с глюкозой, происходит по ε-аминогруппам (NH<sub>2</sub>-) лизина и аргинина.

Целью нашей работы было исследование динамики формирования гликопротеидных комплексов на уровне супраструктурной организации интерфазного клеточного ядра в течение инициации ростовых процессов от 0 ч (воздушно-сухой зародыш) до 24 ч, а именно в период G<sub>1</sub> фазы и перехода к S фазе клеточного цикла. Объектом исследования служили элитные семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Мироновская и Московская 35. Из отделенных от эндосперма зародышей были изолированы клеточные ядра. Из очищенных клеточных ядер при повышении ионной силы раствора были получены надмолекулярные структуры: нуклеоплазма, хроматин непрочно- и прочно- связанные с ядерным матриксом, а также ядерный матрикс. Количество белка в ядрах и ядерных фракциях определяли методом Бредфорд в нашей модификации; содержание углеводного компонента – антроновым методом в нашей модификации; *Ap<sub>2</sub>-X* (триптазную) активность оценивали соответственно по расщеплению *Ap<sub>2</sub>-X* связей в аргининбогатом белке – протамине во всех вышеперечисленных фракциях ядер. Способность супрамолекулярными структурами клеточных ядер связывать экзогенный ауксин была определена с помощью иммуноферментного анализа.

Надмолекулярные структуры клеточных ядер представляют собой биогетерополимерные структуры, так как в их состав помимо белков, входят ДНК, РНК, гексозы и липиды, в которых при прохождении фаз клеточного цикла осуществляется реорганизация хроматиновой матрицы. Было показано,

## С-1. Системная биология растений

что во всех полученных фракциях присутствует углеводный компонент в различной степени и, что в течение  $G_1$  фазы клеточного цикла происходит резкое уменьшение углеводных компонентов во всех супраструктурах. По результатам исследований, сделанных на животном объекте, известно, что углеводные компоненты ядерного матрикса связывают гормоны, канцерогенные вещества, а также обеспечивают устойчивость клеток к фармакологическим воздействиям. Известно, что белки, обладающие лектиновой активностью способны связывать ауксин. С нашей стороны была предпринята попытка определить, какие супраструктуры клеточных ядер растений будут отзывчивыми на присутствие экзогенного ауксина при инициации ростовых процессов. Нами было показано, что только структуры ядерного матрикса и хроматина прочно связанного с ядерным матриксом 24-часовых зародышей способны связывать экзогенный ауксин. Возможно, что белки, обладающие лектиновой активностью встраиваясь в ядерный матрикс, связанный с цитоскелетом и с клеточной оболочкой при взаимодействии с условиями внешней среды могут переносить эпигенетическую информацию через этот метаболический путь и изменять физиологический ответ растения. Многие функционально важные белки синтезируются в виде неактивных предшественников, от которых затем отщепляются биологически активные продукты. Зачастую правильное направление фрагментации диктуется углеводными цепями. В то же время гликаны способны присоединяться к полипептидным участкам, которые экранируются для протеиназ и посредством стерических помех защищают эти зоны от протеолитической атаки. Современная научная литература доказывает наличие ассоциированных с гистонами протеаз и ДНК зависимых протеаз, принимающих участие в регуляции процессов транскрипции, репликации и деградации ДНК. Нами было показано, что только фракция ядерного матрикса 24 ч зародышей обладает высокой протеолитической активностью при сопряженном ингибировании на других биогетерополимерных структурах. Известно, что ЯМ динамическая структура, на которой происходит сборка мультиферментных комплексов репликации и транскрипции. Может быть, уменьшение содержания углеводного компонента в структурах ядерного матрикса клеточных ядер связано с открытием *Arg-X* чувствительных зон протеолиза (релаксации), как одного из возможных механизмов пространственно-временной реорганизации хроматиновой матрицы в процессе инициации ростового морфогенеза зрелых зародышей пшеницы. Возможно, гликозилирование выполняет роль антенных систем при водопоглощении, которое направляет русло динамики метаболизма в клетках, органоидах клеток и организма в целом.

Этилен-зависимые изменения метаболитных профилей проростков *Arabidopsis thaliana* при гравитропической реакции  
Ethylene-dependent changes of metabolite profiles in *Arabidopsis thaliana* seedlings during gravitropic response

Клименко Н.С.<sup>1,2</sup>, Пожванов Г.А.<sup>1</sup>, Шаварда А.Л.<sup>3</sup>, Медведев С.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Всероссийский институт генетических ресурсов имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург

<sup>3</sup> Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург

Санкт-Петербургский государственный университет.

Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург, Россия

+7 812 328-96-95, g.pozhvanov@spbu.ru

Растения воспринимают различные стимулы из окружающей среды и в соответствии с полученными сигналами изменяют направление своего роста. Гравитация, величина и направление действия которой практически не меняется в течение всего онто- и филогенеза растений, является важнейшим поляризованным внешним фактором для растительных организмов.

В данной работе представлен результат изучения изменения метаболитных профилей проростков *Arabidopsis thaliana* при переориентации растений относительно вектора силы тяжести (гравистимуляции) и под влиянием ингибиторов синтеза этилена. Анализ метаболитных профилей арабидопсиса проводили методом главных компонент. Показано, что гравистимуляция уже через 60 мин. инициирует существенные биохимические перестройки в проростках *A. thaliana*. В частности, возрастала концентрация таких сахаров, как манноза и стахиоза, но снижалось содержание некоторых жирных кислот (олеиновой, пальмитиновой, стеариновой).

Наиболее выраженные изменения метаболитных профилей под влиянием гравистимуляции происходили в 2-мм кончиках корней, включающих корневую чехлик, меристему и зону растяжения. К этой зоне корня приурочены основные процессы рецепции гравитационного стимула и развития гравитропического ответа. В условиях гравистимуляции через 60 мин в кончиках корней возрастало содержание валина, лейцина, серина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, никотиновой кислоты и снижалась содержание некоторых моносахаридов, а также малата и оксалата.

Поскольку гравистимуляция, как разновидность механического стресса, стимулирует синтез этилена или его предшественника 1-аминоциклопропан-1-карбоксилевой кислоты, на следующем этапе работы для изучения влияния фитогормона на процессы жизнедеятельности проводили обработку растений ингибиторами синтеза этилена – салициловой кислотой и аминоксиксвинилглицином (АВГ). Обработка салициловой кислотой целых проростков арабидопсиса подавляла биохимические изменения, инициируемые гравистимуляцией. В присутствии салицилата в гравистимулированных растениях возрастало содержание стеариновой и

## С-1. Системная биология растений

пальмитиновой жирных кислот, уменьшался уровень валина, треонина, серина, аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, а также амидов глутамина и аспарагина.

Обработка кончиков корней арабидопсиса АВГ ( $10^{-5}$  М) нивелировала действие гравистимуляции на метаболом. В присутствии АВГ в кончиках корней возрастала концентрация ряда моносахаридов, снижалось содержание валина, фосфорной кислоты и этаноламина.

Таким образом, наиболее значимые биохимические перестройки под действием гравистимуляции происходили в 2-мм кончиках корней. Эффект гравистимуляции снижался при обработке целых проростков арабидопсиса салицилатом и практически полностью нивелировался кончиков корней проростков АВГ. Полученные результаты указывают на участие фитогормона этилена в перестройках метаболома арабидопсиса в ходе гравитропической реакции.

Работа выполнена за счёт средств НИР СПбГУ (1.38.233.2014, 1.42.1288.2014, 1.57.1157.2014, 1.57.163.2015) и гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-01624а) на базе Ресурсного центра “Развитие клеточных и молекулярных технологий” СПбГУ (проекты 109-72, 109-244).

Содержание фенольных соединений и антиоксидантная активность листьев *Prunus cerasus* L. (*Cerasus vulgaris* Mill.) в разных эколого-географических условиях

Of phenolic compounds and antioxidant activity leaf *Prunus cerasus* L. (*Cerasus vulgaris* Mill.) The different eco - geographical conditions

Мотылева С.М.<sup>1</sup>, Орлова С.Ю.<sup>2</sup>, Мертвищева М.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства», Загорьевкая 4, Москва, Россия, (495) 329-31-66, [vstisp@vstisp.org](mailto:vstisp@vstisp.org)

<sup>2</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», Большая морская, 42, Санкт-Петербург, Россия

+7 812 315-56-11, [s.orlova@vir.nw.ru](mailto:s.orlova@vir.nw.ru)

В рамках решения проблемы адаптации плодовых растений к факторам внешней среды лабораторией биохимии ФГБНУ ВСТИСП в сотрудничестве с отделом ГР плодовых культур «ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» проведено комплексное изучение вторичных метаболитов полифенольной природы в листьях вишни, произрастающей в Центральном и Северо – Западном регионах России.

Фенольные соединения относятся к одним из наиболее распространенных представителей вторичного метаболизма, обладают антиоксидантным действием, участвуют в регуляции протекания свободно-радикальных процессов. Лист растений, являясь фотосинтезирующим органом, отражает метаболические процессы растения. Литературные данные по изучению

антиоксидантной активности (АОА) и комплекса фенольных соединений в листьях косточковых культур немногочисленны. Предположительно качественный и количественный состав антиоксидантного комплекса листьев растений разных зон произрастания может отличаться качественно - величиной АОА и уровнем накопления веществ фенольной природы. Это послужило основой для проведения сравнительного изучения АОА и накопления веществ фенольной природы в листьях *Prunus cerasus* L. в разных эколого-географических условиях произрастания.

Цель настоящей работы - сравнение суммарной АОА и качественного состава фенольных соединений листьев вишни обыкновенной, произрастающей в различных эколого-географических зонах. Объекты исследований – листья 13 сортов вишни обыкновенной селекции ФГБНУ ВНИИСПК

(Конкурентка, Ливенская, Муза, Мценская, Новелла, Орловская ранняя, Орлица, Превосходная Веняминова, Превосходная Колесниковой, Стойкая, Студенческая, Трофимовская, Тургеневка). Исследуемые сорта возделывали в Центральном и Северо - Западном регионах России. Листья для исследований брали из средней части побегов после окончания роста. Изучали АОА и фенольный состав спиртовых экстрактов метанолом 90%. Для оценки АОА использовали спектрофотометрию свободных радикалов, основанную на реакции DPPH (2,2 –дифенил-1-пикрилгидразил), растворенного в метаноле с образцом антиоксиданта (экстракт листьев). ВЭЖХ анализ экстрактов осуществляли на жидкостном хроматографе KNAUER; использовали аналитическую колонку Диасорб С-18.

Исследования АОА показали, что листья вишни обладают высоким антиоксидантным эффектом (81,4 - 88,3% - ингибированием). Выделена группа сортов (Конкурентка, Мценская, Орлица, Муза, Стойкая, Орловская ранняя), АОА листьев которых в условиях Центрального региона на 2, 1 – 5,2 % выше, чем в условиях Северо – Запада. Вторая группа сортов, в листьях которых АОА в условиях Северо – Западного региона, наоборот, на 1,3 – 4,4 % выше, чем в Центральном. АОА листьев сортов Новелла, Студенческая, Тургеневка и Трофимовская различается не более чем на 0,2 – 0,8 %. На хроматографических профилях в выбранных условиях хроматографирования представлено не менее 10 - 17 веществ фенольной природы. Качественный состав фенольных соединений листьев вишни индивидуален для каждого сорта и мало меняется в зависимости от района произрастания растений. Идентифицированы 3 вещества фенольной природы – хлорогеновая, феруловая кислоты и рутин. В группе идентифицированных веществ доля хлорогеновой кислоты в листьях преобладающая и колеблется от 35 до 74 %, доля феруловой кислоты от 7 до 15 %, рутина от 8 до 19 %. В листьях большинства сортов вишни доля накопления хлорогеновой кислоты в зависимости от условий произрастания различается несущественно. Выделяются сорта Ровесница, Превосходная Колесниковой и Мценская, в листьях которых в условиях Северо-Западного региона в 2 – 2,5 раза больше синтезируется хлорогеновой кислоты, по сравнению с условиями Центрального. Феруловой кислоты и рутина в листьях вишни накапливается в 5 – 10 раз меньше, чем хлорогеновой кислоты. Отмечено, что в листьях вишни

## С-1. Системная биология растений

Северо-Западного региона феруловой кислоты накапливается больше на 3 – 10%. Выявлено, что в условиях Центрального региона в листьях сортов Трофимовская, Ливенская и Превосходная Колесниковой накапливается феруловой кислоты в 3 – 10 раз больше, чем в листьях вишни Северо-Запада. Содержание рутина в листьях вишни Орловская ранняя, Тургеневка, Трофимовская, Студенческая, Ливенская и Превосходная Колесниковой в 2-7 раз больше в условиях Северо-Западного региона. Установлено, что для листьев вишни характерен стабильный состав, мало зависящий от условий произрастания, то есть генетически-обусловленный. Вариабельность обсуждаемой группы веществ в листьях сортов вишни может быть охарактеризована как средняя и по Центральному региону составляет 18 %, по Северо – Западному – 32 %. Это свидетельствует о изменениях активности синтеза вторичных метаболитов в зависимости от условий произрастания.

### Оксилипины в корнях растений семейства *Poaceae*

#### Oxylipins in the roots of *Poaceae* plants

Огородникова А.В., Ильина Т.М., Мухитова Ф.К., Гречкин А.Н.

ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН. 420111, ул. Лобачевского д.2/31, а/я 30, Казань, Россия

+7 843 2319044, +7 843 2927347, [anyuta\\_ogorodnik@mail.ru](mailto:anyuta_ogorodnik@mail.ru)

Липоксигеназный каскад является одной из важных сигнальных систем, которая необходима для адаптации растений к неблагоприятным факторам. Несмотря на достигнутые успехи в изучении липоксигеназного пути растений, достаточно многие аспекты остаются неисследованными. Как правило, проведённые до сих пор работы, касались преимущественно узкого круга высших растений. Имеющаяся в настоящее время геномная информация свидетельствует о том, что разнообразие ферментов липоксигеназного пути значительно превышает область сегодняшних знаний. Кроме того, большинство опубликованных работ касается фотосинтезирующих органов высших растений, в то время как нефотосинтезирующие органы, как правило, существенно отличаются направленностью липоксигеназного пути. Целью настоящей работы являлось изучение путей и механизмов биосинтеза оксилипинов, продуктов липоксигеназного сигнального каскада в нефотосинтезирующих тканях - клетках корней культурных растений.

Достигнутый в настоящее время уровень знаний по геномике растений свидетельствует о широком разнообразии генов, контролирующих липоксигеназный путь растений. Работы по молекулярному клонированию значительно отстают от темпов секвенирования геномов. Еще более отстают биохимические исследования рекомбинантных ферментов. В частности, у злаков имеется немалое разнообразие генов липоксигеназ и ферментов семейства СУР74, контролирующих вторичные превращения гидроперекисей жирных кислот. Преобладающая часть этих генов не клонирована и соответствующие рекомбинантные белки не получены и не исследованы.

Поэтому представляется целесообразным не только исследование катализа рекомбинантными ферментами, но и исследование метаболизма *in vitro* в растениях с неизученными или мало изученными геномами.

Объектами исследований были: пшеница (*Triticum aestivum* L.), сорго (*S. occidentocuresicum* Jak., *S. sudanense* Jak., *S. chinense* Jak.), ячмень (*Hordeum vulgare* L.), овёс (*Avena sativa* L.), просо (*Panicum miliaceum* L.). Оксипирины экстрагировали из гомогената корней смесью гексан – этилацетат 1:1 (по объёму). Затем оксипирины метилировали диазометаном, превращали в ТМС-производные и анализировали с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии. Во всех исследованных объектах обнаружено большое разнообразие продуктов. Среди идентифицированных оксипиринов преобладали продукты 9-липоксигеназного каскада, но присутствовали и продукты 13- липоксигеназного каскада. Идентифицированные оксипирины являются продуктами путей, контролируемых гидропероксидлиазами (ГПЛ), алленоксидсинтазами (АОС) и эпоксиалкогольсинтазами (ЭАС). Корни проростков выбранных растений семейства *Poaceae* имеют сложный оксипириновый профиль, также присутствуют неизвестные продукты. Так, в профиле корней пшеницы обнаружено большое разнообразие продуктов. К продуктам ГПЛ относятся 9-оксононановая кислота (минорный продукт со временем удерживания около 5,1 мин), 4-гидроксинонановая кислота (продукт окисления 3Z-ноненаля), азелаиновая кислота (основной продукт, образуется в результате окисления 9-оксононановой кислоты, первичного продукта 9-ГПЛ), (3Z)-травматиновая кислота, (3Z)-додецен-1,12-диоая кислота (продукт окисления (9Z)-12-оксо-9-додеценовой кислоты, которая является первичным продуктом 13-ГПЛ). Эти соединения были обнаружены нами ранее в развивающихся корнях гороха. Помимо продуктов ГПЛ, в профиле оксипиринов (в порядке возрастания полярности) присутствуют неизвестные соединения (их масс-спектры не соответствуют никаким известным соединениям из библиотечных масс-спектров), гидрокси-октадекадиеновые кислоты 9-ГОД и ГОД, 10-оксо-11-фитоеновая кислота (минорный продукт), цис-12-оксо-10,15-фитодиеновая кислота и альфа-кетолы – это продукты пути, контролируемого АОС. Эпоксиспирты и самые полярные соединения - тригидроксикилоты (время удерживания 19-21 мин) - продукты пути, контролируемого эпоксиалкогольсинтазой (ЭАС). Таким образом, корни проростков пшеницы проявляют исключительное разнообразие оксипиринов. В них одновременно экспрессированы гены 9- и 13-липоксигеназ, ГПЛ, АОС и ЭАС. По-видимому, роль оксипиринов в развивающихся корнях связана как с регуляцией онтогенеза, так и с защитными функциями. Например, азелаиновая кислота известна своим антимикробным действием.

Полученные результаты показывают, что корни растений семейства *Poaceae* имеют сложный оксипириновый профиль. Метаболизм экзогенной линолевой кислоты происходит за счет (9S)- и (13S)-липоксигеназ. Продолжение исследований позволит получить фундаментальные знания о липоксигенальном сигнальном каскаде хозяйственно значимых культурных растений, о механизмах биосинтеза оксипиринов, в том числе – соединений, ответственных за адаптацию растений к действию неблагоприятных факторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (гранты №№ 15-04-04108, 15-44-02414-р\_поволжье\_a), гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ.

## Сравнительный анализ динамики метаболома и транскриптома *Chlamydomonas reinhardtii* при различных трофических режимах культивирования

Comparative analysis of transcriptome and metabolome of *Chlamydomonas reinhardtii* under different trophic modes of cultivation

Пузанский Р.К.<sup>1,2</sup>, Шаварда А.Л.<sup>1,2</sup>, Шишова М.Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский Государственный Университет, Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д.7-9. Тел/факс: +7 (812) 328-20-00; E-mail: puzansky@yandex.ru

<sup>2</sup> Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Россия, 97376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2

+7 812 372-54-43

Цель работы состоит в сравнительном анализе метаболомов культур *Chlamydomonas reinhardtii*, растущих автотрофно или миксотрофо, а также при контрастном изменении режима питания (эффект преадаптации). Спектр метаболитов определяли с использованием газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией (ГХ-МС), что позволило проанализировать динамику около 300 соединений и идентифицировать около 100 из них. В связи с тем, что метаболом является интегральным результатом транскрипционной активности генома, методом ОТ-ПЦР протестирована динамика уровня экспрессии целого ряда генов, вовлечённых в метаболизм ацетата, энергетического и пластического метаболизма, а также пластидного транспорта метаболитов.

С применением различных методов мультивариантной статистики без обучения (PCA, RF) и с обучением (PLS-DA, RF) проведен иерархический кластерный анализ динамики метаболомов хламидомонады в зависимости от развития культуры клеток, который позволил разделить метаболиты на 3 большие группы. Концентрация соединений первой группы максимальна преимущественно в стационарной фазе. Характерными метаболитами этой группы являются длинные насыщенные жирные кислоты и диацилглицеролы. Следующие две группы объединяют метаболиты с пиками содержания в период высокой физиологической активности приходящимися на экспоненциальную фазу. Для этих групп характерно большое содержание коротких и ненасыщенные жирных кислот. Эти группы характеризуются также большим количеством сахаров и интермедиатов энергетических циклов. Последующий анализ выявил, что влияние текущих трофических условий на дисперсию концентраций метаболитов гораздо сильнее влияния преадаптации. Различия метаболомов более выражены в период роста культуры и сглаживаются к стационарной фазе. При помощи OPLS были



выявлены потенциальные маркеры, в числе которых доминировали жирные кислоты, особенно ненасыщенные и умеренно длинные, а также сахара. Последующий транскрипционный анализ с применением мультивариантной статистики показал, что профили кластеризуются в зависимости от возраста культуры. Классификация показала высокую связь уровня экспрессии с возрастом в случае миксотрофной культуры генов ассимиляции ацетата (*ACSI*, 2, *ACK1*), генов деградации крахмала, некоторых генов ПФЦ и цикла Кальвина, гликолиза и глюконеогенеза (*TRK1*, *PCK1*, *TAL2*, *FBA3*, *HXK1*, *TPIC*, *CIS2* и др.) – экспрессия этих генов была максимальна в фазе роста культуры, а затем снижалась. Характерно, что гены, кодирующие транспортеры, осуществляющие экспорт фотоассимилятов из хлоропластов, демонстрируют более высокий уровень экспрессии при автотрофных условиях. В условиях миксотрофии наиболее активны гены, кодирующие транспортеры связанные с триозным энергетическим шунтом между пластидой и цитозолем. Следует отметить, что выявленные различия в стационарной фазе не такие яркие, как в экспоненциальной, и большая часть генов не демонстрирует различий с высокой достоверностью. Преадаптация играет относительно слабую роль в детерминации профиля экспрессии генов. Для выявления связи экспрессии генов с метаболитным профилем был проведён корреляционный анализ. Полученные данные позволили разработать карту на которой четко прослеживаются два кластера: первый, преимущественно липидный, сгруппирован вокруг генов кодирующих ферменты вовлеченные в синтез жирных кислот, углеводный обмен, пластидных транспортеров энергетического триозного шунта. Второй кластер - меньшего размера, преимущественно углеводный, концентрируется вокруг генов пластидных экспортеров и генов ферментов синтеза и деградации крахмала.

Для выявления влияния смены трофических условий на геномно-метаболомные кросс-взаимодействия было проведено сравнение карты корреляций экспрессии генов и содержания метаболитов. Показано, что при контрастном изменении режима питания происходит объединение кластеров вследствие роста корреляционных связей, что может быть признаком процессов адаптации происходящих в клетке.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-01122.

## Роль фитохром-индуцируемых факторов PIF1 и PIF3 в регуляции экспрессии генов каталитического димера сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы

The role of phytochrome-inducible factors PIF1 and PIF3 in regulation of gene expression catalytic dimer succinate dehydrogenase in maize leaves

Селиванова Н.В., Федорин Д.Н., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж. 394006, Воронеж, Университетская пл., д.1

+7 473 220-88-77, +7 473 220-87-55, bc366@bio.vsu.ru

Регуляция координации фотосинтеза и цикла Кребса, основными энергетическими путями растительной клетки, представляет большой научный интерес. Особое место в энергетическом метаболизме занимает сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.99.1), единственным ферментом цикла трикарбоновых кислот, встроенным во внутреннюю мембрану митохондрий. СДГ – компонент не только цикла Кребса, но и ЭТЦ митохондрий, поэтому его регуляция связана с функционированием сразу двух ключевых процессов, обеспечивающих клетку энергетическими эквивалентами. Однако, на свету основным поставщиком энергии является фотосинтез. Таким образом, очевидно, что свет играет ключевую роль регуляции фотосинтеза и дыхания. Однако, многие вопросы, касающиеся механизмов такой регуляции, требуют более детального изучения.

Исследование динамики активности сукцинатдегидрогеназы при изменении светового режима показало, что в условиях освещения активность исследуемого фермента незначительна по сравнению с данным показателем в темноте. Однако, полного ингибирования не происходит. Одним из действующих факторов, обеспечивающих светорегуляцию активности сукцинатдегидрогеназы, могут выступать фоторецепторы, фитохромы. Подобные механизмы были ранее показаны для других ферментов дыхательного метаболизма, в частности, НАДН-дегидрогеназ.

В опытах по влиянию красного (660 нм) и дальнего красного (730 нм) света, специфически рецептируемого фитохромами, на активность и уровень экспрессии генов каталитического димера *sdh1-2* и *sdh2-3* было показано, что красный свет вызывает изменения в работе генетического аппарата клетки, приводящие к уменьшению количества мРНК исследуемых генов СДГ, что проявляется в уменьшении активности исследуемого фермента. Противоположный эффект вызывает действие дальнего красного света. Его влияние на растения кукурузы способствует более интенсивной, 5-5.3 раза выше, экспрессии генов *sdh1-2* и *sdh2-3*.

С целью выяснения механизмов реализации фитохромного сигнала в растительной клетке проведено изучение изменения содержания свободных катионов кальция в ядрах клеток. Результаты ряда исследований свидетельствуют о четкой зависимости между содержанием кальция в ядрах клеток листьев кукурузы и состоянием фитохромной системы. При этом максимальное увеличение концентрации кальция в ядре наблюдается в первые

30 минут после облучения растений. Из полученных данных видно, что по истечении 30 минут после облучения КС растений количество кальция возросло в 1.4 раза.

Белки PIF (фитохром-индуцируемые факторы) относятся к семейству helix-loop-helix (HLH, спираль-петля-спираль) транскрипционных факторов и играют центральную роль в трансдукции фитохромного сигнала. Фитохром-зависимые факторы PIF1 и PIF3 имеют наибольшее сродство к фитохрому А. На основании результатов исследования экспрессии гена *pif3* в листьях кукурузы в условиях различного освещения можно заключить, что фактор PIF3 является посредником фитохромного сигнала в ядре растительной клетки. Активная форма фитохрома вызывает увеличение скорости транскрипции гена *pif3*, что в свою очередь имеет определенную корреляцию с интенсивностью работы генов *sdh1-2* и *sdh2-3*, проявляющуюся в снижении данного показателя. Кроме того, показано, что фитохромная система регулирует интенсивность накопления продуктов транскрипции гена *pif1* в зеленых листьях кукурузы. В условиях облучения растений красным светом происходит повышение уровня транскриптов исследуемого гена по сравнению с вариантом темнота. Однако, при облучении растений дальним красным светом не происходит изменения в интенсивности транскрипции гена *pif1*. активная форма фитохрома вызывает индукцию транскрипционных факторов PIF1 и PIF3, осуществляющих регуляцию транскрипции генов-мишеней, в частности *sdh1-2* и *sdh2-3*. Посредником в трансдукции фитохромного сигнала в ядре является PIF факторы, выступающие в роли киназ, фосфорилированная форма которых связывается с G-участком, обнаруженном в промоторе исследуемых генов *sdh1-2* и *sdh2-3* при анализе из нуклеотидных последовательностей, и регулирует их экспрессию.

Таким образом, установлено, что активная форма фитохрома вызывает уменьшение скорости экспрессии исследуемых генов, являясь механизмом световой регуляции цикла Кребса, как компонента дыхательного метаболизма. Посредником фитохромного сигнала являются внутриядерные факторы PIF1 и PIF3, осуществляющие регуляцию экспрессии генов *sdh1-2* и *sdh2-3* в листьях кукурузы, связываясь со специфическим G-участком промотора и регулируя присоединение к нему РНК-полимеразы.

## Растительные «мускулы»: эволюционные аспекты формирования

Plant muscles: evolutionary aspects of formation

Чернова Т.Е.<sup>1</sup>, Агеева М.В.<sup>1</sup>, Агадуллина А.И.<sup>2</sup>, Ибрагимова Н.Н.<sup>1</sup>, Горшкова Т.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, 420111, ул. Лобачевского, 2/31, Казань, Россия

+7 843 292-53-32, +7 843 292-73-47

<sup>2</sup> Казанский (приволжский) федеральный университет, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казань, Россия

*chernova.t@mail.ru*

Растительные волокна – наиболее широко распространенный тип механической ткани вегетативных органов наземных растений. Клетки растительных волокон обладают исключительной длиной (до нескольких сантиметров) и мощно развитой клеточной стенкой. По структуре и составу клеточной стенки волокна подразделяют на две группы – волокна с «типичной» лигнино-ксилановой клеточной стенкой и желатинозные. Известно, что желатинозные волокна наряду с первичной и вторичной клеточной стенкой способны формировать третичную клеточную стенку (желатинозную). Такой тип клеточной стенки в настоящее время описан только для волокон склеренхимы. Подробно охарактеризованы особенности структуры и состава желатинозной клеточной стенки, такие как высокое содержание целлюлозы и продольная ориентация её микрофибрилл, а также присутствие рамногалактуронана I в качестве основного матричного полисахарида. Именно наличие этого пектинового компонента и играет решающую роль в способности желатинозных волокон развивать контрактильные свойства и наряду с обеспечением прочности органа выступать в качестве растительных «мускулов», возвращающих согнутый побег в вертикальное положение.

Данных о возникновении растительных волокон в ходе эволюции немного, практически все они связаны с изучением волокон с клеточной стенкой ксиланового типа. Возникновение волокон склеренхимы связывают с выходом растений на сушу, в результате чего появилась необходимость в развитии механических тканей. В эволюционном отношении волокна появились достаточно рано, что подтверждается их обнаружением у ископаемых древовидных папоротникообразных. Открытым остается вопрос о происхождении желатинозных волокон.

Цель настоящей работы: проанализировать распространенность желатинозных волокон среди представителей эволюционно разобщенных таксонов высших сосудистых растений и исследовать возможные изменения состава и структуры их клеточной стенки в ходе эволюции растений.

В ходе выполнения работы было исследовано 50 видов, относящихся к 21 порядку современных высших сосудистых растений. В качестве методов использованы конфокальная и световая микроскопия в сочетании с поляризованным светом, иммуноцитохимия с набором моноклональных антител. Выделенные полисахариды клеточных стенок исследованы также различными методами хроматографии и с помощью иммуноферментного анализа с набором моноклональных антител. Принадлежность анализируемых волокон к желатинозному типу осуществляли по ряду признаков, характерных для клеточной стенки желатинозного типа, таких как толщина клеточной стенки, степень ее лигнификации, ориентация микрофибрилл целлюлозы, наличие эпитопов к моноклональным антителам, специфичным к остову рамногалактуронана I и боковым цепочкам из галактозы или арабинозы.

В результате проведенного исследования способность к формированию механических тканей с клеточной стенкой желатинозного типа обнаружена у 27 видов растений, относящихся к 11 порядкам. Это в том числе представители ранних в эволюционном отношении порядков сосудистых растений *Lycopodiales* и *Equisetales*, а также виды группы настоящих двудольных (*Core eudicots*) - порядки *Cucurbitales*, *Rosales*, *Fabales*, *Malpighiales*, *Vitales*, *Lamiales* и *Asterales*. Установлено, что желатинозные волокна всех проанализированных таксонов объединяют общие характеристики их клеточных стенок: отсутствие лигнификации во внутреннем слое, присутствие эпитопов к антителам, специфичным к остову или боковым цепочкам рамногалактуронана I, продольная ориентация микрофибрилл целлюлозы. Обнаружено, что в ходе эволюции растений клеточная стенка желатинозных волокон претерпевала изменения, вероятно, связанные с составом матричных полисахаридов и организацией их надмолекулярной структуры, о чем свидетельствуют данные о взаимоисключающем иммуномечении антителами на остов рамногалактуронана I и боковые галактановые цепочки у представителей порядков *Rosales* и *Malpighiales*.

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-05721).

## Стендовые доклады

### Желатинозная клеточная стенка механических тканей побега хвоща (*Equisetum arvense* L.)

Агадуллина А.И.<sup>1</sup>, Чернова Т.Е.<sup>2</sup>, Агеева М.В.<sup>2</sup>, Ибрагимова Н.Н.<sup>2</sup>, Горшкова Т.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский (приволжский) федеральный университет, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казань, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, ул. Лобачевского, 2/31, Казань, Россия

+7 843 292-53-32, +7 843 292-73-47, [sunny.agadullina@mail.ru](mailto:sunny.agadullina@mail.ru)

Клеточная стенка – неотъемлемая часть растительной клетки, необходимость и функциональную значимость которой для жизнедеятельности клетки и всего растения в целом сложно переоценить. Общеизвестно, что клеточная стенка построена из четырех основных групп компонентов небелковой природы – целлюлозы, связующих гликанов, пектиновых веществ и фенольных соединений. Соотношение, состав и структурные особенности основных компонентов весьма разнообразны как в клеточных стенках растений – представителей разных таксонов, так и в клетках, относящихся к различным тканям в пределах одного растения.

Наименее изученный к настоящему моменту тип клеточной стенки – желатинозный, представляет собой третичную клеточную стенку, т.е. стенку, которая откладывается вслед за вторичной. Для желатинозной клеточной стенки характерно высокое содержание целлюлозы (до 80%), продольная ориентация ее микрофибрилл, отсутствие или низкое содержание ксилана и лигнина, а также присутствие такого пектинового компонента как рамногалактуронан I с боковыми цепочками из галактозы или арабинозы. Этот тип клеточной стенки описан только для растительных волокон, получивших название желатинозных. Волокна с клеточной стенкой желатинозного типа характерны для многих видов покрытосеменных растений, в частности, к числу таких клеток относятся волокна лубоволокнистых культур – льна, конопля и рами.

Известно из литературных источников, что волокна склеренхимы присутствуют также в побегах хвоща, но полисахаридный состав их клеточных стенок предметно не анализировался. Кроме того, хвощ весьма интересен как один из представителей наиболее древних сосудистых растений и исследование клеточной стенки его тканей, возможно, позволит лучше понять изменения, произошедшие с такой комплексной и сложно организованной структурой как клеточная стенка в ходе эволюции растений. Клеточная стенка механических тканей наземных побегов хвоща (*Equisetum arvense* L.) проанализирована методами конфокальной микроскопии, иммуноцитохимии, биохимии и иммуноферментного анализа. Обнаружен ряд признаков, характерных для клеточных стенок желатинозного типа, к

числу которых относятся: отсутствие лингнификации во внутреннем слое, продольная ориентация микрофибрилл целлюлозы, присутствие рамногалактуронана I с боковыми цепями из галактозы и арабинозы. Полученные результаты указывают на желатинозный тип клеточной стенки механических тканей побега хвоща. Это в свою очередь свидетельствует о более широком распространении желатинозной клеточной стенки в растительном мире и о раннем ее появлении в ходе эволюции растений. Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-05721).

## Влияние клиностаტიрования на организацию актиновых микрофиламентов в клетках корней проростков арабидопсиса

### *Clinorotation affect actin microfilament organization in root cells of Arabidopsis seedlings*

Банкин М.П., Пожванов Г.А., Смоликова Г.Н., Медведев С.С.

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра физиологии и биохимии растений, Университетская наб. 7/9, 199034 Санкт-Петербург, Россия

*mikle.p.bankin@gmail.com*

Гравитация является самым постоянным фактором окружающей среды, определяющим развитие растений в пространстве. Она обуславливает нормальное развитие и морфологию растительного организма, необходима для поддержания ориентации побегов и роста корней в почве. Растения способны "оценивать" свое положение относительно вектора силы тяжести и при необходимости корректировать его за счет поляризованного роста. Однако на орбитальных космических станциях растительные организмы находятся в условиях микрогравитации, при которых ускорение свободного падения близко к нулю, что может нарушать развитие растений. Медленные клиностаты, вращающиеся со скоростью 2–5 об/мин., позволяют моделировать эффекты микрогравитации в земных условиях. Клиностаტიрование моделирует невесомость за счет вращения растения вокруг горизонтальной оси (или нескольких осей), что дезориентирует изучаемый объект в поле силы тяжести. Вращение на клиностатах лишает растение возможности воспринимать гравитационный стимул, так как положение растения постоянно меняется по отношению к вектору гравитации. Целью работы являлось изучение влияния клиностаტიрования на организацию актиновых микрофиламентов в клетках корней растений арабидопсиса. Визуализацию цитоскелета проводили с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Объектом исследования служили 7-суточные проростки *Arabidopsis thaliana*, трансформированные конструкцией GFP-fABD2. В этих трансгенных растениях визуализация цитоскелета возможна *in vivo* без необходимости фиксации и дополнительных обработок.

## С-1. Системная биология растений

По результатам проведенных экспериментов нами было установлено, что для клеток зоны роста корней этиолированных растений fABD2-GFP, выращенных в условиях клиностатирирования, характерно доминирование наклонных и аксиальных микрофиламентов, представленных практически в равных долях с небольшим увеличением в сторону последних. Доля поперечно ориентированных микрофиламентов возрастает в несколько раз по сравнению с вертикально растущим контролем. У клиностатирированных растений fABD2-GFP, выращенных на свету, наблюдается преимущественно аксиальная ориентация микрофиламентов, что характерно для контрольных вариантов. Таким образом, у растений fABD2-GFP, выращенных на свету в условиях клиностатирирования, поляризующую роль гравитропической реакции мог взять на себя фототропизм.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИР СПбГУ № 1.38.233.2014 и гранта РФФИ № 14-04-01-624 с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» (проект 109-5664).

Вторичные соединения лекарственных растений *Matricaria chamomilla* L., *Artemisia absinthium* L., *Ricinus communis* L. и *Tenacetum vulgare* L. как потенциальная основа для получения биогербицидов

Secondary compounds of medicinal plants *Matricaria chamomilla* L., *Artemisia absinthium* L., *Ricinus communis* L. and *Tenacetum vulgare* L. as a potential basis for the creation bioherbicides

Ларикова Ю.С., Давыдова А.Н., Кондратьев М.Н.

ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева. 127550, Москва, Тимирязевская 49, кафедра физиологии растений

[red-green216@mail.ru](mailto:red-green216@mail.ru)

Помимо участия в передаче химического сигнала, вторичные метаболиты фенольной и терпеновой природы участвуют в аллелопатических взаимоотношениях между видами в растительных сообществах. Лекарственные растения особенно богаты такими соединениями, в связи с чем многие представители естественной флоры используются в народной и официальной медицине. В последние 10 лет активизировались исследования, направленные на выявление потенциальных биогербицидных эффектов вытяжек из семян и вегетативных органов травянистых медицинских растений. В этой связи нами исследовано биогербицидное действие водных вытяжек из семян лекарственных растений - ромашки лекарственной (*Matricaria chamomilla* L.), полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.), клещевины обыкновенной (*Ricinus communis* L.) и пижмы обыкновенной (*Tenacetum vulgare* L.) на всхожесть семян сорных растений: ярутки полевой



(*Thlaspi arvense* L.) и щирицы запрокинутой (*Amaranthus retroflexus* L.). Для получения вытяжек брали по 5 г семян лекарственных растений, заливали 50 мл горячей водопроводной воды и настаивали в течение суток, периодически помешивая. Вытяжки фильтровали через стеклянную вату и хранили при охлаждении до использования. Для экспериментов готовили следующие разбавления водных экстрактов (отношение экстракт: вода): 1:1, 1:2, 1:4, 1:8. Контроль – семена, проросшие в воде. Перед проращиванием семена дезинфицировали 10%-ным раствором  $H_2O_2$  в течение 5 минут. В стерилизованные чашки Петри помещали по 100 наклюнувшихся семян целевых видов, заливали 4 мл рабочего раствора в соответствии со схемой и проращивали при 22°C. Ростовые характеристики проростков измерялись по истечении трёх и семи суток проращивания. Повторность в вариантах – трёхкратная. Опыт дважды проводился во времени с интервалом в один месяц. При формировании растительного сообщества конкуренция между видами с участием аллелопатических соединений начинается с момента прорастания семян. Тем не менее, негативный эффект на всхожесть семян целевых растений оказали водные вытяжки из плодов пижмы, семян полыни горькой и семян ромашки (разведения от 1:1 до 1:8). Водные вытяжки из плодов клещевины эффекта на всхожесть семян сорных растений оказывали слабый эффект, что, по-видимому, объясняется наличием у её плодов прочной толстой оболочки, не содержащей ингибиторов, действующих на прорастание семян и плодов других видов.

Ответные реакции проростков целевых растений на обработку водными вытяжками из семян лекарственных растений зависели от вида лекарственного растения, степени разведения исходного экстракта, а также от вида целевого растения. Гипокотили проростков щирицы, запрокинутой оказались более чувствительными к компонентам вытяжек из семян ромашки, в то время как гипокотили ярутки полевой в основном ингибировались компонентами полыни и при малых разведениях (1:1 и 1:2) также компонентами экстракта из семян ромашки и пижмы. Компоненты водной вытяжки из семян клещевины оказывали слабый эффект на рост гипокотилей целевых растений, но существенно уменьшили рост корня проростков щирицы, запрокинутой при разведениях (от 1:1 до 1:8). По истечении семи дней проращивания выявилось, что корни целевых растений оказались более чувствительными к воздействию вторичных соединений экстрактов из семян лекарственных растений.

Таким образом, компоненты вытяжек из семян лекарственных растений обладают определённым эффектом, ингибирующим прорастание семян сорных растений. Однако ответная реакция проростков семян сорных растений зависела от источника вторичных соединений (вида лекарственного растения), концентрации вытяжки и вида целевого растения.

## Рецепторы цитокининов как регуляторы экспрессии хлоропластных генов в процессе старения интактных листьев *Arabidopsis thaliana*

Cytokinin receptor as regulators of chloroplast gene expression during senescence of intact leaves in *Arabidopsis thaliana*

Данилова М.Н., Дорошенко А.С., Кудрякова Н.В., Рахманкулова З.Ф., Кузнецов В.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Россия, 127276, Москва, ул. Ботаническая, д. 35.

+7 499 231-83-94, +7 499 977-80-18

Реализация генетической программы роста, развития и старения растительного организма происходит под контролем многочисленных сигнальных систем растений. Хлоропласты органично включены в жизнедеятельность растений, и поэтому их функционирование подчиняется общим онтогенетическим программам. В процессе естественного старения растения фотосинтетически-активные хлоропласты зрелого листа превращаются в геронтопласты. Формирование геронтопласта из хлоропласта включает деструктивные изменения ультраструктуры мембран, распад пигментов и деградацию тилакоидных белков. Помимо структурных изменений в ходе старения происходит перепрограммирование генома, в результате чего на фоне снижения экспрессии фотосинтетических генов наблюдается усиление экспрессии пула генов связанных со старением (*SAG* - senescence-associated genes).

Цитокинины (ЦК) – классические фитогормоны, одним из проявлений физиологической активности которых является задержка старения листьев. Важной мишенью действия цитокининов являются пластиды. Показано, что цитокинины стимулируют экспрессию генов пластидного кодирования как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях. В настоящее время принято считать, что рецепция сигнала ЦК в растительной клетке осуществляется тремя сенсорными гистидинкиназами АНК4/CRE1, АНК2 и АНК3 (от англ. *Arabidopsis histidine kinases*), которые наряду с функциональным сходством обладают некоторыми особенностями.

Целью данного исследования являлось изучение роли ключевых сигнальных посредников пути передачи ЦК сигнала - его рецепторов в гормональной регуляции экспрессии хлоропластного генома в процессе старения интактных листьев. Анализ проводили на 6-м листе интактных 7-недельных одинарных (*ahk2*, *ahk3* и *ahk4*) и двойных (*ahk2ahk4*, *ahk2ahk3* и *ahk3ahk4*) инсерционных нокаут-мутантах *A. thaliana* по генам рецепторов ЦК. В качестве контрольного растения использовали дикий тип (ДТ) Columbia-0 (Col-0), который служил родительской линией при создании мутантов *ahk*. Количественное исследование экспрессии пластидных генов проводили при помощи метода ПЦР после обратной транскрипции в режиме реального времени на приборе ABI 7500 Fast. Индукцию флуоресценции ФСП регистрировали с использованием импульсного флуориметра PAM-101 (“Walz”, Германия).

Анализ суммарного хлорофилла стареющих растений показал, что мутанты с инактивированным геном *АНК2* (*ahk2*, *ahk2ahk4* и *ahk2ahk3*) отличались достоверно большим содержанием этого пигмента в старых листьях по сравнению с ДТ и другими мутантными линиями. При этом у мутантов с инактивированным геном *АНК2*, на фоне подавленного уровня мРНК гена маркера старения *SAG12*, наблюдали повышенное по сравнению с ДТ содержание матриц фотосинтетических белков ядерного (*CAB2*, *RbcS*, *LHCb2.4*), и пластидного кодирования (*rpoB*, *rpl16*, *rps14*, *psaA*, *psaB*, *psbD*, *atpB* и *rbcL*). Напротив, отсутствие функционально-активного белкового продукта гена *АНК3* приводило к увеличению содержания матриц гена *SAG12* по сравнению с диким типом, что согласуется с ранее установленной способностью этого рецептора негативно регулировать старение отделенных листьев в темноте.

Инактивация гена *АНК2* также вызывала достоверное замедление сроков выноса цветоносов, зацветания, образования стручков и их созревания у одинарного мутанта *ahk2* и особенно у двойных мутантов *ahk2ahk4* и *ahk2ahk3*. Достоверно увеличенный максимальный квантовый выход флуоресценции (Fv/Fm) у мутантных растений *ahk2*, *ahk2ahk4* и *ahk2ahk3* по сравнению с ДТ и мутантами *ahk3*, *ahk4* и *ahk3 ahk4* отражает повышенную эффективность использования света ФСII.

Таким образом, результаты работы позволяют предположить, что участники канонической двухкомпонентной системы передачи ЦК сигнала различаются по своей способности контролировать функциональное состояние листьев в ходе онтогенеза растения и переход к репродуктивной фазе развития. Полученные данные дают основания рассматривать рецептор цитокинина АНК2 в качестве положительного регулятора старения листьев. Однако остается не выясненным прямо или косвенно этот белок вовлечен в сигнальные цепи, контролирующие долголетие листа и состояние его фотосинтетического аппарата. Предстоит также установить непосредственные транскрипционные регуляторы располагающиеся в сигнальной цепи трансдукции ЦК сигнала после рецептора АНК2.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-00818.

## Зависимость продолжительности митотических циклов в корнях от гаплоидного содержания ДНК

Dependence of mitotic cycle duration in roots on haploid DNA content

Жуковская Н.В., Быстрова Е.И., Иванов В.Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая, 35, Москва, Россия

+7 499)231-83-24, zhukovskayanv@rambler.ru, ivanov\_vb@mail.ru

Среди травянистых покрытосеменных растений гаплоидное содержание ДНК ( $C_{val}$ ) варьирует в широких пределах от 0,06 (*Genlisea aurea* A.St.-Hil.) до 152,6 пг (*Paris japonicum* Franchet). До сих пор до конца не выяснены причины и физиологические последствия такого широкого варьирования содержания ДНК. Уже давно было отмечено, что по мере повышения  $C_{val}$  удлиняется продолжительность митотического цикла ( $T$ ), которая была определена в корнях растений. Однако эти исследования были проведены на ограниченном числе видов. В настоящей работе с помощью разработанного нами расчетного метода была определена  $T$  в корнях 57 видов однодольных и 60 видов двудольных. Были изучены корни проростков и придаточные корни, полученные при проращивании луковиц однодольных.

В клетках однодольных содержание ДНК варьирует в более широких пределах, чем у двудольных.  $T$  нелинейно зависит от  $C_{val}$ .  $T$  мало меняется при значениях  $C_{val}$  до 8 пг. Далее слабо увеличивается до 20 пг и более резко при высоких значениях  $C_{val}$ . Среди изученных нами видов двудольных не было видов с  $C_{val}$  больше 14 пг. Проведенные нами подсчеты по базе данных по  $C_{val}$ , опубликованные ботаническим садом Kew, показали, что процент видов среди травянистых растений до 8 пг составляет однолетних однодольных – 53%, многолетних однодольных – 41%, однолетних двудольных – 85%, многолетних двудольных – 81%. Таким образом, заметное увеличение  $T$  с увеличением  $C_{val}$  наблюдается в большей степени у однолетних растений. При значениях  $C_{val}$  больше 20 пг практически нет однолетних растений. При меньших значениях  $C_{val}$  продолжительность  $T$  у однолетних и многолетних мало отличаются. Большие средние значения  $T$  у многолетних по сравнению с однолетниками обусловлены отсутствием однолетних с большими значениями  $C_{val}$  и  $T$ .

При сравнении растений разных семейств можно отметить наличие положительной корреляции между  $C_{val}$  и  $T$ . Однако нужно принять во внимание, что пока изучено относительно мало видов. Сравнение  $T$  разных сортов одного вида, проведенное нами на кукурузе и горохе, показало, что  $T$  может отличаться в корнях проростков разных сортов до 30%.

В корнях разных видов  $T$  варьирует в пределах от 7 до 25 ч и только у однодольных она заметно превышает этот диапазон. Таким образом, различия в  $T$  относительно невелики среди большинства видов тогда как размеры и скорости роста их корневых систем заметно отличаются. Это показывает, что

регуляция скорости роста происходит за счет других механизмов, а именно – регуляции размеров меристем (числа делящихся клеток).

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 15-04-02502а.

## Метаболические изменения фотосинтетического аппарата яблони в условиях высокотемпературного стресса

Metabolic changes of the photosynthetic apparatus of apple in the high-temperature stress

Киселева Г.К., Ненько Н.И., Ульяновская Е.В., Караваева А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства», 350901, ул. им. 40-летия Победы, 39, г. Краснодар, Россия  
+7 861 252-70-74; +7 861 257-57-02; galina-kiseleva-1960@mail.ru

Способность плодовых растений к росту и развитию без снижения продуктивности в неблагоприятных экологических условиях в значительной степени определяется наличием системы адаптационных реакций, которые связаны с глубокими изменениями в обмене веществ. Среди абиотических факторов, действующих на плодовое растение, особое место принадлежит температуре. Особенности действия температурного фактора различной интенсивности на устойчивость растений проявляются в изменении направленности физиолого-биохимических процессов, связанных с различными сторонами метаболизма.

Цель – изучить метаболические изменения фотосинтетического аппарата яблони в условиях высокотемпературного стресса в летний вегетационный период 2013-2015 гг.

Объектами исследований служили сорта яблони различного происхождения: диплоидные: Айдаред, Эрли Мак, Дейтон (США), Лигол (Польша), Персиковое, Прикубанское, Рассвет, Фортуна (Россия, СКЗНИИСиВ); триплоидные Союз, Родничок (Россия, СКЗНИИСиВ). Для оценки метаболических изменений фотосинтетического аппарата в условиях высокотемпературного стресса определяли содержание органических кислот цикла Кребса, фенолкарбоновых кислот, абсцизовой кислоты, малонового диальдегида, пероксидазы.

По установленной динамике содержания отдельных метаболитов в течение летнего вегетационного периода судили об интенсивности физиолого-биохимических изменений, происходящих в тканях листового аппарата в процессе адаптации их к повышенным температурам. Известно, что засухоустойчивость растений коррелирует с повышенным содержанием органических кислот цикла Кребса, являющихся субстратом для окислительных процессов, активирующихся в послестрессовый период.

В 2013-2015 гг. в августе у сортов Союз, Рассвет, Родничок увеличивалось содержание суммы органических кислот цикла Кребса, что характеризует повышение интенсивности дыхания, и снижалось содержание абсцизовой

## С-1. Системная биология растений

кислоты, свидетельствующее об активации обменных процессов, связанных с адаптацией этих сортов к засухе и жаре. Абсцизовая кислота относится к числу основных факторов торможения тех или иных процессов метаболизма в связи с их физиологической необходимостью, известна ее ключевая роль в индукции защитных механизмов растений в ответ на воздействие разнообразных неблагоприятных факторов окружающей среды.

Функционирование системы антиоксидантной защиты также может быть охарактеризовано такими показателями, как активность фермента пероксидазы и содержание малонового диальдегида - продукта деградации полиненасыщенных жирных кислот в мембранах клеток под действием активных форм кислорода и характеризующего степень повреждающего действия стресс-фактора на растения.

В начале летнего вегетационного периода 2013-2015 гг. более низким содержанием малонового диальдегида характеризовался сорт Айдаред и большим – сорта Лигол и Прикубанское. Самое высокое значение активности пероксидазы было у сорта Лигол. Отмечалась высокая степень корреляции между содержанием малонового диальдегида и фенолкарбоновых кислот (Ккоррел.= 1,0), защищающих мембраны от окислительного стресса.

При воздействии высокотемпературного стресса в модельном опыте содержание малонового диальдегида увеличивалось у сорта Айдаред на 38,6 %, Лигол – на 13,3 % и Прикубанское – на 11,0 %. В августе 2013-2015 гг. содержание малонового диальдегида в листьях яблони увеличилось у сорта Айдаред на 245,4 %, у сорта Лигол – на 259,8 % и у сорта Прикубанское – на 178,7 %, что характеризует последний, как более устойчивый к жаре в условиях летнего вегетационного периода.

Установлено, что во все месяцы летнего вегетационного периода 2013-2015 гг. метаболические изменения фотосинтетического аппарата яблони сортов яблони отечественной селекции, особенно триплоидных приводят к повышенному содержанию абсцизовой кислоты, органических и фенолкарбоновых кислот, малонового диальдегида, пероксидазы, что позволяет поддерживать достаточно высокий уровень физиологических процессов в засушливый период.

## Накопление масла семенами растений сои *Glycine max* L.: особенности разных сортов

Oil accumulation by seeds of soybean *Glycine max* L. plants: particularities of different varieties

Кистол М.К., Харчук О.А.

Институт генетики, физиологии и защиты растений АНМ, ул.Лесная, 26,  
г.Кишинев, Республика Молдова

+373 69245257, [kharchuk.biology@mail.ru](mailto:kharchuk.biology@mail.ru)

В последние десятилетия возрастает интерес к сое, как одной из основных культур с высоким содержанием белка и масла. Семена соевых бобов содержат до 50% белка с высоким содержанием незаменимых аминокислот, а также до 26 % масла. Почвенно-климатические условия в Молдове благоприятны для выращивания сои. Плодородные черноземы районов страны, в совокупности с распределением температур и атмосферных осадков, позволяют получать высокие урожаи зерна сои.

Целью работы было изучение закономерностей накопления масла в семенах контрастных сортов сои. Исследования проводили в 2014 г. с растениями сои двух районированных в Молдове сортов - Алина и Аура, в условиях вегетационного комплекса (в сосудах на 10 л), а также на полях Института генетики, физиологии и защиты растений. В конце вегетационного периода собранные семена сои сорта Аура характеризовались массой от 70 до 230 мг, а сорта Алина – от 50 до 180 мг. В полевом опыте средняя масса семян сорта Аура составила 133-150 мг (с увеличением массы при дополнительном внесении удобрений) с масличностью 22-23%. Средняя масса семян сои сорта Алина существенно ниже, 89-90 мг (независимо от удобрений) при масличности 19-20%. И в полевых условиях, и в условиях вегетационного комплекса растения сои сорта Алина характеризовались существенно более высокими величинами водного дефицита листьев по сравнению с таковыми сорта Аура, как в условиях достаточной влагообеспеченности растений, так и при почвенной засухе. Содержание масла в семенах определяли методом спинового эха ядерного магнитного резонанса.

Данные по накоплению масла в семенах подтвердили ранее установленную закономерность, что содержание масла в семенах строго коррелирует с массой семян. При этом для более мелких семян (массой преимущественно до 100 мг) содержание масла увеличивается с ростом массы семян (первая фаза накопления масла в семенах). При дальнейшем росте массы семян скорость роста концентрации масла в них уменьшается, вплоть до нулевой (вторая фаза накопления масла в семенах). В крупных семенах сорта Аура (массой преимущественно более 200 мг) концентрация масла в семенах снижается с ростом массы семян (третья фаза накопления масла в семенах). Для мелкосемянного сорта Алина отмечено наличие только первой и второй фаз накопления масла в семенах (без фазы снижения концентрации масла в семенах). Для сорта Аура, который характеризуется более крупными семенами, отмечено наличие всех трех фаз накопления масла в семенах.

## С-1. Системная биология растений

В целом, в процессе роста семян на растении содержание масла в семенах строго коррелирует с массой семян. Первые две фазы, связанные с накоплением масла на начальных этапах роста и наполнения семян, переходят в заключительный этап - уменьшения концентрации масла с увеличением массы семян. Зависимость содержания масла в семенах от их массы зависит от генетики и физиологии растений сои. Накопление масла в семенах растений сои сорта Аура характеризуется наличием всех трех фаз. Для растений сорта Алина выявлены только первые две фазы, что связано с более напряженным водным статусом листьев растений этого сорта.

### Активность ферментов диссимиляции сахарозы в раннем онтогенезе разных форм Березы повислой

Activity of sucrose dissimilating enzymes in early ontogenesis of silver birches different forms.

Мощенская Ю.Л., Галибина Н.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса Карельского научного центра Российской академии наук, Пушкинская ул., 11, г. Петрозаводск

+7 8142 76-81-60, [tselishcheva.yulia@mail.ru](mailto:tselishcheva.yulia@mail.ru)

Сахароза является субстратом многих биохимических превращений, обеспечивающих рост и развитие проводящих тканей ствола древесных растений. У растений березы повислой сахароза является основным транспортным метаболитом на протяжении всего вегетационного периода. Ферментная система деградации сахарозы у растений включает в себя сахарозосинтазу (СС) (К.Ф. 2.4.1.13), цитоплазматическую, вакуолярную и апопластную инвертазы (ЦпИнв, ВакИнв, АпИнв) (К.Ф. 3.2.1.26). Ранее на взрослых растениях разных форм березы повислой мы показали различия в моделях распределения активности СС и АпИнв в ксилеме в период активной камбиальной деятельности: у растений обычной березы повислой высокие значения активности СС наблюдаются на фоне пониженной активности АпИнв. Переход к узорчатому строению древесины приводит к смене направления дифференцировки клеток камбия в сторону увеличения числа паренхимных клеток и переориентации метаболизма акцепторных тканей на накопление запасных метаболитов. При этом возрастает вклад АпИнв в процесс диссимиляции сахарозы в акцепторных тканях ствола, о чем свидетельствует высокая ее активность, а значения активности СС в ксилеме резко снижаются. Дальнейшие исследования показали, что в ксилеме безузорчатых деревьев карельской березы также существуют различия в распределении активности основных сахарозорасщепляющих ферментов. Это дает основание полагать, что нарушение функционирования ферментных систем углеводного обмена у карельской березы происходит еще до начала формирования аномальной древесины в ходе раннего онтогенеза растений.



В результате проведенной работы исследована активность СС и АпИInv в акцепторных тканях (стебли, корни) сеянцев обычной березы повислой (*Betula pendula* Roth var. *pendula*) и карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica*), выращенных из семян, полученных в результате контролируемого опыления. Возраст растений на момент исследования составил 7, 17, 32 недели.

Результаты исследования показали, что значения суммарной активности ферментов диссимиляции сахарозы выше в стволе, чем в корнях, что свидетельствует о преимущественном использовании синтезируемых метаболитов на формирование приростов древесины. Показано, что у 7-недельных сеянцев не наблюдается значимых различий в активности изучаемых ферментов между растениями обычной березы повислой и карельской березы.

У растений в возрасте 17, 32 недели возрастает суммарная активность сахарозорасщепляющих ферментов, по сравнению с 7-недельными. Показано, что у растений данного возраста уже происходит формирование четких различий моделей распределения активности АпИInv и СС. Согласно полученным значениям активности ферментов, у растений, выращенных из семян карельской березы, деградация сахарозы в акцепторных тканях происходит преимущественно за счет деятельности АпИInv, у растений обычной березы повислой – за счет сахарозосинтазного расщепления сахарозы.

Таким образом, в ходе проведенной работы было показано, что у растений обычной березы повислой и карельской березы, еще не имеющих видимых отклонений в развитии древесины ствола преобладают принципиально разные пути углеводного обмена, о чем свидетельствует различия в распределении активности СС и АпИInv.

Флавоноиды в железистых трихомах *Tussilago farfara* (*Asteraceae*) и экспрессия генов их биосинтеза

Flavonoids in the glandular trichomes in *Tussilago farfara* (*Asteraceae*) and expression of three enzymes of flavonoid biosynthesis

Муравник Л.Е.<sup>1</sup>, Шаварда А.Л.<sup>2</sup>, Райко М.П.<sup>3</sup>, Костина О.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ботанический институт им. В.Л. Комарова, лаборатория анатомии и морфологии. ул. Профессора Попова, 2, Санкт-Петербург, Россия  
+7 812 3725466, +7 812 3725443, LMuravnik@binran.ru

<sup>2</sup> Ботанический институт им. В.Л. Комарова, лаборатория аналитической фитохимии. ул. Профессора Попова, 2, Санкт-Петербург, Россия  
+7 812 3725408, +7 8123 725443, AShavarda@binran.ru

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Центр геномной биоинформатики Т. Добжанского, Средний пр., 41 А, Санкт-Петербург, Россия  
+7 812 3636103, mike.rayko@gmail.com

Фенольные соединения выполняют в растениях разнообразные функции: они являются ростовыми регуляторами, защищают от патогенов и неблагоприятных климатических факторов, играют роль сигнальных молекул. Присутствие флавоноидов, кумаринов, танинов или нафтохинонов в покровных тканях обусловлено их бактерицидными, фунгицидными или инсектицидными свойствами. Фенольные соединения образуются в листьях и цветках многих видов покрытосеменных растений, в том числе у сложноцветных. Известно, что на поверхности надземных органов широко распространены железистые трихомы, как ромашка, календула, арника, мать-и-мачеха, подсолнечник, лопух и многих других формируются железистые трихомы. Именно железистые трихомы используются специалистами разного профиля в качестве удобной модельной системы для изучения процессов биосинтеза вторичных метаболитов.

На поверхности вегетативных и репродуктивных органов *T. farfara* формируются головчатые железистые трихомы на длинной ножке. Ультраструктура их секреторных клеток имеет специфические особенности, включающие формирование густой сети трубчатых элементов агранулярного эндоплазматического ретикулума, присутствие лейкопластов и хлоропластов разнообразной формы, наличие темных включений в пластидных ламеллах, ретикулярных обкладок вокруг лейкопластов, а также черных аморфных отложений в цитозоле. С пластидами и мембранами эндоплазматического ретикулума принято связывать последовательные этапы биосинтеза фенольных соединений.

В результате проведения метаболитного профайлинга метанольных экстрактов трихом, покрывающих цветонос, брактеей, листочки обертки и листья мать-и-мачехи, было идентифицировано и количественно охарактеризовано 45 соединений. Среди них выявлены органические кислоты,

сахара, полиолы, фенолы, стеролы и терпеноиды. Содержание ряда веществ в трихомах оказалось во много раз выше, чем в экстрактах из органов, на которых эти железки формируются. Метаболитный состав в экстрактах из цветоносов, брактей и листочков обертки биохимически сходен с метаболитами из листовых экстрактов, для него характерно более высокое содержание фумаровой и треоновой кислоты, гидрохинона и фитола. Среди метаболитов из экстрактов трихом отмечается высокое содержание кофейной и хлорогеновой кислот, а также кверцетина и кемпферола, относящихся к флавоноидам.

Огромное разнообразие флавоноидов достигается с помощью согласованного действия свыше 20 ферментов, которые сначала синтезируют халконы, а затем флавоны, флавонолы, катехины или антоцианидины. Среди ферментов, принимающих участие в начальных этапах биосинтеза флавоноидов и фенилпропаноидов, обязательными являются фенилаланинаммиаклиаза, циннамат 4-гидроксилаза, 4-кумарат: КоА лигаза и халконсинтаза. Гены, кодирующие эти ферменты, известны для ограниченного числа видов *Asteraceae*. В результате секвенирования транскриптома железистых трихом и листьев мать-и-мачехи получено 29041 фрагментов длиной более 500 нуклеотидных пар. Среди собранных транскриптов выявлены наиболее вероятные гены-кандидаты с самыми длинными открытыми рамками считывания, для которых в базах SwissProt и Uniref были определены наиболее близкие гомологи, а также функциональные домены. Собранный транскриптом *T. farfara* выложен в базу NCBI. Установлено, что в трихомах активно экспрессируются гены, отвечающие за синтез флавоноидов и фенилпропаноидов – халконсинтаза, халкон-флавонон изомераза и кафеат-О-метилтрансфераза. В листьях закономерно с большей интенсивностью работают гены ферментов, которые присутствуют в хлоропластах и участвуют в фотосинтезе (рибулозобисфосфаткарбокксилаза и хлорофилл а/б-связывающий белок 3С).

## Метаболомная характеристика устойчивости сортов винограда к высокотемпературному стрессу

### Metabolome characteristics of resistance of grape varieties to high temperature stress

Ненько Н.И., Ильина И.А., Киселева Г.К., Схаляхо Т.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства», 350901, ул. им. 40-летия Победы, 39, г. Краснодар, Россия  
+7 861 252-70-74, +7 861 257-57-02, [nenko.nataliya@yandex.ru](mailto:nenko.nataliya@yandex.ru)

За последнее время в связи с потеплением климата отмечается изменение гидротермических условий в целом ряде регионов России, в том числе и в анапо-таманской зоне, где расположена ампелографическая коллекция ФГБНУ АЗОСВиВ. За период 2013-2015 гг. здесь отмечалось снижение выпадения осадков в июне на 91,5 %, в июле – на 88,3 % и в августе на 100 %, при этом максимальная температура воздуха повысилась в июне на 2°C, в июле – на 7°C и в августе – на 4°C, соответственно. Наиболее жестокая засуха была в августе 2015 г., когда у растений винограда отмечались репарационные процессы, что оказало отрицательное влияние на их фотосинтетическую деятельность. Объектами исследований являлись сорта винограда евро-американского происхождения Достойный и Красностоп АЗОС среднего срока созревания, и сорт Кристалл амуро-евро-американского происхождения раннего срока созревания, Растения винограда одного 1995 года посадки, подвой Кобер 5ББ. Формировка – двусторонний высокоштамбовый спиральный кордон АЗОС.

В условиях лета 2013-2015 гг. оводненность листьев изучаемых сортов винограда в большей степени коррелировала с количеством выпавших осадков (Ккоррел = 0,9-1,0), у сортов Кристалл и Красностоп АЗОС - с минимальной температурой воздуха (Ккоррел = 0,9-1,0), у сорта Достойный - с максимальной и среднемесячной температурой воздуха (Ккоррел = 0,9-1,0), а в условиях засухи 2015 г. – с количеством выпавших осадков (Ккоррел = 0,7-0,9), а также средней и максимальной температурой воздуха (Ккоррел = 0,8 – 1,0). В 2015 г. в августе, в сравнении с июлем, у сортов Кристалл и Достойный отношение содержания связанной воды к свободной практически не изменяется, а у сорта Красностоп АЗОС снижается на 53 %, что характеризует у него пониженную водоудерживающую способность. За анализируемый период следует отметить постепенный рост корреляционной зависимости между содержанием связанной формы воды и осмопротекторов (пролин и сахара). У сортов Кристалл и Достойный водоудерживающая способность в условиях засухи обусловлена большим содержанием пролина, входящего в состав осмопротекторных белков (Ккоррел = 1,0), а у сорта Красностоп АЗОС – сахарозы (Ккоррел = 0,85). В 2015 г. постепенное увеличение содержания суммы свободных органических кислот в листьях винограда сорта Кристалл и Достойный в условиях летнего периода указывает на активацию дыхания, а, следовательно, интенсивности обменных процессов, что может быть связано

с адаптацией изучаемых сортов к засухе. В августе 2015 г. в сравнении с 2014 г. содержание хлорофилла (а + б) в листьях винограда сорта Кристалл не изменялось, у сорта Достойный - снизилось на 32,7 % и у сорта Красностоп АЗОС – увеличилось - на 36,6 %. Следует отметить снижение содержания каротиноидов и отношения содержания каротиноидов к сумме хлорофиллов (а+б) у сортов Кристалл и Красностоп АЗОС. На основании полученных данных можно предположить снижение протекторной функции каротиноидов у этих сортов винограда и различные эффекты проявления их защитных свойств в отношении хлорофилла у разных по происхождению сортов. Постепенное снижение коэффициента повреждения мембран при воздействии высокотемпературного стресса, как в июле, так и в августе за период 2013-2015 гг., позволяет предположить перестройку метаболизма и адаптацию сортов к изменяющемуся гидротермическому режиму лета анапо-таманской зоны. В условиях 2015 г. на выход катионов  $\text{Ca}^{2+}$  (вторичный мессенджер) из мембран большее влияние оказывают средняя и минимальная температуры воздуха (Ккоррел.= 0,98 - 1,0). Повышение устойчивости клеточных мембран к разрушению обусловлено большим содержанием аскорбиновой и фенолкарбоновых кислот, защищающих их от разрушения. В августе 2015 г. в сравнении с 2014 г. отмечалось уменьшение содержания аскорбиновой кислоты в листьях изучаемых сортов винограда.

В июне 2015 г. у растений винограда сорта Кристалл содержание МДА – маркера окислительного стресса в листьях меньше, чем у сортов евроамериканского происхождения. Это характеризует сорт, как более устойчивый к окислительному стрессу. В августе при воздействии высокотемпературного стресса эта закономерность сохраняется. При этом следует отметить увеличение содержания МДА у всех изучаемых сортов винограда при повышении как водного, так и температурного стресса. Увеличение содержания в листьях фенолкарбоновых кислот в августе, по сравнению с июнем у сорта Кристалл в 3,85, Достойный – в 5,81 и Красностоп АЗОС – в 6,48 раз характеризует проявление механизма антиоксидантной защиты от активных форм кислорода в листьях, что согласуется с изменением содержания МДА, может быть связано с генетическими особенностями сорта и, очевидно, наследуется по отцовской линии. По анатомо-морфологическим показателям в июне 2015 г. более всего проявились признаки ксероморфной структуры листовой пластинки у сортов Достойный, Кристалл. У этих сортов отмечено наибольшее развитие слоя палисадной паренхимы по сравнению с губчатой, более мощное развитие клеток верхнего эпидермиса с кутикулой, больше устьиц на единицу поверхности листовой пластинки, мельче линейные размеры устьиц.

Таким образом, метаболомная характеристика устойчивости сортов винограда Кристалл, Достойный и Красностоп АЗОС к засухе может быть обусловлена их межвидовым и эколого-географическим происхождением.

## Влияние клиностаტიрования на метаболитные профили прорастающих семян *Brassica oleraces* L.

Influence of clinorotation on metabolite profiles of germinated *Brassica oleracea* L. seeds

Нюкалова М.А.<sup>1,2</sup>, Смоликова Г.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра физиологии и биохимии растений, Университетская наб. 7/9, 199034 Санкт-Петербург, Россия, g.smolikova@spbu.ru

<sup>2</sup> Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, лаборатория эмбриологии и репродуктивной биологии, Профессора Попова 2, 197376, Санкт-Петербург, Россия

mnyukalov@gmail.com

Целью работы являлся метаболомный анализ зародышевых осей и семядолей семян капусты, прораставших 24 ч и 48 ч при нормальной ориентации в пространстве (контроль) и в условиях клиностаტიрования. Клиностаტიрование – т.е. вращение растения вокруг горизонтальной оси (или нескольких осей), позволяет дезориентировать изучаемый объект в поле земного тяготения и тем самым моделировать эффекты микрогравитации в условиях Земли. В нашей работе клиностаг вращал семена вокруг 2-х осей со скоростью 3-4 об./мин. Клиностазируемые растения лишены возможности воспринимать гравитационный стимул, так как их положение постоянно меняется по отношению к вектору силы тяжести.

Содержание низкомолекулярных метаболитов оценивали методом газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией. В каждом метаболитном профиле было аннотировано по 129 соединений, из них идентифицировано 34. Идентифицированные соединения включали аминокислоты, амиды, амины, органические кислоты, неорганические кислоты, жирные кислоты, спирты и фитостеролы.

С использованием метода главных компонент (МГК) созданы модели, показывающие распределение метаболомов зародышевых осей и семядолей капусты, прораставших 24 ч и 48 ч в контроле и при клиностаტიровании, на плоскости в координатах 1-ой и 2-ой главной компонент (ГК1 и ГК2 соответственно). Метаболомы распределялись по ГК1 согласно динамике прорастания семян. Наиболее существенный вклад в построение ГК1 у зародышевых осей вносили аминокислоты и органические кислоты. Установлено, что клиностаტიрование семян приводило к изменению метаболитных профилей в зародышевых осях по сравнению с контролем уже через 24 ч прорастания. Суммарный процент объясненной информации МГК модели составил 68 %. Достоверность модели ( $R_2$ ), согласно перекрестной проверке по методу «венцианские жалюзи», составила 74 %. Также был рассчитан коэффициент  $Q_2$ , характеризующий предсказательную силу модели. Данный метод основан на перекрестной проверке данных, когда рассчитывают множество моделей по аналогии с исходной, но без использования части данных (т.н. метод «все против одного»).  $Q_2$  был равен 61 %. У семядолей

статистически достоверные различия между метаболитными профилями появлялись только после 48 ч прорастания семян. Это позволяет сделать вывод о том, что зародышевые оси были чувствительны к условиям моделированной микрогравитации на этапе прорастания семян, а семядоли – на начальном этапе роста проростков. Изменение профилей низкомолекулярных метаболитов является результатом адаптации прорастающих семян к постоянно меняющемуся гравитационному стимулу.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИР СПбГУ № 1.38.233.2014 и гранта РФФИ № 14-04-01-624 с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

## Возможное участие этилена в старении цветков Фрезии гибридной (*Freesia × hybrida*)

Possible involvement of ethylene in senescence of *Freesia × hybrida* flowers

Панфилова О.Ф., Пильщикова Н.В.

ФГБОУ Во «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева». 127550 Тимирязевская улица, 49, Москва, Россия  
+7 499 976 20 54, [panfilova.of@yandex.ru](mailto:panfilova.of@yandex.ru)

Перспективной модельной системой изучения запрограммированной смерти растительных клеток являются лепестки цветка, старение которых необратимо и время жизни строго детерминировано. Изучение послеуборочной физиологии не только способствует пониманию регуляции фундаментальных физиологических процессов, но также может обеспечить контроль старения для продления долговечности срезанных цветов. Опыление является основным триггером, регулирующим гибель околоцветника. У многих видов растений его влияние опосредовано этиленом, который первоначально образуется в гинеее и вызывает автокаталитический синтез этилена в лепестках, приводящий к их завяданию. Классическими и активно изучаемыми этилен чувствительными цветочными культурами являются гвоздика и петунья. Считается, что однодольные растения относятся к этилен нечувствительным. Тем не менее, в наших предыдущих опытах была показана сортоспецифичность в чувствительности к этилену как гвоздики, так и альстромерии. Менее изученной является Фрезия гибридная, которая относится к семейству Ирисовые и широко используется в весенних композициях, а также для изготовления бутоньерок. В настоящей работе ставилась задача изучить возможное участие этилена в регуляции старения цветков Фрезии гибридной с помощью ингибиторов его действия: тиосульфата серебра – STS (4 mM AgNO<sub>3</sub> : 32 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) и 1 мкл л<sup>-1</sup> 1-метилциклопропена (1-MCP).

Исследование проводили в осенне-зимний период 2015 года в лаборатории с естественным рассеянным светом. Температура воздуха составляла 18-20°C, влажность – 62-65%. В опытах использовали наиболее популярные во

## С-1. Системная биология растений

флористике сорта Ambassador, Bohemian, Gold River с белыми, сиреневыми и желтыми цветками. Соцветия срезали с участком стебля 2 см. Развитие цветка от плотного неокрашенного бутона до полной утраты декоративности делится на 7 стадий и продолжается в течение 12-15 дней. Пробы брали на стадиях полураспуска, полного роспуска, начала и завершения старения цветков. Обработка побегов раствором STS задерживала старение цветков всех изученных сортов только на 3-4 дня. Более эффективной оказалась обработка 1-MCP, блокирующим рецепторы этилена. У сорта Ambassador с белыми цветками, характеризующимся самой короткой жизнью в вазе из изученных сортов, сохранение декоративных качеств увеличилось на 6 дней. При этом во всех случаях увеличение продолжительности жизни происходило за счет более медленного прохождения заключительных стадий развития цветка. Вероятно, для фрезии также, как и для альстромерии, этилен не является основным триггером включения программы, но участвует в координации процессов финальной стадии старения цветков. Одним из регуляторов старения и гибели околоцветника может выступать распределение ресурсов. Утратившие декоративность за счет снижения интенсивности окраски и приобретения стекловидности лепестки фрезии долго не опадают, что увеличивает возможность для реутилизации веществ. Определение в динамике сырой и сухой массы лепестков показало, что к началу старения цветков сырая масса уменьшилась до 42-47%, а сухая – до 58-64% от максимальной величины на стадии полностью открытого цветка. По мере развития и старения лепестков происходило изменение соотношения сырой и сухой массы. Раскрытие цветка сопровождалось значительным повышением оводненности тканей лепестков и снижением этого соотношения от 0,3 до 0,18. На заключительных стадиях старения соотношение возрастало до 0,36. Тем не менее, наличие реутилизации веществ не позволяет считать старение лепестков следствием использованием ресурсов и истощения клеток. 5% раствор сахарозы практически не увеличил продолжительность сохранения декоративных качеств цветков. Изучение параметров водного обмена, активности антиоксидантных ферментов и стабильности мембран показало, что ключевые события старения лепестков происходят на стадии полного открытия околоцветника без видимых признаков старения. Индекс стабильности мембран, определяемый по выходу электролитов из тканей лепестков, составлял 82-85% на ранних стадиях развития цветка, при этом в варианте с обработкой 1-MCP он был несколько выше. Видимым признакам старения предшествовало снижение мембранной стабильности до 52-60%, в стареющих лепестках индекс устанавливался на уровне 40-43%. Дестабилизация мембран, сопровождающая старение, является, вероятно, следствием перекисного окисления липидов в условиях сниженной антиоксидантной активности клеток.

Обработка 1-MCP задерживала старение как поставленных в воду побегов, так и тейпированных с помощью проволоки или фиксированных клеевой техникой. Клеевая техника лучше сохраняла декоративные качества, особенно у сортов Bohemian и Gold River. В этих вариантах наблюдалась и более высокая эффективность обработки. В настоящее время практикуется



использование нанотехнологий с использованием коллоидных носителей 1-МСП для сохранения овощеводческой продукции и срезки гвоздики ремонтантной. Этот препарат может оказаться эффективным и для сохранения декоративных качеств бутоньерок из Фрезии гибридной.

Регуляция роста экстремофильной микроводоросли *Galdieria sulphuraria* для биосинтеза синего иммунопротекторного пигмента С-фикоцианина и внутриклеточных полипептидов

Growth regulation of the extremophilic microalga *Galdieria sulphuraria* for producing blue immunoprotector pigment C-phycoerythrin and intracellular polypeptides

Тропин И.В.<sup>1</sup>, Рогожин Е.А.<sup>2</sup>, Стадничук И.Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская федерация; т. 8-916-3488140;

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова, Москва, Российская федерация; т. 8-495-3364022;

<sup>3</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Москва, Российская федерация

+7 985 3080523, stadnichuk@mail.ru

Растения-экстремофилы, например, галофилы, психрофилы и др., встречаются во всех средах обитания. Большинство видов-экстремофилов относятся к микроорганизмам, включая микроводоросли. Изучение экстремофилов позволяет глубже понять физиологические механизмы адаптаций и служит важной частью прояснения фундаментальных теоретических вопросов эволюции. Во время зарождения жизни, согласно геологическим исследованиям, условия обитания заметно отличались от современных и сейчас более всего соответствуют экологическим нишам, в которых обитают экстремофилы. Объектом, иллюстрирующим подобные условия, является красная микроводоросль *Galdieria sulphuraria*, растущая в горячих серных источниках и кальдерах вулканов по всему миру. *G. sulphuraria* (штамм IPPAS P-513) и несколько других видов, принадлежащих к малочисленному роду *Galdieria* и в естественных условиях обитающих в Российской Федерации на территории Камчатки и Курильских островов, находятся в коллекции микроводорослей ИФР им. К.А. Тимирязева РАН. *G. sulphuraria* является, по сути, двойным экстремофилом, так как может обитать в условиях повышенных температур (30 – 65 °С), являясь термофилом, и очень высокой кислотности (рН = 1-3), являясь одновременно ацидофильным видом. К важным дополнительным свойствам культуры относится возможность гетеротрофного роста на нескольких десятках органических субстратов. Несмотря на принадлежность к багрянкам, клетки *G. sulphuraria* в по цвету не отличаются от большинства цианобактерий, так как не содержат красного пигмента фикоэритрина, но продуцируют важный для биотехнологических применений синий пигмент С-фикоцианин. Нами получены ростовые кривые

## С-1. Системная биология растений

для *G. sulphuraria*, помещенной в условия автотрофии, фотогетеротрофии и хемогетеротрофии (полностью темнового роста) при внесении в культуру 1% глюкозы. Одновременно с этим проводили спектрофотометрическую оценку накопления пигментов. Как оказалось, скорость фото- и хемогетеротрофного роста в 5-10 раз превышает наблюдаемую при автотрофии. Вместе с тем, глюкоза ингибирует синтез основного фермента цикла Кальвина RuBisCo и подавляет формирование пигментного аппарата фотосинтеза, уменьшая содержание хлорофилла и С-фикоцианина. С учетом установленной наиболее высокой скорости роста у фотогетеротрофной культуры, компенсирующей частичное подавление наработки пигментов был сделан вывод о рентабельности подобных условий. При фотогетеротрофии функционирует весь геном без «выключения» его части, отвечающей за процесс фотосинтеза. Регулируемая смена освещенности «свет/темнота» синхронизирует при этом циркадный характер биохимических циклов. Кроме С-фикоцианина, для биотехнологии безусловный интерес представляют белки, составляющие до 60% клеточной стенки *G. sulphuraria* как барьерные биополимеры, устойчивые к кислым средам при повышенных температурах. Нами проведено предварительное исследование состава белков и полипептидов клеточной стенки и основных по содержанию белков цитоплазмы *G. sulphuraria* на биохимической базе ИБХ РАН. Структурная характеристика полученных 10 основных клеточных фракций белков и пептидов, полученная на основе MALDI (времяпролетной масс-спектрометрии) и MS/MS-спектрометрии, позволила сделать вывод о наличии в клетках изучаемого организма направленной внутриклеточной деградациии крупных белков, в том числе С-фикоцианина, с образованием более коротких полипептидов, включая в их число ранее неизвестные и обладающие функциональной активностью. Исползованный способ получения клеточных пептидов из биомассы водорослей может стать полезным в биотехнологии для последующего применения продуктов белковой природы в сельском хозяйстве и медицине.

## Апопласт удлиняющихся мезокотилей кукурузы: метаболомный анализ

The apoplast of elongating maize mesocotyls: metabolome analysis

Шарова Е.И., Билова Т.Е.

Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

+7 812 328-96-95, [elenasharova@mail.ru](mailto:elenasharova@mail.ru), [bilova.tatiana@gmail.com](mailto:bilova.tatiana@gmail.com)

Одна из главных задач физиологии роста — понять механизмы регуляции растяжимости клеточных стенок. С этой целью нами был изучен качественный и количественный состав метаболитов апопластного раствора вдоль зоны роста мезокотилей кукурузы. Рост мезокотилия обеспечивается делением клеток в зоне длиной 1.5 мм, расположенной под колеоптильным узлом, и последующим растяжением клеток в зоне длиной около 15 мм. Скорость растяжения клеток быстро снижается в базальном направлении (табл.) в результате уменьшения растяжимости клеточных стенок.

Зона	Расстояние от узла, мм	Скорость роста, мкм/мин	Основные метаболиты, мМ												
			Глюкоза	Фруктоза	Яблочная кислота	Фосфорная кислота	Молочная кислота	γ-Аконитовая кислота	Аспарагин	Аспарагиновая кислота	Глутамин	Глутаминовая кислота	Серин	Треонин	Галактоза
1	2-7	8	5.4	1.1	1.60	2.5	1.0	0.08	0.7	0.4	0.3	0.1	0.3	0.3	0.15
2	7-12	3	5.2	1.2	1.80	2.7	0.6	0.15	0.6	0.4	0.5	0.1	0.2	0.3	0.10
3	12-17	1	5.2	0.9	1.70	2.3	0.4	0.23	0.6	0.3	0.5	0.1	0.3	0.2	0.07
4	17-22	0.5	4.7	0.8	1.50	2.8	0.2	0.35	0.5	0.3	0.7	0.1	0.1	0.2	0.05

Зона	Минорные метаболиты, мкМ														
	Инозит	Сахароза	Аланин	Валин	γ-аминомасляная кислота	Янтарная кислота	Глицин	Пролин	2-Оксопролин	Фенилаланин	Арабиноза	Ксилитоза	1-Моностеарил-глицерол	1-Монопальмитил-глицерол	1-Фосфоглицерин
1	21	30	70	80	85	55	7	10	80	25	35	10	130	120	15
2	13	10	75	65	40	60	6	5	55	20	40	5	110	150	10
3	9	10	65	90	20	50	7	0	60	30	30	15	150	170	15
4	6	20	60	75	20	45	5	5	55	15	30	5	120	130	10

## С-1. Системная биология растений

Апопластный раствор извлекали путем низкоскоростного центрифугирования отрезков мезокотилей (10 мин при 1700g). Методом газовой хромато-масс-спектрометрии метаболиты апопластного раствора были разделены примерно на 100 пиков, представляющих вещества с концентрацией выше 1 мкМ. Об отсутствии существенного цитоплазматического загрязнения свидетельствовало выявление на хроматограммах лишь следовых количеств глюкозо-6-фосфата. Среди сахаров в апопласте доминировали глюкоза и фруктоза, содержащиеся в миллимолярных концентрациях, среди органических кислот – яблочная. Среди аминокислот преобладали Асн, Асп, Глн, Сер, Тре, Глу, Ала, Вал, Фен. Их суммарная концентрация составила 2-3 мМ.

Уровень глюкозы, фруктозы, яблочной и ортофосфорной кислот в апопласте существенно не изменялся в ходе торможения роста клеток. При этом происходило накопление *trans*-аконитовой кислоты (от 0.08 до 0.35 мМ) и Глн (от 0.3 до 0.7 мМ). В базальном направлении резко снижалось содержание галактозы, сахарозы, инозита (от 21 до 6 мкМ), молочной (от 1 до 0.2 мМ) и  $\gamma$ -аминомасляной (ГАВА, от 85 до 20 мкМ) кислот. Торможение роста отрезков мезокотилей под действием АБК (100 мкМ, 2 ч) сопровождалось увеличением содержания в апопласте ГАВА и моноглицеридов, а усиление роста под действием ИУК (1 мкМ, 2 ч) – снижением. Обсуждается значение обнаруженных гормон-зависимых и аксиальных изменений состава апопласта для растяжения клеток.

## Заочное участие

Полиморфизм гомологов генов восстановления фертильности пыльцы у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.)

Polymorphism of homologs of pollen fertility restoration genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Анисимова И.Н., Алпатьева Н.В., Карабицина Ю.И., Кузнецова Е.Б., Гаврилова В.А., Радченко Е.Е.

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова; ул. Большая Морская, д. 42, 44, Санкт-Петербург, 190000, Россия  
+7 812 476 63 36, [irina\\_anisimova@inbox.ru](mailto:irina_anisimova@inbox.ru)

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) – наследуемая по материнской линии неспособность растений продуцировать жизнеспособную пыльцу. Фенотип ЦМС обусловлен экспрессией аберрантных митохондриальных химерных генов и может быть супрессирован при включении в генотип ядерных генов *Rf*, необходимых для развития функционального мужского гаметофита. Большинство идентифицированных к настоящему времени генов *Rf* кодируют PPR-белки, которые характеризуются наличием tandemно повторяющихся вырожденных

последовательностей из 35 аминокислотных остатков (pentatricopeptide repeats, PPR). Семейство PPR-генов широко представлено у высших растений, вовлечено в антероградную/ретроградную регуляцию и играет важную роль в согласованной работе геномов ядра и органелл. PPR-белки необходимы для правильного процессинга и/или трансляции оргanelльных РНК. PPR-гены, продукты которых ассоциированы с функцией восстановления фертильности пыльцы, выделены в отдельное подсемейство *RFL-PPR* (*Restoration of Fertility Like-PPR*). Отличительной чертой *RFL-PPR*-генов высших растений является кластерная организация в геноме, уникальный характер дивергенции PPR-мотивов и высокая скорость эволюции. В селекции гибридов подсолнечника широко используется ЦМС PET1 типа, обусловленная перестройкой митохондриального генома у межвидового гибрида *Helianthus petiolaris* × *H. annuus*. Природы генов восстановления фертильности пыльцы у подсолнечника до сих пор не известна.

С целью проверки гипотезы о принадлежности генов *Rf* подсолнечника к семейству *RFL-PPR* у 11 линий генетической коллекции (5 линий с ЦМС PET1 типа и 6 фертильных линий) изучили нуклеотидный полиморфизм 10 фрагментов экспрессируемых последовательностей (EST), отобранных из базы данных секвенированного генома сложноцветных (Compositae Genome Project, <http://www.cgp.edu/>). Отобранные фрагменты характеризовались гомологией последовательностям *RFL-PPR*-генов других растений. Наличие в генотипе фертильной линии генов *Rf*, необходимых для восстановления фертильности ЦМС PET1, оценивали в F<sub>1</sub> гибридов от скрещиваний с линией ЦМС. Линии ВИР740, ВИР 558, RIL80 и RIL130 восстанавливали фертильность пыльцы гибридов при скрещивании со стерильными линиями ВИР109 и ВИР116 на основе ЦМС PET1. Характер расщепления гибридов F<sub>2</sub> по признаку мужской фертильности свидетельствовал о моногенных отличиях родительских линий. Молекулярным анализом с использованием 7 специфичных ПЦР-маркеров (STS, SCAR, SSR, CAPS) подтверждено присутствие в генотипах линий-восстановителей доминантного аллеля гена *Rf1*. Линии ВИР377 и ВИР387 закрепляли стерильность при скрещиваниях линией ЦМС.

Изученные фрагменты *RFL-PPR*-генов имели длину от 274 до 1174 пн и содержали по 2 или 3 PPR-мотива. В последовательностях двух фрагментов обнаружены интроны (80 пн и 628-635 пн). Интрон QHL12D20 содержал два инвертированных повтора длиной примерно 300 пн, представляющих комплементарный палиндром. Наиболее высокая частота несинонимичных SNP (>4%) отмечена в последовательностях фрагментов QHL12D20 (1174 пн) и QHB20M13 (421 пн). На основе выявленного полиморфизма разработаны CAPS-маркеры и изучено их распределение в выборке линий генетической коллекции, включавшей 92 фертильные линии с различной восстановительной способностью и 4 стерильные линии на основе ЦМС PET1 и RIG0. Линии ЦМС характеризовались присутствием идентичных вариантов CAPS-маркеров B20M13/RsaI и L12D20/HaeIII. В группе линий, у которых с помощью STS-маркера *orfH522* была идентифицирована стерильная

## С-1. Системная биология растений

цитоплазма (предполагаемые носители генов *Rf*) преобладали носители альтернативных вариантов обоих маркеров.

Изучили характер совместного наследования фрагмента QHL12D20 и SCAR-маркера HRG02, тесно сцепленного с геном *Rfl*. Последовательность фрагмента QHL12D20 была высокогомологична у отцовских родителей ВИР558 и ВИР740 и отличалась от последовательности материнской линии ЦМС заменами единичных нуклеотидов в экзонах и интроне. В  $F_2$  от скрещивания ВИР116А × ВИР558 локусы QHL12D20 и HRG02 наследовались сцепленно (коэффициент рекомбинации 20%). Данные о связи полиморфизма фрагментов *RFL-PPR*-генов с функциональным состоянием локуса *Rfl* и возможное сцепление фрагмента QHL12D20 и SCAR-маркера HRG02 позволяют предполагать, что, как и гены восстановления фертильности других растений, локус *Rfl* представлен *PPR*-последовательностями либо находится вблизи района, содержащего *PPR*-гены.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект №12-04-00329).

Многофакторная патч-кламп-спектроскопия как метод характеристики сигнальных систем растений и источник комплементарных систематических дескрипторов для биохимической таксономии с привязкой к биогеографическим картам и данным корреляционной феноспектральной ауксанометрии

Multiparametric multivariate patch-clamp-spectroscopy as a method for plant signaling characterization and complementary systematic descriptor for biochemical taxonomy and biogeographic biochemical plant signaling mapping based on correlational phenospectral auxanometry

Градов О.В.

ИНЭПХФ РАН, Москва, Ленинский пр., д. 38, к. 2

*gradov@chph.ras.ru, gradoff@bioinformatics.ru*

Общеизвестна и неоспорима роль ионных каналов в реализации комплексного клеточного сигналинга у растений. Начиная с обзора Циммермана с соавторами (doi: 10.1007/s000180050284), широкое распространение получило использование методов локальной фиксации потенциала (патч-кламп) в исследовании комплексных и регулируемых условиями среды (рН, концентрацией солей / удельной электропроводностью, концентрациями и осмотическими параметрами ионов и т.д.) характеристик сигналинга, являющихся, по сути, характеристиками и дескрипторами отклика на данные регуляторы. Показано, что ряд ионов, таких как  $Ca^{2+}$ , участвуют в регуляции в сигнальных сетях, опосредованной редокс-факторами (в том числе – активными формами кислорода) и УЭП (хронологически новейшие данные см. во “Frontiers in Plant Science” 2015 года – {doi: 10.3389/fpls.2015.00427}). Таким образом, отклик канала (channelome – полная совокупность мембранных ионных каналов и поринов) и связанных с ним сигнальных путей растений зависит от условий среды, которые определяются экологическими и биогеографическими факторами. Уже на симпозиуме «Plant Signaling 2000» (Pennsylvania State University, май 2000 г.) более, чем полтора десятилетия тому назад, ставился акцент на экофизиологическое понимание систем сигналинга. Очевидно, что солевые и кислотные свойства почв зависят от географической зональности, а время герминации и вегетации, регулируемое внешними факторами, различно для разных биогеографических зон, что позволяет формулировать определенные корреляционные зависимости между биогеографическими свойствами среды, фенологическими экофизиологическими характеристиками растений и параметрами сигналинга ионных каналов на базе методов многомерного статистического анализа (включая MANOVA и MANCOVA). Различие в концентрации солей сопряжено с подстройкой сигналинга к различным стадиям роста и развития растений (см., напр., работу 2015 г. Жульковской и Тестерник в “Trends in Plant Science”; doi: 10.1016/j.tplants.2015.06.008), по причине чего возможна также классификация стадий, на которых находится растение в тот или иной момент

## С-1. Системная биология растений

в рамках феноспектральной периодизации, по отклику на соли / составляющие их ионы (хотя бы в рамках модели «черного ящика», сопоставляя исходное и индуцированное состояние сигнальной активности). Кластеризация и феноспектральная классификация данных состояний, являясь методом многомерной кластеризации, вследствие зависимости сигнальных путей отклика от множества стрессоров или факторов одновременно (что считается на данный момент существенной трудностью в области *data mining*, интеллектуального анализа данных – об этом доказательно рассказано в последней статье Хубера и Бауэрля в оксфордском “Journal of Experimental Botany” – в мартовском выпуске 2016 года; doi: 10.1093/jxb/erw099), должна учитывать комплекс критериев нормального и экзогенного происхождения, часто конкурирующих друг с другом и ведущих к контрнаправленным эффектам отклика. В апреле 2012 года в “Nature Chemical Biology” был опубликован отклик Ваннесте и Фримла на статью “A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin”, в котором, с реакционно-диффузионных, по существу, градиентных позиций рассматривалось влияние комплексов, включающих в себя ауксин и репрессор транскрипции, на разнообразие транскрипционных программ, активируемых градиентными уровнями ауксина в разных модальностях развития (“Deconstructing auxin sensing”; doi:10.1038/nchembio.943). С позиций каналомики растений, исследуемой методами патч-кламп, заимствованными из нейрофизиологии: если интерпретировать системы сигналинга растений как «нейробиологию растений» в рамках концепции Бреннера с соавторами (“Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling”; doi: 10.1016/j.tplants.2006.06.009), задача оценки подобных контрнаправленных механизмов может быть сведена к оценке фитоэлектрофизиологического эффекта действия соответствующих факторов (как иррадиации и концентрации электробиохимического генеза, связанного с изменением мембранных потенциалов в ходе перестройки путей сигналинга). Однако проблема не может быть решена простой визуальной или монофакторной метрической оценкой отклика в силу разнообразия индуцирующих факторов и многофакторного характера отклика на комплекс индуцирующих факторов среды в условиях фенологически-трактуемого химизма герминационных, вегетационных и т.п. процессов, в связи с чем нами предлагается кардинально новый подход к оценке данных эффектов, основанный на многомерном анализе и псевдоспектральной обработке данных патч-кламп-регистрограмм, в том числе – в режиме реального времени *in situ*, в корреляции с регистрограммами и машинограммами кластеризации факторов, индуцирующих или же сопровождающих изменение биоэлектrogenеза у данных растений («феноспектральные» данные; концентрации ауксинов в среде и целевых ионов в почве и / или жидкости; кондуктометрические и редоксметрические данные об окружении и т.д.). В силу приспособленности растений к условиям среды и специфичности отклика данных растений на её изменение, адекватное изменению фенологической или биогеографической позиции, результаты применения данного подхода (после обучения создаваемой экспертной системы на большой выборке данных по известным



примерам корреляций) могут быть использованы как таксономический критерий либо как критерий биогеографического или фенологического анализа.

## Содержание флоротаннинов в разных частях таллома бурой макрофитной водоросли *Fucus vesiculosus* L.

Phlorotannin content in different thallus zones of brown macroalga *Fucus vesiculosus* L.

Лемешева В.С., Тараховская Е.Р.

Санкт-Петербургский Государственный университет, Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург, Россия

+7 812 328-96-95, st035098@student.spbu.ru

Флоротаннины – специфическая группа вторичных метаболитов бурых водорослей. Это полифенолы, структурным мономером которых является флороглюцин (1,3,5-триоксibenзол), разная степень полимеризации которого приводит к образованию молекул от 126 Да до 650 кДа. Флоротаннины присутствуют в тканях водорослей в значительных количествах (до 25% сухой массы). Спектр предполагаемых функций этих соединений включает в себя: участие в формировании клеточной стенки и адгезивного материала водорослей, предотвращение биообрастания макрофитов, обеспечение химической защиты от поедания моллюсками, участие в системе нейтрализации оксидативного и цитотоксического эффектов ультрафиолетового излучения. Несмотря на значительный интерес к этим веществам как к потенциальным источникам биологически активных соединений, на сегодняшний день, флоротаннины остаются одной из наименее изученных групп метаболитов водорослей с точки зрения их участия в физиологических процессах.

Цель нашего исследования состоит в определении количественного содержания растворимых и связанных с клеточной стенкой флоротаннинов в разных частях таллома *F. vesiculosus* и выявлении возможных взаимосвязей распределения этих соединений с их функциями.

Определение количественного состава флоротаннинов проводили в четырех зонах таллома *F. vesiculosus* – в основании таллома, центральной части, вегетативных апексах и зрелых рецептакулах. Количество флоротаннинов измеряли спектрофотометрически с использованием реактива Фолина-Чокалтеу. Были исследованы экстракты растворимых флоротаннинов, а также флоротаннинов клеточной стенки, выделенных методом щелочного гидролиза. Содержание свободного мономера флоротаннинов – флороглюцина – определяли при помощи GC-MS-анализа метанольных экстрактов.

Общее содержание флоротаннинов в тканях *F. vesiculosus* варьировало от 1,8 до 6,2% сыр. массы. Основание и средняя зона таллома характеризуются значительно (в 2-3 раза) более высоким содержанием всех исследованных

## С-1. Системная биология растений

форм флоротаннинов, по сравнению с апикальными зонами таллома. По видимому, это связано с тем, что в клетках базальных частей таллома, по мере прекращения ростовых процессов, происходит ужесточение клеточных стенок, сопровождающееся включением в них дополнительных флоротаннинов и, возможно, увеличением степени их полимеризации. Содержание флоротаннинов, связанных с клеточной стенкой, в среднем по таллому на порядок ниже, чем содержание растворимых флоротаннинов. И при этом, базальная часть таллома характеризуется наиболее высоким содержанием этой формы флоротаннинов (~15%), в то время как в остальных зонах доля связанных флоротаннинов не превышает 10%. Помимо включения в клеточную стенку в нижней части таллома, флоротаннины могут накапливаться в связи с тем, что именно эта зона в первую очередь является мишенью для обрастателей и фитофагов. Таким образом, в этой зоне флоротаннины могут активно использоваться для обеспечения химической защиты. В ходе галопероксидазных реакций из этих веществ образуются разнообразные галогенорганические соединения, многие из которых токсичны и обладают репеллентным эффектом.

Наименьшее содержание флоротаннинов было отмечено в рецептакулах фукуса. *F. vesiculosus* – двудомное растение, и мы исследовали отдельно мужские и женские рецептакулы, соответственно, со зрелыми антеридиями и оогониями. В мужских рецептакулах обнаружено на ~20% больше растворимых флоротаннинов, чем в женских. По-видимому, для объяснения этого результата потребуются дальнейшие исследования.

По данным GC-MS распределение по таллому водоросли свободного флороглюцина, в общем, соответствует распределению растворимых и связанных форм флоротаннинов. Это позволяет прийти к выводу, что даже в закончивших рост зонах таллома (в частности, в основании) метаболизм этих соединений остается активным.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-32320).

## Некоторые особенности распространения электрических импульсов по растению

Some features of the electrical impulses propagation through the plant

Красавина М.С.<sup>1</sup>, Паничкин Л.А.<sup>2</sup>, Бурмистрова Н.А.<sup>1</sup>, Лунькова Н.Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, 84992318371,

<sup>2</sup> Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А.Тимирязева, Москва, Россия

+7 499 9762054, [krasavina@ippras.ru](mailto:krasavina@ippras.ru)

Биоэлектрические реакции (БЭР) привлекают все большее внимание как возможные сигналы для регуляции физиологических процессов в растениях. Изучается связь БЭР с транспортом веществ, с реакцией растений на биотические и абиотические стрессы, действием биологически активных веществ. Однако остается много неясностей в понимании закономерностей генерации и распространения по растению волны электрического возбуждения, а также специфических характеристик БЭР, возникающих в ответ на различные стимулы.

Объектом исследования были проростки или молодые растения тыквы в возрасте 1-3 недели. Нижний конец отрезанного стебля раздражали, опуская в раствор 1М КСl. В этом растворе находился референтный электрод. Распространение возникающих в стебле БЭР регистрировали двумя измерительными электродами. Один располагался всегда на стебле на расстоянии 3-10 см от места раздражения. Этот электрод регистрировал серию деполяризующих импульсов, по форме похожих на потенциалы действия (ПД). Чаще всего импульсы были смешанными, включающими, кроме ПД, более медленную биоэлектрическую реакцию (возможно, переменный потенциал, ВП). Реакция на втором электроде отличалась от реакции на первом электроде, форма и продолжительность зависели от места расположения второго электрода. Если он располагался на стебле, регистрировали такие же импульсы деполяризации, как на первом. Но если второй электрод находился над семядольными листьями или на боковом побеге растения, импульсы характеризовались большей амплитудой и положительной полярностью. Смену характера биоэлектрической реакции (деполяризацию на гиперполяризацию) отмечали также при нахождении электрода не на стебле, а на черешке листа. В этом случае амплитуда импульсов также увеличивалась. Предположили, что на характеристики импульсов влияют происходящие в листовых и стеблевых узлах изменения структуры проводящих путей. Возможно, что при прохождении через узлы ослабевают или исчезают БЭР, генерированные при раздражении нижнего конца стебля. При этом явно проявляются другие импульсы, возникающие в листе как ответ на изменение натяжения водных нитей, распространяющиеся базипетально. Природа этих импульсов, по-видимому, иная, о чем свидетельствует другая их полярность. Положительная полярность импульсов и базипетальное распространение сближает их с системными

потенциалами. Характерно, что появление этих импульсов не отражается на акропетально распространяющейся по стеблю волне возбуждения, для которой, по-видимому, узлы также служат препятствием. Похожую картину мы наблюдали при прохождении ПД через корневую шейку. В этой области структура проводящих пучков изменяется еще более кардинально, что также тормозит распространение импульсов. Влияя на ионные потоки, салициловая кислота в среде для раздражения изменяла и генерацию импульсов: в большинстве опытов увеличивалась продолжительность ПД и интервалы между ними в серии импульсов.

### Влияние азотного питания на изменение активности аскорбатпероксидазы

The influence of nitrogen nutrition on changes in the ascorbate peroxidase activity

Петрова Н.В., Бакирова Д.Р.

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, ул. Лобачевского 2/31, г. Казань, РФ

*npetrova@inbox.ru*

Аскорбатпероксидаза (APX), наряду с глутатионредуктазой, монодегидроаскорбат редуктазой, дегидроаскорбатредуктазой и антиоксидантами-метаболитами аскорбатом, глутатионом, НАДФН составляют аскорбат-глутатионовый цикл. Эта ветвь метаболизма играет важную роль в детоксикации и регуляции уровня перекиси водорода в клетке. APX катализирует перенос электронов с аскорбата на  $H_2O_2$ , в ходе реакции образуется дегидроаскорбат и вода. Этот фермент идентифицирован у многих высших растений и входит в состав семейства изоферментов с определенными характеристиками, которые распространены по всем клеточным компартментам, включая цитоплазму, хлоропласты, пероксисомы и митохондрии (Shigeoka et al., 2002). У высших растений APX - это важный элемент механизма тонкой регуляции содержания  $H_2O_2$  в ходе развития растений и в условиях стрессовых воздействий. Не так давно APX была охарактеризована как возможная мишень нитрования по тирозину, и было показано, что NO может менять ее активность различными путями или через инактивацию (Clark et al., 2000), или через активацию (Keyster et al., 2011). Фармакологический анализ на рекомбинантной APX гороха показал, что активность APX меняют и необратимое нитрование по тирозину и обратимое S-нитрозилирование, что ведет к противоположным эффектам: нитрование по Тир235 ингибирует активность APX, в то время как S-нитрозилирование по Цис32 вызывает повышение APX активности. Все это указывает на взаимодействие между NO-метаболизмом и этим важным антиоксидантным ферментом, включенным в АФК-метаболизм. Однако в литературе отсутствуют данные о роли другой посттрансляционной модификации – тирозинового фосфорилирования – на активность APX. Нами был проведен

анализ *in silico* аминокислотной последовательности APX *Pisum sativum* с помощью сервиса NetPhosK и найдено наличие 3х сайтов фосфорилирования по тирозину: Тир12, Тир97, Тир235. Возможно, в зависимости от условий, Тир235 подвергается либо нитрованию, либо фосфорилированию, что может играть регуляторную роль в изменении активности APX. С помощью антител к фосфотирозину (клон PY20) в нашей работе было показано изменение уровня тирозинового фосфорилирования APX гороха при стрессе в разных условиях азотного питания. Эти данные были сопоставлены с данными по изменению активности APX, выявленной после разделения изоформ APX в нативном геле, в тех же экспериментальных условиях. Активность APX с течением времени увеличивалась на 41% и 18% для вариантов с инкубацией исходно дефицитных по азоту растений гороха на  $KNO_3$  и на среде Хогланда-Арнона соответственно. Возможно, это связано с активацией сигнальных каскадов под действием NO. В варианте с продолжающимся азотным голоданием мы не наблюдали изменения аскорбатпероксидазной активности с течением времени. Однако добавление эффекторов оказало сильное влияние на активность аскорбатпероксидазы для этого варианта: снижение на 42% и 50% при обработках вольфраматом натрия и нитропруссидом натрия соответственно. При инкубации в среде с  $KNO_3$  добавление эффекторов сдерживало повышение аскорбатпероксидазной активности, наблюдаемое для контроля. Картина по изменению аскорбатпероксидазной активности была другой для растений, выращенных в условиях нормального азотного питания. При добавлении вольфрамата натрия мы наблюдали увеличение активности APX по сравнению с 3-часовым контролем. Присутствие в течение последнего часа инкубации в среде нитропрусида натрия приводило к снижению активности APX. Уровень тирозинового фосфорилирования APX снижался в течение 3х часов у дефицитных по азоту растений при переносе их на среду с  $KNO_3$  и оставался неизменным при продолжающемся азотном голодании. У растений нормальных по азотному питанию наблюдалось повышение уровня тирозинового фосфорилирования.

Т.о. было показано, что изменение активности APX сопровождается изменением в уровне тирозинового фосфорилирования данного фермента. Разнонаправленность изменений может быть обусловлена реализацией разных сигнальных каскадов при одинаковом стрессовом воздействии у растений, неодинаковых по азотному питанию.

## Функциональные и структурные особенности фотосинтетического аппарата плодов и листьев яблони

Functional and structural features of photosynthetic apparatus of the apple fruits and leaves

Пикуленко М.М.<sup>1</sup>, Кумахова Т.Х.<sup>2</sup>, Комарова А.В.<sup>3</sup>, Булычев А.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; 119991, г. Москва, Ленинские Горы д.1, Музей земледелия МГУ

+7 495 939-30-11, [pikulenkomarina@mail.ru](mailto:pikulenkomarina@mail.ru)

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева», 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.49

+7 499 976-04-80, [tkumachova@gmail.com](mailto:tkumachova@gmail.com)

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; 119991, г. Москва, Ленинские Горы д.1, стр.12

+7 495 939-35-03, [ava1945@mail.ru](mailto:ava1945@mail.ru)

В настоящее время изучены многие характеристики фотосинтетического аппарата (ФСА) листьев растений (молекулярные, физиолого-биохимические, ультраструктурные и др.). Однако представления о приспособительных механизмах, задействованных высшими растениями, необходимо расширять с учетом роли ФСА зеленых плодов. Особенности фотохимических и темновых стадий фотосинтеза хлоропластов плодов в сравнении с фотосинтезом листьев исследуют в основном для оценки зрелости плодов и последствий теплового воздействия, возможных в ходе хранения. Мощный приток органических соединений в развивающиеся плоды может определять специфику их фотосинтеза. Вероятно также, что существуют особенности, связанные с предстоящим переходом фотосинтезирующих хлоропластов в хромопласты. Сравнение функциональных и структурных особенностей листьев и плодов яблони в ходе развития является информативным направлением в исследовании адаптивной роли пластид в ходе естественного развития и при стрессовых воздействиях.

В наших опытах использовали листья и созревающие зеленые плоды яблони *Malus domestica* диаметром 20-40 мм, срезанные утром в день исследований при температуре воздуха около 18°C. Измерения проводили с помощью флуориметра РЕА (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech, Англия) на срезах наружных слоев плодов толщиной 2–4 мм, площадью около 1.5 см<sup>2</sup>. Образцы листьев и плодов адаптировали к темноте в течение 5 мин, а затем освещали красным светом (максимум при 650 нм, интенсивность 1500 мкмоль/(м<sup>2</sup> с), длительность освещения 2 с).

Индукционные кривые флуоресценции листьев яблони включали три фазы нарастания, в соответствии с результатами, полученными на других растениях. Основное отличие индукционных кривых плодов при комнатной температуре состояло в том, что наблюдался переход O-K-J, который отсутствовал в листьях. По данным литературы пик K обычно проявляется после тепловой обработки (40°C) листьев и сопряжен с понижением квантовой эффективности ФС2, что объясняют нарушением кислород-выделяющего комплекса и дисбалансом притока–оттока электронов на уровне ФС2. В наших опытах без тепловой обработки пик K достигался при 400 мкс от момента включения света; его появление не сопровождалось снижением квантового выхода переноса электронов в ФС2. Полученные значения параметра Fv/Fm в плодах яблони составили 0.71–0.86; т.е. были аналогичны показателям фотосинтетической активности листьев.

По данным трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) хлоропласты в клетках созревающих плодов яблони локализованы в субэпидермальном слое. В ультраструктурном плане особенностью этих хлоропластов являются развитая мембранная система, видимые области контактов хлоропластов между собой, многочисленные картины слияния и деления.

В отличие от плодов, в клетках листьев яблони отмечено больше пероксисом, которые зачастую входят в «триады»: митохондрия – пероксисома – хлоропласт. Как известно, пероксисомы фотосинтезирующих тканей метаболизируют гликолевую кислоту. В неблагоприятных условиях, по гипотезе ряда исследователей, метаболизм гликолата играет ключевую роль в фазе развития растений, когда осуществляется переход от использования запасных питательных веществ к фотосинтетическому метаболизму.

Оценка устойчивости растений к воздействию факторов среды с использованием методов индукции флуоресценции хлорофилла (ИФХ) и электронной микроскопии может использоваться для исследований адаптивной роли пластидных сигналов при стрессе.

Моделирование влияния структурно-функциональных характеристик посевного материала на элементы структуры урожайности яровой мягкой пшеницы

Modelling of structural-functional characteristics of seed grain to elements of yield formula of spring soft wheat

Прияткин Н.С.<sup>1</sup>, Колесников Л.Е.<sup>2</sup>, Гусакова Л.П.<sup>1</sup>, Зуев Е.В.<sup>3</sup>,  
Архипов М.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Агрофизический НИИ, Гражданский пр. 14, Санкт-Петербург, Россия

+7 812 534-12-20, +7 812 534-19-00, *prini@mail.ru*

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО СПбГАУ, Петербургское ш. 2., Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

+7 812 476-44-44, +7 812 465-05-05, *kleon9@yandex.ru*

<sup>3</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» ул. Большая Морская, 42-44 Санкт-Петербург, Россия

+7 812 312-51-61, +7 812 570-47-70, *e.zuev@vir.nw.ru*

Выполнено исследование по изучению взаимосвязи интроскопических характеристик посевного материала яровой мягкой пшеницы из коллекции ВИР на показатели продуктивности растений и структуру урожайности, с использованием экспресс-методик и технологий, в частности, основанных на новейших достижениях агрофизики (мягколучевая рентгенография, газоразрядная визуализация).

Цель исследований: определить зависимость элементов структуры урожайности сортов яровой мягкой пшеницы от интроскопических характеристик зерна, используемого в качестве семенного материала исследования.

Задачи исследований:

- 1) Исследовать взаимосвязь показателей продуктивности, потенциальной урожайности сортов яровой мягкой пшеницы и характеристик газоразрядного свечения зерна, отражающего качество посевного материала.
- 2) Исследовать взаимосвязь показателей продуктивности, потенциальной урожайности сортов яровой мягкой пшеницы и морфометрических и денситометрических характеристик рентгенообразов посевного материала.

Объекты исследований

Растительным материалом исследования послужили 34 сорта яровой мягкой пшеницы, выращенные в агроэкологических условиях Пушкинских лабораторий Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства (ВИР). Образцы были предоставлены для исследования отделом генетических ресурсов пшениц ВИРа. Объем выборки для каждого сорта составил 30 зерен.



Потенциальную биологическую урожайность сортов яровой пшеницы рассчитывали на основе определения урожайности одного растения яровой мягкой пшеницы с учетом данных по продуктивной кустистости.

Статистический анализ данных опыта проведен с использованием пакетов прикладных программ SPSS 21.0, Excel 2016, Statistica 6.0.

Результаты исследований:

Выявлены положительные корреляционные связи между длиной колоса и фрактальностью по изолинии, длиной изолинии зерен. В то же время увеличение длины изолинии зерен обуславливало снижение показателей общей и продуктивной кустистости. Значения фрактальности по изолинии наряду с другими оптическими показателями (площадь проекции, периметр, длина, ширина, коэффициент формы и др.) достоверно оказывали положительное влияние на показатели, характеризующие массу зерен яровой мягкой пшеницы (масса зерен колоса, масса 1000 зерен, масса колоса). На рост значений потенциальной урожайности яровой мягкой пшеницы влияла, наряду со значениями периметра и ширины, площадь проекции зерен, используемых в качестве семенного материала.

Увеличение средней интенсивности ГРВ на единицу в диапазоне от 40 до 49 ед. определяло снижение площади флаг-листа на 0,4 см<sup>2</sup> (рис. 11). Изменение фрактальности по изолинии на 0,01 ед. в пределах от 1,69 до 1,78 обуславливало рост массы 1000 зерен на 1,8 г (рис.12).

Выводы:

Изучены показатели структурно-функциональной активности зерен, связанные с скрытой неоднородностью посевного материала.

Установлена взаимосвязь структурно-функциональных характеристик посевного материала и элементов структуры урожая яровой мягкой пшеницы. Комплекс интроскопических методов для исследования семенного материала (микрофокусная рентгенография, газоразрядная визуализация) в перспективе может быть использован для прогноза биологической полноценности вегетирующих растений, а также прогноза урожайности.

## Накопление масла семенами растений сои *Glycine max* L.: особенности разных сортов

Oil accumulation by seeds of soybean *Glycine max* L. plants: particularities of different varieties

Кистол М.К., Харчук О.А.

Институт генетики, физиологии и защиты растений АНМ, ул.Лесная, 26, г.Кишинев, Республика Молдова

+373 69245257, [kharchuk.biology@mail.ru](mailto:kharchuk.biology@mail.ru)

В последние десятилетия возрастает интерес к сое, как одной из основных культур с высоким содержанием белка и масла. Семена соевых бобов содержат до 50% белка с высоким содержанием незаменимых аминокислот, а также до 26 % масла. Почвенно-климатические условия в Молдове

## С-1. Системная биология растений

благоприятны для выращивания сои. Плодородные черноземы районов страны, в совокупности с распределением температур и атмосферных осадков, позволяют получать высокие урожаи зерна сои.

Целью работы было изучение закономерностей накопления масла в семенах контрастных сортов сои. Исследования проводили в 2014 г. с растениями сои двух районированных в Молдове сортов - Алина и Аура, в условиях вегетационного комплекса (в сосудах на 10 л), а также на полях Института генетики, физиологии и защиты растений. В конце вегетационного периода собранные семена сои сорта Аура характеризовались массой от 70 до 230 мг, а сорта Алина – от 50 до 180 мг. В полевом опыте средняя масса семян сорта Аура составила 133-150 мг (с увеличением массы при дополнительном внесении удобрений) с масличностью 22-23%. Средняя масса семян сои сорта Алина существенно ниже, 89-90 мг (независимо от удобрений) при масличности 19-20%. И в полевых условиях, и в условиях вегетационного комплекса растения сои сорта Алина характеризовались существенно более высокими величинами водного дефицита листьев по сравнению с таковыми сорта Аура, как в условиях достаточной влагообеспеченности растений, так и при почвенной засухе. Содержание масла в семенах определяли методом спинового эха ядерного магнитного резонанса.

Данные по накоплению масла в семенах подтвердили ранее установленную закономерность, что содержание масла в семенах строго коррелирует с массой семян. При этом для более мелких семян (массой преимущественно до 100 мг) содержание масла увеличивается с ростом массы семян (первая фаза накопления масла в семенах). При дальнейшем росте массы семян скорость роста концентрации масла в них уменьшается, вплоть до нулевой (вторая фаза накопления масла в семенах). В крупных семенах сорта Аура (массой преимущественно более 200 мг) концентрация масла в семенах снижается с ростом массы семян (третья фаза накопления масла в семенах). Для мелкосемянного сорта Алина отмечено наличие только первой и второй фаз накопления масла в семенах (без фазы снижения концентрации масла в семенах). Для сорта Аура, который характеризуется более крупными семенами, отмечено наличие всех трех фаз накопления масла в семенах.

В целом, в процессе роста семян на растении содержание масла в семенах строго коррелирует с массой семян. Первые две фазы, связанные с накоплением масла на начальных этапах роста и наполнения семян, переходят в заключительный этап - уменьшения концентрации масла с увеличением массы семян. Зависимость содержания масла в семенах от их массы зависит от генетики и физиологии растений сои. Накопление масла в семенах растений сои сорта Аура характеризуется наличием всех трех фаз. Для растений сорта Алина выявлены только первые две фазы, что связано с более напряженным водным статусом листьев растений этого сорта.

## Симпозиум 2. Гормональная и генетическая регуляция роста, развития и продуктивности растений

### Устные доклады

Ассоциативное картирование хромосомных локусов, определяющих содержание свободных аминокислот у культур стержневой коллекции *Brassica rapa* L. ВИР В КОНТРОЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ

Association mapping of chromosome loci, determined content of free amino acids in VIR *Brassica rapa* L. core collection crops in controlled conditions

Артемьева А.М., Соловьева А.Е., Кочерина Н.В., Чесноков Ю.В.

ФГБНУ ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И.Вавилова (ВИР)», ул. Большая Морская, 42-44, Санкт-Петербург, 190000 Россия

+7 812 571-85-39, +7 812 571-82-74, [akme11@yandex.ru](mailto:akme11@yandex.ru)

Свободные аминокислоты участвуют в обмене азотистых веществ организмов (исходное соединение при биосинтезе гормонов, витаминов, медиаторов, пигментов, пуриновых и пиримидиновых оснований, алкалоидов и др.). В клетках и тканях живых организмов встречается около 300 различных аминокислот, 20 из них относятся к протеиногенным, а остальные аминокислоты встречаются как в виде свободных молекул, так и в связанном виде. Незаменимыми для взрослого человека являются 8 аминокислот: валин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин; для детей дополнительно аргинин и гистидин; полузаменимые тирозин и цистеин. Материалом исследований состава свободных аминокислот культур вида *Brassica rapa* L. в защищенном грунте являлись 87 образцов стержневой коллекции *B. rapa*: пекинская капуста (26 обр.), китайская капуста (8 обр.), розеточная капуста (4 обр.), ноздреватая капуста (2 обр.), японская капуста (3 обр.), пурпурная капуста (1 обр.), листовая репа (7 обр.), корнеплодная репа (10 обр.), масличная сурепица (24 обр.), дикая сурепица (2 обр.). Использованный метод анализа: газо-жидкостная хроматография. Растения выращивали в зимней теплице Пушкинских лабораторий ВИР, при ранне-весеннем посеве.

Количественное содержание и качественный состав найденных свободных аминокислот весьма разнообразен. В составе небелковых азотсодержащих соединений различных капустных культур в тепличных условиях нами найдены 22 аминокислоты, среди которых у всех образцов вида выявлены незаменимые и полунезаменимые аминокислоты валин, лейцин и треонин, у

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

большинства образцов – лизин, тирозин и триптофан, у половины образцов – метионин; фенилаланин был найден у 7 образцов; изолейцин, аргинин, гистидин, цистеин отсутствовали. Также у всех изученных образцов обнаружены аланин, серин, этаноламин, глицин, оксипролин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты; у большинства образцов – гамма-аминомасляная кислота, аспарагин, глутамин, аденозин; у трети образцов – норлейцин, у отдельных образцов – пролин и орнитин. Общее содержание аминокислот колебалось от 8,11 до 382 мг/100г (в среднем 61,65 мг/100г).

Повышенным количеством свободных аминокислот характеризовались образцы дикой сурепицы, репы, китайской капусты, среди образцов которой особенно выделился Тайна (к-46, Россия) с максимальным значением аминокислот. Ценные образцы с высоким общим содержанием аминокислот найдены среди масличной сурепицы: к-135 из Индии (115,8 мг/100г), дикой сурепицы к-218 из Перу (133,3 мг/100г), репы: Петровская, Норфолькский фиолетовоголовый, Золотой шар (120,4-133,6 мг/100г), пекинской капусты различных сортотипов из Японии и Казахстана (89,0-151,9 мг/100г). Следует отметить, что общее высокое содержание аминокислот у этих образцов связано с повышенным содержанием таких аминокислот, как валин, аланин, серин, лейцин, треонин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, лизин, тирозин, при этом средний для культуры уровень был превышен в 2-5 раз.

Для ассоциативного картирования генетических локусов, определяющих проявление содержания свободных аминокислот, использовали 258 SSR и S-SAP маркеров. Последние созданы на основе последовательностей мобильных генетических элементов (МГЭ) II класса САСТА. Ассоциативное картирование осуществляли с помощью программы TASSEL. Для исследованных аминокислот были выявлены SSR и S-SAP ассоциированные с ними маркеры с высоким уровнем значимости. Определено, что отдельные хромосомные локусы контролируют содержание многих аминокислот: таковы локусы внизу третьей группы сцепления, один из которых контролирует содержание 13 аминокислот (маркер BRMS\_38-196), а второй – содержание 10 аминокислот (маркер BRMS\_050), локус в середине пятой группы сцепления контролирует содержание 9 аминокислот (маркер BRMS\_034), локус времени перехода к цветению *FLC2*, расположенный в верхней части второй группы сцепления, сцеплен с признаками содержания 5 аминокислот. Согласно нашим предшествующим исследованиям, перечисленные локусы контролируют и другие важные биохимические признаки, такие как содержание каротинов и хлорофиллов. Обнаружен хромосомный локус, маркированный маркером Na12H07 с молекулярной массой 135 пн, контролирующей содержание 12 аминокислот.

Таким образом, найдено месторасположение хромосомных локусов, контролирующих содержание свободных аминокислот; ассоциированные с ними молекулярные маркеры могут быть использованы для скрининга образцов коллекций и селекционного материала.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 15-29-05837.

## Идентификация ключевых аминокислотных остатков интерфейса взаимодействия рецепторов цитокининов и фосфотрансмиттеров

The identification of key amino acid residues in the interface of interaction of cytokinin receptors with phosphotransmitters

Архипов Д.В., Ломин С.Н., Романов Г.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук, 127276, ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия

+7 499 977-94-09, +7 499 977-80-18, [hotdogue@yandex.ru](mailto:hotdogue@yandex.ru)

Передача цитокининового сигнала сопряжена с рядом белок-белковых взаимодействий между компонентами сигнальной системы многоступенчатого фосфопереноса (multistep phosphorelay system, MSP). В числе этих взаимодействий у арабидопсиса – димеризация цитокининовых рецепторов – сенсорных гистидинкиназ (АНК), взаимодействие ресиверного домена (RD) рецептора с фосфотрансмиттером (АНР), также димеризация самих фосфотрансмиттеров, и, наконец, взаимодействие АНР с ресиверным доменом регулятора ответа (ARR). В нашем исследовании рассматриваются некоторые структурные особенности взаимодействия в одном из начальных этапов цитокининового сигналинга, а именно взаимодействия между ресиверными доменами гистидинкиназ и фосфотрансмиттерами.

Для изучения молекулярных основ взаимодействий между ресиверными доменами рецепторов цитокининов и фосфотрансмиттерами, методом молекулярного моделирования по гомологии были построены пространственные структуры комплексов белков АНР1-3, взаимодействующих с ресиверными доменами АНК2-4, во всех комбинациях. Модели были оптимизированы и энергетически минимизированы по единому алгоритму. Для выявления ключевых связей был проведен виртуальный аланиновый сканнинг всех комплексов, который показал наличие двух «горячих кластеров» (аминокислот, замена которых на аланин приводит к наибольшему изменению свободной энергии взаимодействия комплекса) в ресиверном домене, которые способны образовывать водородные связи, как минимум, с тремя аминокислотами фосфотрансмиттера. В паре АНК3rd-АНР2, которая была выбрана для дальнейшего детального изучения, этими «горячими» аминокислотами со стороны ресиверного домена являются Asn898 и Asn901, а их партнерами по водородным связям со стороны фосфотрансмиттера Gln83, Ser87 и Ser90.

Для экспериментальной проверки влияния этих аминокислот на взаимодействие изучаемых белков, был проведен сайт-направленный мутагенез (с заменой вышеназванных аминокислот на аланин), в результате которого были получены одиночные и двойной мутанты АНК3, а также одиночные, двойные и тройной мутанты АНР2. Взаимодействие исходных и мутантных белков изучалось методом BiFC (бимолекулярная флуоресцентная комплементация). Парамии агробактериальных клонов, несущих гены белков

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

(взаимодействие которых требовалось изучить), сшитых с комплементарными фрагментами YFP (желтого флуоресцентного белка), транзientно трансформировали листья *Nicotiana benthamiana*, где осуществляется экспрессия данных генов рекомбинантных белков. Степень взаимодействия рекомбинантных белков в листьях табака оценивали по флуоресценции с помощью конфокальной микроскопии. Контроль экспрессии белков осуществляли методом иммуноблоттинга. Было установлено, что мутации в фосфотрансмиттере ослабляли взаимодействие АНК3-АНР2, причем тройная мутация практически прекращала его, вне зависимости от наличия или отсутствия мутаций в рецепторе, что можно рассматривать как подтверждение ключевой роли выделенных в результате моделирования аминокислот. Однако при взаимодействии рецепторов с диким типом фосфотрансмиттера, хотя замена Asn898 на аланин в АНК2 также снижала уровень флуоресценции, но в случае с мутацией Asn901 и двойным мутантом этот уровень не снижался, а даже немного увеличивался. Тот факт, что тройная мутация в АНР2 редуцировала взаимодействие, а двойная мутация в АНК3 - нет, можно объяснить предполагаемой возможностью фосфотрансмиттера взаимодействовать с другим участком рецептора, например, с его псевдоресиверным доменом. Эта возможность сохраняется в связи с тем, что в опытах с BiFC использовался полноразмерный рецептор, а не отделенный ресиверный домен. Если это предположение подтвердится в наших будущих исследованиях, то это существенно расширит наше представление о молекулярных механизмах передачи цитокининового сигнала. Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований, проекты № 14-04-01714 и №16-34-01065\16.

## Генетическая регуляция накопления каротиноидов в плодах томата

### Genetic regulation of carotenoid accumulation in tomato fruits

Бабак О.Г., Никитинская Т.В., Некрашевич Н.А., Кильчевский А.В.

ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси». ул. Академическая, 27, г. Минск, Республика Беларусь, 220072  
+375(17)284-19-16, [babak\\_olga@mail.ru](mailto:babak_olga@mail.ru)

Наблюдаемое на фенотипическом уровне разнообразие окраски плодов томата связано с комбинированием структурных генов, обеспечивающих синтез и превращение определенных пигментов, и регуляторных, определяющих уровень экспрессии структурных генов. Основу биологически активных веществ в плодах томата составляют каротиноиды. Молекулярные исследования генов, принимающих участие в процессе биосинтеза каротиноидов, позволили определить ключевые ферментативные шаги пути их биосинтеза и генетическую детерминацию. Важность разработки молекулярных методов позволяющих определить конкретные формы каротиноидов, связана с накоплением их на последних этапах развития

плодов, также с невозможностью фенотипической дифференциации ряда накапливаемых каротиноидов, биологическая ценность которых различна. Наряду с биохимическими показателями плодов, важными являются и технологические, позволяющие сохранить высокое качество продукции длительный период. Регуляторные гены, контролирующие созревание плодов томата (*rin*, *nor*, *nor<sup>A</sup>*), представляют наибольшую ценность для практической селекции, так как имеют достаточно выраженный фенотипический эффект в гетерозиготе, что позволяет существенно улучшать товарные и технологические качества плодов, не ухудшая биохимический состав. К числу регуляторных генов, используемых в селекции на повышенное содержание каротиноидов, относят мутации светозависимых транскрипционных факторов *high pigment* (*hp-1*, *hp-2<sup>dg</sup>*) а также вовлеченных в синтез каротиноидов и деградацию хлорофилла мутаций *green flesh* (*gf-3*, *gf-5*). Сочетание указанных генов с рядом структурных - *tangerine* (*t*), *Beta* (*B*), *Delta* (*Del*), *old-gold* (*og<sup>c</sup>*) и др., контролирующих биосинтез определенных каротиноидов, позволяет создавать разнообразные формы с высокими вкусовыми и технологическими качествами. Нами разработаны методические рекомендации по ДНК-типированию генов качества плодов вышеуказанных аллелей структурных и регуляторных генов томата.

Целью данных исследований являлось создание форм с сочетанием комплекса генов качества с использованием разработанных методик и изучение закономерностей накопления каротиноидов в зависимости от комбинации аллелей.

Материалом для исследований были формы с гомозиготным сочетанием отдельных аллелей (*t*, *B*, *og<sup>c</sup>*, *gf-3*, , *hp-2<sup>dg</sup>*, *rin*, *nor*, *nor<sup>A</sup>*); двойные гомо- и гетерозиготы *nor/nor//og<sup>c</sup>/og<sup>c</sup>*, *nor/nor//B/B*, *rin/rin//og<sup>c</sup>/og<sup>c</sup>*, *rin/rin//B/B*, *t/t//nor/nor*, *t/t//nor<sup>A</sup>/nor<sup>A</sup>*, *nor/nor//gf-3/gf-3*, *og<sup>c</sup>/og<sup>c</sup>//hp-2<sup>dg</sup>|hp-2<sup>dg</sup>*, *B/B//hp-2<sup>dg</sup>/hp-2<sup>dg</sup>*, *hp-2<sup>dg</sup>/hp-2<sup>dg</sup>//gf-3/gf-3*; гомозиготы по генам измененного содержания каротиноидов и гетерозиготы по генам, удлиняющим период сохранности плодов: *nor/nor<sup>wt</sup>//og<sup>c</sup>/og<sup>c</sup>*, *nor/nor<sup>wt</sup>//B/B*, *rin/rin<sup>wt</sup>//og<sup>c</sup>/og<sup>c</sup>*, *rin/rin<sup>wt</sup>//B/B*, *t/t//nor<sup>A</sup>/nor<sup>wt</sup>*, *nor/nor<sup>wt</sup>//gf-3/gf-3*; тройные гомо- и гетерозиготы с сочетаниями аллелей *rin/og<sup>c</sup>/hp-2<sup>dg</sup>*, *rin/B/hp-2<sup>dg</sup>*, *rin/og<sup>c</sup>/gf-3*, *rin/B/gf-3*, *nor/og<sup>c</sup>/hp-2<sup>dg</sup>*, *nor/B/hp-2<sup>dg</sup>*, *nor/og<sup>c</sup>/gf-3*, *nor/B/gf-3*. Данные формы отобраны с использованием разработанных методов из популяций F<sub>2</sub>. Растения выращивались в остекленных теплицах. Анализ пигментного состава плодов томата проводился методами спектрофотометрии и ВЭЖХ.

В результате анализа выявлены следующие особенности накопления пигментов в плодах томата: несмотря на уменьшение накопления каротиноидов под действием генов *rin*, *nor*, *nor<sup>A</sup>*, их сочетание в генотипе в гетерозиготном состоянии с генами *B*, *og<sup>c</sup>*, *t*, *hp* в гомо- и гетерозиготном состоянии восстанавливает накопление каротиноидов в плодах томата до уровня стандартов - форм без генов лежкости.

Максимальное накопление ликопина в плодах томата обеспечивается сочетанием аллелей *og<sup>c</sup>/gf-3* и *og<sup>c</sup>/hp-2<sup>dg</sup>*. Каротина - *B/hp-2<sup>dg</sup>*. Аллели лежкости в гомозиготном состоянии значительно уменьшают накопление каротиноидов.

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

Для использования полученных результатов в селекционном процессе выявлены сочетания аллелей генов качества плодов и отобраны формы, обеспечивающие высокое накопление различных каротиноидов и длительный период сохранности плодов:  $\beta$ -каротина - образцы с сочетанием генов *nor* и *B*, *rin* и *B*;  $\zeta$ -каротина - *nor* и *t*; ликопина - *nor* и *og<sup>c</sup>*. Аллели *gf-3* и *hp-2<sup>dg</sup>* способствуют увеличению накопления каротиноидов, детерминированных основными структурными генами, в плодах, задерживая период созревания на 5-10 дней. Выделен образец с гетерозиготным сочетанием аллелей *nor/ogc//hp-2<sup>dg</sup>*, с максимальным содержанием ликопина и продуктивностью на уровне стандартов. Использование образцов с геном *hp-2<sup>dg</sup>* при создании гибридов в качестве материнской формы обеспечивает образование большего количества ликопина по сравнению с образцами, где ген *hp-2<sup>dg</sup>* находится в отцовской форме.

## Участие азотного метаболизма в ответной реакции растений на изменение уровня освещенности

### Role of nitrogen metabolism in plant response to changes in irradiance level

Баташева С.Н., Хамидуллина Л.А., Абдрахимов Ф.А., Чиков В.И.

ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН. ул.

Лобачевского, д. 2/31, а/я 30, 420111 г. Казань, Россия

+7 843 2319046, +7 843 2927347, [sbatasheva@mail.ru](mailto:sbatasheva@mail.ru)

Известно, что многие процессы в растениях регулируются соотношением азота и углерода (C/N-балансом), однако механизм этой регуляции до сих пор неизвестен. Как затенение растений, так и повышение азотного питания должны приводить к снижению отношения C/N, а следовательно, оказывать сходное влияние на зависимые от этого соотношения процессы метаболизма, в первую очередь – процесс фотосинтеза. В связи с этим, целью данной работы было выяснение изменений фотосинтеза и фотосинтетического углеродного метаболизма у растений кукурузы и подсолнечника в ответ на изменение условий освещения и снабжения азотом.

Растения подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) и кукурузы (*Zea mays* L.) выращивали при естественном освещении на вегетационной площадке. За 5 дней до опыта часть растений затеняли до уровня 50% солнечной радиации, и накануне опыта половину растений поливали раствором  $KNO_3$ . Непосредственно перед исследованием фотосинтеза часть затененных растений выносили на 3 мин на свет, а для части выращенных на свету растений на 3 мин снижали освещенность до 50%, после чего экспонировали лист 2 мин в  $^{14}CO_2$  в текущих условиях освещения.

Интенсивность фотосинтеза у адаптированных к свету растений кукурузы была примерно на 25% выше, чем у растений, адаптированных к условиям затенения. При переносе затененных растений на свет интенсивность фотосинтеза возрастала и почти достигала уровня адаптированных к свету



растений, в то время как при переносе свет-тень, интенсивность фотосинтеза резко падала и была ниже, чем в условиях адаптации к тени. Точно такие же реакции наблюдались ранее в наших опытах на растениях картофеля. У растений подсолнечника реакция на изменение освещенности была совершенно другой: при резком снижении освещенности интенсивность фотосинтеза снижалась до уровня адаптированных к тени растений (но не ниже), а при повышении освещенности интенсивность фотосинтеза, хотя и возрастала, но все же не достигала уровня адаптированных к свету растений.

Повышение нитратного питания также по-разному влияло на эти виды растений. У растений кукурузы при повышении азотного питания интенсивность фотосинтеза была выше на свету, однако значительно ниже в тени, по сравнению с контрольными растениями в тех же условиях. Негативное влияние резкого снижения освещенности на интенсивность фотосинтеза сильнее проявлялось на фоне повышенного нитратного питания. У растений подсолнечника нитратное питание немного увеличивало интенсивность фотосинтеза практически при всех вариантах освещения, при этом отрицательное действие нитратов при резком снижении освещенности не наблюдалось. У обоих видов растений повышение нитратного питания приводило к характерным изменениям метаболизма: к снижению доли сахаров, увеличению относительной радиоактивности малата и аминокислот, особенно аспартата в случае кукурузы. По-видимому, при повышении нитратного питания кукурузы С4-оксикислота оксалоацетат становится главным акцептором восстановленного азота. Аспартат сильнее других аминокислот реагировал также на изменение уровня освещенности.

Мы предполагаем, что наблюдаемые различия во влиянии нитратов на интенсивность фотосинтеза при резком снижении освещенности и в стратегии адаптации к условиям освещения у растений этих 3 видов могут быть связаны с тем, что у подсолнечника, в отличие от кукурузы и картофеля, восстановление нитратов происходит, главным образом, в корне. У кукурузы и картофеля восстановление нитрата, по-видимому, занимает приоритетное положение по сравнению с восстановлением углекислоты, что оказывает отрицательное действие при резком снижении или в условиях низкой освещенности. О приоритетности азотного метаболизма свидетельствует повышение отношения аминокислоты/сахара при затенении этих видов растений, особенно заметное в условиях высокого снабжения нитратами. При этом синтез азотсодержащих веществ за счет азота, полученного путем восстановления нитрата позволяет растениям сохранить высокий уровень фотосинтетических ферментов и быстро повысить активность фотосинтеза при резком увеличении освещенности.

Поскольку у подсолнечника восстановление нитратов происходит главным образом в корнях, нитратная подкормка не оказывает негативного влияния на интенсивность фотосинтеза при затенении растений. При резком снижении освещенности отношение аминокислоты/сахара на фоне нитратного питания растет незначительно, что указывает на сохранение высокой активности синтеза сахаров – основных транспортных продуктов, необходимых для поддержания восстановления нитрата в корнях. Вероятно, часть азота для

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

синтеза азотсодержащих веществ при затенении у подсолнечника поступает за счет распада неиспользуемых фотосинтетических ферментов, что приводит к неспособности растений, переведенных из тени на свет, быстро повысить скорость фотосинтеза и достичь уровня адаптированных к свету растений. Кроме того, часть наблюдаемых различий могла быть связана с ингибированием оттока ассимилятов поступающим в листья нитратом.

### Оценка образцов стержневой коллекции вир *Brassica rapa* L. с использованием SSR маркеров

Evaluation of the core sample collection VIR *Brassica rapa* L. using SSR markers

Беренсен Ф.А., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В.

Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова». Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская д. 42-44

+7 951 6890655, [fbereinsen@gmail.com](mailto:fbereinsen@gmail.com)

Вид *Brassica rapa* L. включает в себя большое количество экономически важных и ценных овощных, кормовых и масличных сельскохозяйственных культур. За высокое содержание питательных веществ, витаминов, природных антиоксидантов, растения вида *Brassica rapa* всегда высоко ценились во всем мире. Большое количество разнообразных морфотипов, малый размер генома и его генетическая близость к секвенированному геному рода *Arabidopsis*, позволяет виду *B. rapa* хорошо подходить на роль модельного объекта для генетических исследований, в том числе в области картирования локусов количественных признаков (QTL), изучения механизмов наследования QTL, сцепленных с важными признаками качества и маркирования QTL с использованием молекулярных маркеров. В ВИР хранится и пополняется коллекция

*B. rapa*, насчитывающая более 850 образцов восточноазиатских капуст и листовых реп, 450 образцов корнеплодной репы. Имеющаяся исследовательская база позволяет проводить исследования, направленные на анализ уже имеющегося растительного материала и выведение новых, современных сортов, отличающихся высокими биохимическими и морфологическими признаками качества, а также такими важными характеристиками как скороспелость, устойчивость к раннему стеблеванию, урожайность, товарный вид и другими.

Целью нашего исследования было проведение молекулярно-генетического скрининга образцов стержневой коллекции *Brassica rapa*, посредством молекулярных SSR маркеров, с последующим анализом аллельного полиморфизма у ранее найденных QTL сцепленных с хозяйственно-ценными признаками качества.

В качестве исследуемого растительного материала были отобраны 50 фенотипически различных образцов *B. rapa* разного происхождения из

стержневой коллекции ВИР - 17 образцов пекинской капусты, 8 образцов китайской, 3 образца японской, 5 образцов капусты ноздреватой, 1 стабильный гибрид между китайской и ноздреватой капустой, 4 образца листовой и 12 образцов корнеплодной репы. В исследовании были использованы 7 SSR маркеров неравновесного сцепления, генетически сцепленных с хозяйственно ценными биохимическими и морфологическими признаками качества, находящихся в 5 различных группах сцепления. Для выбора молекулярных маркеров использовались данные генетических карт картирующих популяций *B. rapa* DH30 и DH38 и данные ранее проведенных исследований. Выделение ДНК проводили из молодых, зеленых листьев, по пять растений в каждом образце, по методике Д.Б. Дорохова и Э. Клоке. Для молекулярно-генетического скрининга образцов использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). В реакционную смесь конечным объемом 25 мкл. добавляли: 2,5 мкл., 10x инкубационный буфер, 0,4 мкл смеси dNTP 1,76 мМ каждого (Интерлабсервис, Россия), по 1 мкл каждого праймера (10 пикомоль/мкл), 0,4 мкл Taq ДНК- полимеразы (5 ед/мкл) (Сибэнзим, Россия) и 20 нг геномной ДНК. Амплификацию осуществляли в ДНК-термоциклере (BioRad, Германия). Результаты амплификации визуализировали при помощи ДНК-электрофореза в 3% агарозном геле, с окрашиванием бромистым этидием и последующей фиксацией в гель-документационной системе (BioRad, Германия).

В результате проведения молекулярно-генетического скрининга 7 SSR маркерами 50 образцов *B. rapa* уровень полиморфизма составил 23 полиморфных фрагмента размером от 122 до 380 пар нуклеотидов. Отобранные SSR-маркеры показали наличие ПЦР фрагмента в 98% случаев. Молекулярные маркеры семейств NA, O1, KS проявили больший полиморфизм, чем маркеры семейства BRMS (по усредненным данным – 3,3 и 3 полиморфных фрагмента соответственно). При молекулярном анализе со всеми SSR маркерами, полиморфизм образцов китайского происхождения был выше, чем у образцов из Японии в среднем на 15%. Образцы Российского происхождения, представляющие в основном корнеплодную репу, показали самый низкий полиморфизм, близкий к образцам из Японии. При скринировании 3 маркерами из 7, образцы пекинской капусты из Кореи, относящиеся к разным сортотипам, давали одинаковый набор аллелей.

Наибольшее количество одинаковых комбинаций аллелей было найдено у ноздреватой, а наименьшее у пекинской капусты. В молекулярных маркерах наивысший процент одинаковых комбинаций был у маркеров BRMS-034 и O110-D08, наименьший был обнаружен у маркеров Na10-D09 и BRMS-043. Наибольший полиморфизм был отмечен у Na10-D09 – пять аллелей размером от 273 до 360 п.н. Отобранные нами маркеры в 32.8% случаев давали одинаковые фрагменты у образцов одного подвида. При скрининге каждым маркером, одинаковый аллель был найден у всех образцов в 65-100% случаев, в среднем – 80,2%. В 87% у образцов одного сортотипа один из фрагментов был общий для всех образцов данного сортотипа.

В результате проведенного молекулярно-генетического скрининга восточноазиатских капуст и реп стержневой коллекции ВИР *B. rapa* с

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

использованием SSR маркеров неравновесного сцепления была установлена возможность анализа аллельного полиморфизма гетерозиготных образцов *B. rapa* и проведения оценки растительного материала. Используемые в настоящем исследовании молекулярные маркеры можно также рекомендовать для дальнейших исследований *Brassica rapa* L. и проведения молекулярной маркер-вспомогательной помощи селекции у образцов данного вида растений.

### Изучение содержания ауксинов, цитокинина и абсцизовой кислоты в динамике прорастания семян ячменя после гамма-облучения малыми дозами

Studying of the content of auxin, cytokinin and abscisic acid in dynamics of barley seeds intergrowth after gamma-irradiation in stimulating doses

Битаршвили С.В., Волкова П.Ю., Гераськин С.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и  
агроэкологии, 249032, Киевское ш., 109 км, Обнинск, Россия

+7 910 869-58-41, bitarishvili.s@gmail.com

Фитогормоны играют важнейшую роль в механизмах адаптации растений к неблагоприятным факторам окружающей среды, к числу которых относят ионизирующее излучение. В диапазоне малых доз ионизирующего излучения наблюдается эффект радиационного гормезиса, который в случае предпосевного облучения семян проявляется как стимуляция прорастания и увеличение процента всхожести семян. С целью изучения этого эффекта мы исследовали влияние гамма-облучения семян в стимулирующих дозах на динамику изменения фитогормонального статуса проростков на ранних этапах онтогенеза.

В качестве объекта использовали проростки ячменя сорта Нур. Сухие семена облучали в дозах 4, 8, 12, 16, 20 Гр, высевали рулонным методом с дистиллированной водой. Концентрацию фитогормонов определяли в проростках с 3 по 7 день. С 4 дня в листьях и корешках отдельно. Пробоподготовка включала фиксацию растительного материала 80% метанолом, гомогенизацию, соникацию, очистку от примесей, твердофазную экстракцию, концентрирование. Количественный анализ проводился методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ). Разделение осуществлялось на обращено-фазовой колонке С-18 (2,2 мкм, 100 мм длина, 3,0 мм диаметр). В качестве растворителей при градиентном элюировании использовались метанол и 0,1% водный раствор уксусной кислоты.

Установлено, что содержание абсцизовой кислоты (АБК) в трехдневных проростках после облучения семян дозами 4, 12, 16, 20 Гр снижается, причем минимальная концентрация обнаружена при 4 Гр. В то время как при 8 Гр происходит увеличение концентрации почти в 2 раза. Похожая картина

наблюдается в корешках и листьях 4-7 дневных проростков: при дозах 12-20 Гр происходит снижение концентраций АБК во всем проростке, при 8 Гр в корешках содержание фитогормона выше, чем в контроле, тогда как в листьях такое повышение отмечается лишь на 5 день. Максимальные концентрации АБК зафиксированы при 4 Гр на 7 день в листьях и корешках, хотя с 4 по 6 день содержание фитогормона было ниже контрольных значений.

Исследование содержания основного цитокинина зеатина показало увеличение концентраций фитогормона в 3-х дневных проростках при всех дозах облучения семян. Максимальная концентрация почти в 10 раз выше контрольного значения была зафиксирована при 8 Гр. В корешках так же наблюдается увеличение содержания зеатина. Наибольшие концентрации фитогормона были обнаружены при 4 Гр на 5 и 7 день.

Результаты анализа ауксинового ответа на облучение демонстрируют увеличение содержания индолилуксусной кислоты (ИУК) в 3-х дневных проростках ячменя при всех дозах с максимумами концентраций при 8 и 16 Гр. В то время, как содержание индолилмасляной кислоты (ИМК) снижается в этих проростках при 16 Гр. В последующие дни прорастания наблюдаются отличия в проявлении эффекта в разных частях проростков. ИУК-ответ более выражен в корешках, где наблюдается увеличение содержания фитогормона при всех дозах облучения. В листьях повышенные концентрации фиксировались лишь при некоторых дозах в зависимости от дня прорастания. ИМК, наоборот, активнее накапливается в листьях в ответ на облучение при всех используемых дозах. В корешках наблюдается различная динамика содержания фитогормона: на 4 день прорастания снижение концентраций фиксировалось при 4 и 8 Гр, тогда как при больших дозах 16 и 20 Гр наблюдалось увеличение. На 5 и 6 дни прорастания возрастали концентрации фитогормона при 8 и 20 Гр, к 7 дню снижались до контрольного уровня. Так же пониженное содержание ИМК наблюдалось в корешках при 12 и 16 Гр на 7 день и при 4 Гр во все дни прорастания.

Полученные данные позволяют заключить, что гамма-облучение семян в малых дозах влияет на динамику изменения содержания фитогормонов в проростках в процессе их прорастания, преимущественно повышая накопление ростстимулирующих гормонов и уменьшая содержание ингибитора. Зависимость концентраций от доз носит нелинейный характер. Сдвиги в фитогормональном балансе обуславливаются различной локализацией накопления гормонов. Очевидно, подобные изменения в фитогормональном статусе носят неспецифичный характер и являются необходимым звеном в процессе формирования эффекта радиационного гормезиса.

## Регуляция роста и стрессоустойчивости растений и клеточных культур экзогенными аналогами гормонов

Regulation of growth and stress-resistance in plants and cell cultures by exogenous hormone analogues

Ведашкина О.А., Михайлова И.Д., Лукаткин А.А., Лукаткин А.С.

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, ул. Ульянова, 266, к. 502, г. Саранск, Россия

+7 8342 322507, +7 8342 324554, [aslukatkin@yandex.ru](mailto:aslukatkin@yandex.ru)

На растения в естественных условиях воздействует широкий ряд абиотических, биотических и антропогенных стрессоров различной природы и интенсивности. Неблагоприятные воздействия приводят к многочисленным нарушениям физиологических процессов, в результате – к повреждениям и падению продуктивности культурных растений. Известно, что в основе таких эффектов стрессоров лежит возникновение в клетках растений окислительного стресса – состояния, характеризующегося смещением про/антиоксидантного равновесия в направлении усиления генерации активированных форм кислорода (АФК) и снижения антиоксидантной защиты. Ранее была показана высокая эффективность регуляторов роста (РР), аналогов гормонов растений различной химической природы, в плане снижения повреждающего действия стрессоров различной природы. Посредством экзогенной обработки РР можно изменить в клетках растений как уровень генерации АФК при стрессах, так и активность антиоксидантной системы. Однако в растениях эти экзогенные обработки приводят к возмущениям всей гормональной системы, приводя к непрогнозируемым нарушениям синтеза, активности и функционирования эндогенной гормональной системы. Удобной моделью для изучения стрессовой реакции растительных клеток является каллусная культура, в которой отсутствуют надклеточные механизмы регуляции, и которая позволяет оценить эффекты экзогенных РР в растительных клетках, подвергающихся стрессовым воздействиям. В связи с этим целью работы был сравнительный анализ ответных реакций молодых растений и каллусных культур на вводимые извне РР на фоне острого и хронического действия и последствия абиотических и антропогенных стрессоров.

В работе использовали молодые растения и каллусные культуры огурца (*Cucumis sativus* L.), редиса (*Raphanus sativus* L.) и кукурузы (*Zea mays* L.), и РР различной природы, главным образом аналоги цитокининов (тидазурон, 6-бензиламинопурин, цитодеф), брассиностероидов (эпибрассинолид – Эпин-Экстра), а также Рибав-Экстра, иммуноцитифит. Из предварительно обработанных разными дозами РР семян выращивали растения и подвергали их действию пониженных (2–3°C) или повышенных (43–45°C) температур, осмотического стресса, тяжелых металлов (ТМ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , от 10 мкМ до 10 мМ), ксенобиотиков – гербицидов (паракват, Топик, Гранстар). Каллусные линии, полученные от разных эксплантов, помещали на среду Мурасиге-Скуга с добавлением различных РР и их концентраций, после чего

подвергали воздействию неблагоприятных температур или ТМ. В динамике стрессового действия оценивали изменения прооксидантной активности (по генерации супероксидного анион-радикала, уровню  $H_2O_2$ , интенсивности перекисного окисления липидов), а также антиоксидантной системы (по общей антиоксидантной активности, защитным ферментам – супероксиддисмутазе, аскорбатпероксидазе, каталазе).

Показано, что у растений, выращенных из обработанных синтетическими или природными РР семян, реакция на действие абиотических и антропогенных стрессоров выражена слабее, чем в контроле. Это показано как по генерации АФК и другим проявлениям окислительного стресса, так и по сдвигам активности антиоксидантной системы. Аналогичным образом, реакция каллусных культур на стрессорные воздействия модифицировалась при различных дозах РР в среде. Сравнение растений и каллусных культур показало, что реакция клеток *in vitro* на стрессорные воздействия выражена сильнее, чем у молодых растений, при равной интенсивности/дозе стрессора. Очевидно, РР могут повышать резистентность растений к абиотическим стрессорам посредством снижения соотношения про/антиоксидантов в растительных клетках. Выявленные эффекты РР варьировали для разных видов растения и концентраций препаратов. При этом концентрационные эффекты РР, направленные против стрессорных воздействий, сильно зависели как от вида стрессора и его дозы, так и от особенностей растений/клеточных культур и условий их выращивания.

Работа выполнена в рамках выполнения конкурсного проекта Министерства образования и науки России (проект № 6.783.2014К).

## Роль фитогормонов в развитии защитных реакций растений пшеницы при грибном патогенезе

Involvement of phytohormones in the defense response of wheat plant under fungal pathogenesis

Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В.

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,  
пр. Октября 71, г. Уфа, Россия  
+7 8347 235-60-88, veselova75@rambler.ru

Развитие защитных реакций под влиянием биотических стрессовых факторов во многом зависит от способности растений продуцировать различные фитогормоны и сигнальные молекулы, выполняющие ключевую роль в индукции системной устойчивости против фитопатогенов. Продукция активных форм кислорода (АФК) является самой ранней реакцией растений на инфицирование и контролируется фитогормонами. Далее развитие системной устойчивости сопровождается синтезом защитных патоген-индуцируемых белков (PR-белков, от **p**athogenesis **r**elated), экспрессия генов которых в основном находится под контролем салициловой (СК), жасмоновой (ЖК) кислот и этилена, играющих важную роль в иммунитете растений. Однако исследования последних лет показывают, что иммунитет растений

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

регулируется не только СК, ЖК и этиленом, но комплексом всех фитогормонов, в том числе цитокининами (ЦК) и абсцизовой кислотой (АБК). Кроме того, известно, что салицилат (СК)- и этилен-зависимые защитные отводы растений при патогенезе – два сигнальных пути, проявляющих антагонизм, но влияние этилена на СК-путь неоднозначно и остается не до конца изученным, а сведения о роли ЦК и АБК в патогенезе противоречивы. В той или иной ситуации один и тот же фитогормон может, как защищать растения от патогенов, так и способствовать их развитию в тканях растения-хозяина.

Нами было изучено влияние СК, этилена, ЦК и АБК на развитие защитных реакций в двух контрастных по устойчивости сортах растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) инфицированных гембиотрофным грибом *Septoria nodorum* Berk. В начальный период инфицирования устойчивый сорт Омская 35 (Ом35) отличала интенсивная генерация пероксида водорода ( $H_2O_2$ ), высокая активность пероксидаз (ПО) и снижение активности каталаз (КАТ), а у восприимчивого сорта Казахстанская 10 (Каз10) низкая пероксидазная активность и усиление каталазной активности, скорее всего, были причинами слабой генерации  $H_2O_2$  и интенсивного развития патогена в листьях. Предпосевная обработка семян пшеницы СК и обработка листьев 1-метилциклопропеном (1-МЦП) (ингибитором связывания этилена с его рецепторами) увеличивала устойчивость растений пшеницы обоих сортов к септориозу, скорее всего, за счет усиления генерации  $H_2O_2$ , повышения активности ПО и ингибирования активности КАТ, что проявлялось в уменьшении зон поражения. Это подтверждается нашими данными об увеличении зон поражения и снижении активности ПО при отсутствии  $H_2O_2$  в обработанных аскорбатом (ASP) инфицированных растениях пшеницы обоих сортов. Интересно, что обработка растений этиленпродуцентом этефоном (2-хлорэтилфосфоновой кислотой) (ЭТ) приводила к резкому снижению устойчивости обоих сортов пшеницы к инфекции, что проявлялось в обширных зонах поражения с хлорозами, как предполагается за счет снижения генерации  $H_2O_2$ , увеличения активности КАТ и ингибирования активности ПО. Кроме того, в инфицированных растениях устойчивого сорта Ом35 и растениях обработанных СК и 1-МЦП обоих сортов мы наблюдали накопление транскриптов изученных генов, кодирующих защитные белки (PR-1, PR-2, PR-3, PR-9), что не было обнаружено в обработанных ЭТ инфицированных листьях пшеницы. Исходя из этих результатов, можно предположить, что при развитии септориоза в устойчивых формах растений пшеницы посредством генерации АФК индуцировалась СК-зависимая сигнальная система при антагонистическом влиянии этилен-зависимого сигнального пути.

В связи с выше сказанным и имеющимися в литературе сведениями о позитивном воздействии ЦК и отрицательном влиянии АБК на СК-сигнальный путь представляют интерес наши данные об увеличении эндогенного содержания ЦК и снижении эндогенного содержания АБК в случае повышения устойчивости растений к патогену (Ом35, обработка СК и 1-МЦП) и, наоборот, накоплении АБК и отсутствии значительного повышения



содержания ЦК в случае пониженной устойчивости (Каз10, обработка ЭТ). Обработка двух контрастных по устойчивости сортов пшеницы ЦК (зеатином) приводила к сокращению зон поражения на листьях, а обработка АБК, напротив, к увеличению таковых. Защитный эффект ЦК на инфицированные растения значительно снижался при обработке листьев ASP, скорее всего, за счет уменьшения активности ПО. Гистохимический анализ распределения данных фитогормонов показал, что в случае восприимчивости ЦК и АБК локализовались в основном в развивающихся грибных структурах, тогда как клетки самого растения были лишены этих фитогормонов, особенно ЦК. В случае устойчивости ЦК локализовались в клетках растения, а грибные структуры не развивались, что предполагает активацию сигнальной системы ЦК, приводящую к запуску защитных реакций в растениях. Кроме того, четкие различия распределения ЦК, обнаруженные под влиянием 1-МЦП и ЭТ, свидетельствовали о негативной роли этилена в формировании устойчивости растений пшеницы к возбудителю септориоза.

Полученные данные позволяют выдвинуть предположение, что устойчивость растений пшеницы к септориозу регулируется через антагонистическое взаимодействие сигнальных путей салициловой кислоты и этилена при участии цитокининов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-97079-р\_поволжье\_а.

## Влияние цитокинина на физиолого-биохимические показатели карельской березы *in vitro*

### Effect of Cytokinin on Physiological and Biochemical Indices in Curly Birch Shoots *in vitro*

Ветчинникова Л.В.,<sup>1</sup> Титов А.Ф.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса Карельского научного центра РАН, ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, Россия

+7 8142 76-81-60, [vetchin@krc.karelia.ru](mailto:vetchin@krc.karelia.ru)

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра РАН, ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, Россия

+7 8142 76-60-40, [titov@krc.karelia.ru](mailto:titov@krc.karelia.ru)

Изучали влияние цитокинина на рост, развитие, содержание аминокислот и жирнокислотный состав липидов побегов трех клонов *Betula pendula* var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti в условиях *in vitro*. В качестве питательной среды использовали минеральную основу по Мурашиге-Скуга. Культивирование (исходный размер стебля около 5 мм с 1–2 листьями) осуществляли в течение 30 сут при температуре 25±2°C, 16-часовом фотопериоде и искусственном освещении (4500 лк). Цитокинин (в форме его

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

синтетического аналога 6-бензиламинопурина – БАП) вносили в питательную среду в концентрациях 0.25, 0.5, 1.0 или 2.0 мг/л. Контролем служили побеги, полученные на питательной среде, не содержащей БАП.

Исследования показали, что БАП стимулирует рост, развитие побегов и накопление биомассы у всех клонов карельской березы, степень которого зависела от концентрации гормона в питательной среде. Показано, что даже при использовании наименьшей из изученных концентраций БАП (0.25 мг/л) происходит почти двухкратное увеличение массы зеленых побегов. Максимальные ее значения наблюдали при применении концентрации 1.0 мг/л, которая в наибольшей степени способствовала также образованию каллуса, объем которого достигал 36% от общей биомассы. Интересно, что в варианте опыта без внесения в питательную среду БАП (контроль) отмечено явно выраженное ингибирование не только роста и развития побегов, но и процесса каллусообразования, хотя одновременно с этим наблюдалось более активное образование корней и их рост.

Наряду со стимуляцией роста побегов цитокинин вызывал резкое увеличение содержания глутамина (более, чем в 10 раз относительно контроля) и аргинина (почти в 5 раз), хотя при максимальной концентрации БАП (2.0 мг/л) содержание этих аминокислот было близко к уровню контроля. Столь значительные изменения в содержании указанных аминокислот свидетельствуют о серьезных изменениях в обмене веществ. Так, например, в последние годы показана ведущая роль глутамина для активации сигнальных белков P(II) (Forchhammer, 2008), в частности, инициации N-ацетил-L-глутамат-киназы – основного фермента биосинтеза L-аргинина (Chellamuthu et al., 2014). По всей вероятности, увеличение концентрации гормона в питательной среде стимулирует синтез свободных аминокислот, но при его избытке подавляет усвоение азота растущими побегами.

Наиболее заметные изменения в составе жирных кислот под влиянием БАП происходили во фракции гликолипидов, определяющих функциональную структуру ламеллярно-гранулярного комплекса хлоропластов, которые вследствие миксотрофности культуры тканей, являются ключевым звеном в ускорении фотосинтетической деятельности, стимуляции клеточного деления и определении направленности органогенеза *in vitro*. Причем с увеличением концентрации БАП в гликолипидах возрастала доля основных ненасыщенных жирных кислот – линолевой C18:2 и линоленовой C18:3 (в 1,7 и 1,9 раза, соответственно).

Таким образом, изучение регенерационной активности тканей карельской березы *in vitro* показало, что цитокинин вызывает не только усиление роста побегов, но и значительные сдвиги в обмене веществ, которые в частности проявляются в изменении содержания отдельных аминокислот и жирнокислотного состава гликолипидов.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0020-2014-0002) при поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России:

динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий».

## Индукция автофагии в клетках мезофилла мутантов *chlorina* с нестабильной фотосинтетической антенной

Autophagy is induced in mesophyll cells of *chlorina* mutants with destabilised photosynthetic antenna

Тютерева Е.В., Рабаданова К.К., Демидчик В.В., Войцеховская О.В.

ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, ул. Профессора Попова, 2, 197376 Санкт-Петербург, Россия

+7 812 3725443, [ovoitse@binran.ru](mailto:ovoitse@binran.ru)

Стабильность пигмент-белковых комплексов фотосинтетического аппарата оказывает значительное воздействие на физиологические процессы фотосинтезирующей клетки, а также способна индуцировать сигналы на тканевом и организменном уровне. Мутанты *stay-green*, обладающие повышенной стабильностью хлорофилл-содержащих пигмент-белковых комплексов тилакоидных мембран, значительно дольше сохраняют устойчивую зеленую окраску на поздних стадиях онтогенеза, чем растения дикого типа. Различают «функциональный» и «косметический» фенотипы мутантов *stay-green*. В случае «функционального» фенотипа у растений снижается экспрессия генов, ассоциированных со старением, и фотосинтетическая активность поддерживается на высоком уровне в течение более продолжительного времени. У растений «косметического» фенотипа наблюдается индукция старения и снижение интенсивности фотосинтеза как у дикого типа, но при этом в отличие от растений дикого типа у них сохраняется зеленая окраска.

Функциональный *stay-green* фенотип был обнаружен недавно у неспособных к автофагии мутантов *Arabidopsis thaliana*, подверженных «умеренному» абиотическому стрессу. У растений дикого типа в тех же условиях было выявлено намного более раннее старение. Показано также, что функциональный *stay-green* фенотип может развиваться у растений вследствие накопления хлорофилла *b* выше нормального уровня, что приводит к сверхстабилизации фотосинтетической антенны. При старении ключевую роль в процессах утилизации хлоропластных стромальных белков, в первую очередь Рубиско, играет автофагия. Этот процесс в последние годы активно и разносторонне исследуется, постоянно расширяется спектр физиологических функций, в которых он принимает участие. Не исключено, что автофагический путь вовлечен в такой фундаментальный физиологический процесс как деградация пигмент-белковых комплексов хлоропластных мембран.

В представленной работе была протестирована взаимосвязь между уровнем автофагии в листьях растений *Hordeum vulgare* и *Arabidopsis thaliana* дикого типа и мутантов, лишенных хлорофилла *b* (нокауты по гену хлорофиллид-оксигеназы CAO), являющегося критически важным фактором поддержания

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

стабильности фотосинтетической антенны. Уровень автофагии в норме и при помещении отделенных листьев в темноту анализировался при помощи цитологических и фармакологических тестов, а также на основании показателей экспрессии автофагических генов. Стабильность антенны оценивалась по скорости распада антенны в темноте у отделенных листьев, а также по содержанию неактивных реакционных центров ФС2. Полученные данные показывали, что снижение стабильности антенны вероятно стимулирует автофагические процессы. Можно предположить, что дестабилизация антенных пигмент-белковых комплексов выступает триггером продукции неизвестных пока клеточных сигналов, потенциально участвующих в важных физиологических процессах, включая автофагию. Гипотетически такими сигналами могут служить катаболиты хлорофилла, апопротеины ССК II, продукты их протеолиза, а также активные формы кислорода, продукция которых в зеленой фотосинтезирующей клетке тесно связана с уровнем фотозащиты.

Исследование поддержано РНФ, проект №15-14-30008.

### Пептиды CLE в развитии корнеплода у редиса (*Raphanus sativus* L.)

CLE peptides in storage root development in radish (*Raphanus sativus* L.)

Ганчева М.С., Додуева И.Е., Лутова Л.А.

Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский Государственный Университет, Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, Россия

+ 7 (812) 328-15-90, vaiagan@mail.ru

У высших растений помимо классических фитогормонов, таких как ауксины и цитокинины, важную роль в передаче сигнала от клетки к клетке играют небольшие секреторные белки CLE (CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION-RELATED). Пептиды CLE являются регуляторами деления и дифференцировки клеток в различных типах меристем растений, таких как апикальные меристемы побега и корня, латеральные меристемы, клубеньки и галлы. Нами было предположено участие пептидов CLE в образовании корнеплода у редиса, развитие которого в первую очередь обеспечивается активностью камбия. Также, в гипокотиле и корне редиса происходит образование зоны делящихся клеток и дифференцирующихся из них третичных проводящих элементов вокруг сосудов, которые назвали меристематическими очагами. Нами были идентифицированы у редиса 19 генов *RsCLE* – гомологов генов *CLE Arabidopsis thaliana*. При анализе экспрессии генов *RsCLE* на разных стадиях развития растений были выявлены гены, уровни экспрессии которых меняются при образовании корнеплода. Более детальный анализ экспрессии этих *RsCLE* в разных тканях корнеплода показал разный пространственный характер их экспрессии, при этом для каждого изучаемого *RsCLE* был выявлен свой максимум экспрессии – в камбиальной зоне, в зоне дифференцировки сосудов на периферии ксилемы, и

в центральной части ксилемы, где происходит образование меристематических очагов. Таким образом, предполагается, что выявленные нами гены *RsCLE* участвуют в контроле разных процессов, имеющих место при вторичном росте корня (пролиферация клеток камбия, дифференцировка проводящих элементов из клеток камбия, закладка вторичных меристематических очагов в центре ксилемы). В дальнейшем были созданы конструкции для сверхэкспрессии генов *RsCLE*, с помощью которых было показано, что сверхэкспрессия *RsCLE41* действительно вызывает изменение количества элементов ксилемы и меристематических очагов. Сходные данные получены в опытах по обработке растений экзогенными CLE-пептидами. Наши данные позволяют предположить участие разных пептидов CLE в «балансировке» процессов вторичного роста корня – процессов, генетический контроль которых изучен достаточно слабо.

### Комплексный подход к изучению липоксигеназной сигнальной системы: от экспрессии генов к ферментам

The integrated approach to lipoxygenase signaling system study: from gene expression to enzymes

Горина С.С., Топоркова Я.Ю., Смирнова Е.О., Мухтарова Л.Ш., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, 420111, ул. Лобачевского 2/31, Казань, Россия  
+7 843 231-90-35, +7 843 292-73-77, [gsvetlana87@gmail.com](mailto:gsvetlana87@gmail.com)

Окисленные производные жирных кислот – оксипирины – представляют собой важный класс сигнальных молекул, участвующих в ответных реакциях на механическое повреждение, воздействие патогенов и факторов окружающей среды, обеспечивая адекватный ответ организма в условиях стресса. Помимо этого, оксипирины принимают участие в процессах роста и развития растения, регулируют рост корней и процессы старения. Среди таких соединений наиболее известны жасмонаты и родственные им метаболиты. Однако оксипирины не ограничены только этими представителями и составляют обширную и разнообразную группу биологически активных соединений, включающую, помимо вышеупомянутых жасмонатов, гидроперокси-, гидрокси-, оксо- и эпокси-производные жирных кислот, дивиниловые эфиры, летучие альдегиды и др. Оксипирины образуются в рамках липоксигеназного каскада, где ключевая роль принадлежит цитохромам P450 семейства CYP74, на этапе функционирования которых происходит разделение пути на несколько ветвей: алленоксидсинтазную (АОС), гидропероксилиазную (ГПЛ), дивинилэфирсинтазную (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазную (ЭАС), получивших свое название по ферментам, катализирующим превращение гидроперекисей жирных кислот в соответствующие метаболиты. Показано, что жасмоновая кислота (продукт

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

АОС ветви), участвует в перекрестных взаимодействиях с салициловой и абсцизовой кислотами, обеспечивая индукцию защитных реакций растительного организма. Летучие метаболиты ГПЛ ветви являются сигналами взаимодействия растения с насекомыми, а С<sub>12</sub>- и ω-оксокислоты участвуют в заживлении ран. Наряду с этим, ДЭС и ЕАС ветви липоксигеназного каскада остаются мало изученными.

В ходе проводимых нами исследований липоксигеназного каскада были обнаружены новые оксипиены и описаны соответствующие ферменты их биосинтеза у различных таксонов растений. Впервые получены и биохимически охарактеризованы рекомбинантные 13-специфичные ДЭС (*Linum usitatissimum* (LuDES), *Ranunculus acris* (RaDES) и *Selaginella moellendorffii* (SmDES1 и SmDES2)) и продукты их каталитического действия, подтверждено наличие эпоксиалкогольсинтазного пути и охарактеризованы соответствующие ферменты – ЭАС, споры о которых велись долгое время. Кроме того, была расшифрована схема каталитического действия всех указанных ферментов.

Для понимания ключевых физиологических процессов, в частности, особенностей метаболизма и функционирования сигнальных систем, ценную информацию может предоставить анализ изменения экспрессии генов ферментов этого каскада в ходе онтогенеза и изменения условий окружающей среды. Однако не всегда ферменты, кодируемые интересующими нас генами, охарактеризованы с биохимической точки зрения. Зачастую исследователи ограничиваются аннотациями данных ферментов, сделанными на основе гомологии аминокислотных последовательностей. Такой подход часто дает искаженную информацию. В нашей лаборатории накоплено достаточно большое количество примеров ферментов, которые по гомологии аминокислотных последовательностей относятся к одной группе ферментов и при этом обладают совершенно иной каталитической активностью. На основе выбранного модельного объекта *Cucumis sativus* нами были клонированы и охарактеризованы все представители семейства CYP74, среди которых были выявлены: алленоксидсинтаза (CsAOS), эпоксиалкогольсинтаза (CsEAS), а также два фермента, обладающих бифункциональной активностью – гидропероксидлиазной и эпоксиалкогольсинтазной. Продукты превращения 9- и 13-гидроперекисей линолевой и альфа-линоленовой кислот, катализируемых рекомбинантными ферментами CYP74 огурца, были идентифицированы с помощью ЯМР и УФ-спектроскопии. Последующая оценка экспрессии целевых генов показала, что изменения уровней экспрессии не только органоспецифичны, но также зависят от стадии развития растения.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 15-04-08310-а, 16-34-00648-мол\_а и МК-6529.2015.4.

Влияние сверхэкспрессии полноразмерных и сплайсированных вариантов мРНК генов *CPK3a* и *CPK9* на рост, продукцию стильбенов и устойчивость к стрессам клеток *Vitis amurensis* Rupr.

Influence of overexpression of the full-length and spliced mRNAs of *CPK3a* and *CPK9* genes on the growth, stilbene production, and stress tolerance of *Vitis amurensis* Rupr. cells

Дубровина А.С., Алейнова О.А., Христенко В.С., Киселев К.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, пр. Столетия Владивостоку 159, г. Владивосток, 690022, Российская Федерация

*dubrovina@biosoil.ru*

Кальций-зависимые протеинкиназы (CDPK или CPK) – это  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые серин/треонин-специфичные протеинкиназы, которые представлены большим мультигенным семейством ферментов у растений. Известно, что CDPK выполняют важные функции в процессах роста и развития растений, участвуют в ответе растений на стрессовые условия, в регуляции вторичного метаболизма, а также во многих других процессах. В настоящее время недостаточно информации о биологических функциях отдельных CDPK. Известно, что гены CDPK могут подвергаться альтернативному сплайсингу, однако информация о биологическом значении альтернативного сплайсинга для генов CDPK, а также протеинкиназ растений в целом, практически не представлена. В процессе альтернативного сплайсинга кодирующие участки мРНК могут соединяться между собой различным образом по 5' и 3' сайтам сплайсинга (донорный и акцепторный сайты) с помощью сплайсосом, приводя к образованию нескольких мРНК транскриптов из одной молекулы мРНК-предшественника. Недавние исследования показали, что альтернативный сплайсинг пре-мРНК растений – это намного более распространенное и важное явление, чем считалось ранее. Установлено, что около 42-61% интрон-содержащих генов арабидопсиса подвергаются альтернативному сплайсингу, что важно для ответа растений на различные стрессовые и гормональные сигналы.

Ранее нами было установлено, что ген *CPK9* из винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr. подвергается альтернативному сплайсингу, опосредованному стандартными 5'GT и 3'AG сайтами сплайсинга, в результате чего образуются три типа альтернативных транскриптов, в последовательностях которых отсутствуют функционально важные участки киназного домена (истинные альтернативные транскрипты). В тоже время показано наличие необычных кДНК генов *CPK3a* и *CPK9*, которые были образованы *in vitro* в результате артефактов обратной транскрипции (ложные альтернативные транскрипты). Цель настоящей работы состояла в изучении роли генов *CPK3a* и *CPK9* в процессах роста, продукции стильбенов и устойчивости к стрессам клеток *V. amurensis*, а также возможного участия альтернативного сплайсинга в этих

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

процессах. Стилбены являются важными защитными фенольными соединениями растений, которые обладают также ценными свойствами для фармакологии и медицины, поэтому изучение регуляции биосинтеза стилбенов актуально. В задачу работы входило определить, влияет ли сверхэкспрессия полноразмерных и сплайсированных (истинных и ложных) транскриптов *СРК3а* и *СРК9* на рост, продукцию стилбенов и устойчивость к стрессам клеток *V. amurensis*.

В нашей работе мы производили перенос полноразмерных и модифицированных транскриптов *СРК3а* и *СРК9* в культуры клеток *V. amurensis* методом агробактериальной трансформации, после чего тестировали способность полученных трансгенных каллусных культур клеток накапливать стилбены, а также их ростовые характеристики в норме и при влиянии различных видов абиотического стресса (холодовой, тепловой и солевой стрессы). Штаммы агробактерий содержали бинарные вектора с последовательностями *CDPK* под контролем двойного промотора *CaMV 35S*, что обеспечивало сверхэкспрессию целевых генов. Получены трансгенные клеточные линии *V. amurensis* (по 2-4 линии на каждый вариант транскрипта), сверхэкспрессирующие различные истинные и ложные транскрипты генов *СРК3а* и *СРК9*. Экзогенные полноразмерные и модифицированные транскрипты *СРК3а* и *СРК9* активно транскрибировались в полученных трансгенных каллусных культурах. Сверхэкспрессия полноразмерных транскриптов *СРК9* и *СРК3а* повлияла положительно (в небольшой степени) на накопление биомассы, не повлияв при этом на продукцию стилбенов и устойчивость к стрессам. Сверхэкспрессия истинных сплайсированных транскриптов гена *СРК9* (*СРК9SF1*, *СРК9SF2*, *СРК9SF3*) значительно улучшила накопление биомассы трансгенными клеточными линиями, не повлияв на содержание стилбенов и устойчивость к стрессам, в то время как сверхэкспрессия ложных альтернативных транскриптов гена *СРК3а* (*СРК3аSF1*, *СРК3аSF2*, *СРК3аSF3*) не оказала значительного влияния, как на накопление биомассы, так и на другие параметры.

Полученные результаты показывают, что гены *СРК3а* и *СРК9* вовлечены в регуляцию роста *V. amurensis* (ген *СРК9* в большей степени), не участвуя при этом в регуляции биосинтеза стилбенов и в адаптации к абиотическим стрессам. Альтернативный сплайсинг гена *СРК9* может служить для усиления положительного влияния транскрипции этого гена на ростовые процессы *V. amurensis*.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (14-14-00366).



## Первый представитель клана CYP74 цитохромов P450 у бурых водорослей

The 1st cytochrome P450 of the CYP74 clan found in brown algae

Ермилова В.С., Топоркова Я.Ю., Мухтарова Л.Ш., Гречкин А.Н.

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, ул. Лобачевского  
2/31 г. Казань

+7 843 292-73-47, [ntdes@mail.ru](mailto:ntdes@mail.ru)

Растения лишены большинства сложных защитных механизмов, свойственных иммунной системе животных. Тем не менее, у них обнаружены эффективные механизмы защиты от патогенов или других стрессовых факторов. В защите растений огромную роль играют оксипирины, функционируя в качестве сигнальных молекул и/или защитных веществ, таких как антибактериальные и заживляющие агенты. Разнообразие оксипиринов обеспечивается липоксигеназами и цитохромами P450 семейства CYP74. Практически все цитохромы P450 являются монооксигеназами и для функционирования нуждаются в окислительно-восстановительном партнере и молекулярном кислороде. В отличие от этого, ферменты атипичного семейства CYP74 используют гидроперекись и в качестве субстрата, и в качестве источника кислорода и не нуждаются в партнерах.

Семейство CYP74, в состав которого входят только растительные ферменты, принадлежит клану CYP74 и включает три типа ферментов: дегидразы – алленоксидсинтазы (АОС) и дивинилэфирсинтазы (ДЭС), а также изомеразы – гидропероксидлиазы (ГПЛ). К настоящему времени охарактеризовано несколько десятков ГПЛ и АОС, а также несколько ДЭС разных видов растений. Недавно в классификации ферментов CYP74 произошли значительные изменения. Ряд нерастительных цитохромов P450 различных семейств, наряду с ферментами семейства CYP74, были объединены в клан CYP74 на основании гомологии аминокислотных последовательностей и сходства механизмов катализа. В состав клана CYP74, помимо АОС, ГПЛ и ДЭС, включена также недавно открытая эпоксиалкогольсинтаза (ЭАС) ланцетника.

К настоящему времени сформировалось предположение о древнем происхождении ферментов CYP74. Наряду с другими аргументами, эту гипотезу подтверждает тот факт, что представители клана CYP74 описаны у широкого ряда организмов, в том числе у животных, растений, грибов, протео- и ризобактерий. В то же время, оксипирины обнаружены у гораздо большего числа организмов, в том числе у бурых и красных водорослей. При этом в ряде случаев структура оксипиринов таких организмов совпадает с таковой зеленых растений, что указывает на возможное сходство ферментов, ответственных за их образование. Так, у бурой водоросли *Laminaria sinclairii* был обнаружен дивиниловый эфир – ( $\omega$ 5Z)-этеролоновая кислота, которая была выявлена в листьях льна-долгунца, лютика едкого и плаунка *Selaginella moellendorffii*. Поэтому вполне вероятным является предположение о наличии ферментов, родственных таковым клана CYP74, и у представителей данной

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

группы организмов. Целью настоящего исследования является выявление и характеристика структурно-функциональных свойств фермента, наиболее близкородственного представителям клана СУР74, у бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus*.

Бурые водоросли представляют одну из пяти эукариотических линий происхождения, которые имеют независимо развившийся комплекс многоклеточности. К настоящему времени у представителей этой группы организмов не было клонировано ни одного гена семейства СУР74. Анализ базы данных, содержащей участки генома *Ectocarpus siliculosus* с открытыми рамками считывания, позволил выявить ген, который обладал значительной степенью гомологии с генами семейства СУР74 растений. Результат сопоставления аминокислотной последовательности, которую кодирует этот ген, с представителями семейства и клана СУР74 свидетельствует о возможной его принадлежности к клану СУР74. Последовательность этого гена была искусственно синтезирована и клонирована нами в векторе системы рЕТ (Novagen, США). Препарат белка, полученный в гетерологической системе экспрессии, инкубировали с субстратами, характерными для ферментов СУР74, – 9- и 13-гидроперекисями линолевой кислоты. Фермент *E. siliculosus* катализирует превращение 9-гидроперекиси линолевой кислоты, в основном, в эпокиспирт – 9,10-эпокси-11-гидрокси-13-октадеценую кислоту. Таким образом, последовательность, обнаруженная нами в базе данных, кодирует фермент, обладающий свойствами эпоксиалкогольсинтазы – EsEAS. Нами был расшифрован механизм каталитического действия этого фермента и определено его положение на филогенетическом древе клана СУР74 и суперсемейства 3450 в целом. На филогенетическом древе эпоксиалкогольсинтаза EsEAS *Ectocarpus siliculosus* находится между растительными ферментами семейства СУР74 и ферментами клана СУР74. Ближе всего к EsEAS оказываются ферменты протеобактерий, что указывает на древнее расхождение ферментов СУР74 бурых водорослей с остальными представителями клана СУР74. Полученные данные являются еще одним доказательством древнего происхождения липоксигеназного каскада – одной из ключевых сигнальных систем растений – дополнительно к остальным доказательствам, собранным в нашей лаборатории ранее.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-34-00648-мол\_a.

## Изучение роли отдельных транскрипционных факторов в генетическом контроле инициации бокового корня у кабачка

The study of the certain transcription factors role in genetic control of lateral root initiation in squash

Ильина Е.Л., Кирюшкин А.С., Демченко К.Н.

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, ул. Профессора Попова, д.2., Санкт-Петербург, Россия

+7 812 372-54-66, [eilina@binran.ru](mailto:eilina@binran.ru)

Выяснение структурных, гормональных и генетических механизмов ветвления тела высших растений является актуальной проблемой биологии развития. Доклад посвящен генетической регуляции образования подземных органов растений – боковых корней. Исследования механизмов ветвления главного корня, проводятся, в основном, на *Arabidopsis*, для которого характерна инициация примордиев боковых корней выше зоны растяжения. Для *Arabidopsis* описано множество мутантов и линий трансгенных растений, имеющих нарушения развития главного и бокового корня. Методами прямой и обратной генетики выявлены ключевые участники, определяющие функционирование апикальной меристемы корня – зоны, от которой зависит рост и строение главного корня, а также инициации бокового корня. В инициации бокового корня решающим событием является переключение программы развития группы клеток перицикла родительского корня на программу возобновления пролиферации и формирования тела примордия бокового корня. Выявлена взаимосвязь между гормональной и молекулярно-генетической регуляцией разметки мест инициации боковых корней. Полученные данные могут быть экстраполированы на большинство видов растений, у которых также как у *Arabidopsis* инициация боковых корней происходит за зоной растяжения. При этом гормональная и генетическая регуляция ветвления корня у видов с инициацией боковых корней в апикальной меристеме родительского корня остаётся мало изученной. Такая стратегия инициации бокового корня, при которой клетки, иницирующие формирование примордия, не выходят из митотического цикла и находятся в окружении пролиферирующих клеток соседних слоёв, характерна для представителей семейств Тыквенные, Гречишные и некоторых водных растений.

Объектом данного исследования является кабачок *Cucurbita pepo*, представитель семейства Тыквенные. Для изучения генетического контроля инициации бокового корня были выбраны гены *WOX5* (меристем-специфичный транскрипционный фактор), *SCR* (генетический маркер эндодермы) и *CR4* (рецептор-подобная киназа). Промоторные последовательности данных генов клонировали из геномной ДНК *Arabidopsis* и огурца (*Cucumis sativus*). Были получены генетические конструкции для агробактериальной трансформации, несущие репортерный слитый ген *Egfp-gusA* под контролем промоторов указанных генов, на базе вектора 242 pKGW-RR-MGW с кассетой *pUBQ10::DsRED1* для скрининга трансгенного

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

материала. С использованием методики агробактериальной трансформации Тыквенных (Irina et al., 2012) были получены трансгенные корни, локализация активности промоторов генов была проведена по GUS-окрашиванию.

Паттерн активности промоторов *WOX5 Arabidopsis* и огурца в тканях родительского корня кабачка оказался сходным. Максимум экспрессии *WOX5* был локализован в области покоящегося центра и инициалей перицикла и центрального цилиндра. В зоне инициации примордиев боковых корней не было обнаружено активности промотора *WOX5*. В примордиях боковых корней экспрессия *WOX5* появлялась только в начале зоны растяжения и была приурочена только к производным перицикла. Вероятно, роль *WOX5* в развитии бокового корня кабачка связана с закладкой инициалей проводящих тканей.

Активность промотора генов *SCR Arabidopsis* и огурца локализовалась в эндодерме и слоях внутренней коры, начиная от зоны инициалей рядов клеток этих тканей. Экспрессия *SCR* не исчезала в клетках эндодермы и внутренних слоях коры, вовлекающихся в инициацию примордия бокового корня, что даёт возможность предположить сохранение программы специфичности эндодермы. Экспрессия *SCR* отсутствовала в клетках центрального цилиндра и внешних слоёв коры, не принимающих участия в формировании структуры бокового корня, а также в ризодерме.

Максимум экспрессии *ACR4* был локализован в области чехлика и инициальных клеток рядов. Активность промотора *ACR4* отсутствовала в зоне инициации примордиев боковых корней. В примордии бокового корня экспрессия *ACR4* была локализована на стадии формирования инициалей чехлика. Паттерн экспрессии *ACR4* в тканях кончика кабачка сходен с описанным паттерном *ACR4* у *Arabidopsis*. Максимум экспрессии *CsCR4* был локализован в зоне чехлика, меристеме родительского корня, а также во всех примордиях, начиная с ранних стадий развития. Таким образом, распределение активности промоторов *ACR4* и *CsCR4* значительно отличалось. Возможно, *CsCR4* непосредственно вовлечён в пространственное распределение примордиев боковых корней и функционально аналогичен *ACR4*.

В докладе обсуждается вклад отдельных участников генетического контроля инициации бокового корня в апикальной меристеме родительского корня кабачка в этот процесс.

Экспериментальные исследования поддержаны Российским Научным фондом (грант № 16-16-00089).

## Световая модуляция морфогенеза проростков пшеницы

### Light modulation of wheat seedlings morphogenesis

Касаткин М.Ю., Степанов С.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского». 410012, ул. Астраханская, 83, г. Саратов, Россия.

+7 908 540-00-54, [KasatkinMY@info.sgu.ru](mailto:KasatkinMY@info.sgu.ru)

Выяснение общих принципов, лежащих в основе образования специфической формы растения, является одной из фундаментальных проблем биологии растений. Для ее решения применительно к многоклеточным организмам необходимо понять, каким образом клетки, ткани и органы взаимодействуют между собой в ходе онтогенеза. Известно, что одними из первых работ в этом направлении были эксперименты Ч. Дарвина, показавшие довольно большое пространственное разделение сенсорных и морфогенетических участков растений. С момента прорастания зерновки важнейшим морфогенетическим фактором внешней среды является свет. Исследования фоторецепторов растений и понимания путей трансдукции световых сигналов с участием гормональной системы, как и прежде, является интригующей проблемой фотоморфогенеза растения.

Основными структурами проростка пшеницы, обладающими хорошо развитыми фоторецепторными системами, являются coleoptиль и эпикотиль. Именно с особенностями роста этих органов связывают основные регуляторные процессы прорастающего растения пшеницы. Анализ литературных источников и собственные исследования показали наличие у обоих этих органов различающейся стратегии развития, зависящей к тому же от внешних условий освещения. Рост и функционирование coleoptиля сводится к направленному росту к источнику света, определение момента выхода на поверхность почвы и создание оптимальных для нижележащих светочувствительных, тканевых структур проростка спектральных характеристик и освещенности. При наличии света настройка фоторегуляторных систем проростка на определенную интенсивность света может осуществляться, как показали наши исследования, «фиксацией» качества и количества квантов света светочувствительными структурами coleoptиля. Результатом подобной настройки является уменьшение общего светопроведения тканевыми структурами coleoptиля в процессе прорастания семени на свету за счёт формирования пула экранирующих пигментов. При росте в условиях темноты coleoptиль является оптически активной системой, способной проводить свет преимущественно в продольном направлении. Функция поиска источника света не позволяет выключать его ростовую активность, что приводит в итоге в условиях полной темноты к многократному возрастанию длины coleoptиля (10-15 раз) по сравнению с coleoptилями, растущими при наличии света. Изменение интенсивности распространяющегося по тканям светового потока у coleoptилей,

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

выращенных в темноте, зависит от их линейных размеров, тогда как на свету – от способностей тканей фильтровать и проводить определенные участки света.

Константность интенсивности света в базальной части coleoptily этиолированных проростков, независимо от их абсолютной длины, позволяет сделать предположение, что функция coleoptily состоит в поддержании оптимальной освещённости в фоторецепторных системах проростка пшеницы. Эта константность достигается анатомо-физиологической трансформацией светопроводящих структур coleoptily - изменением его общей длины и морфологии клеток, а также содержанием различных пигментов. Обратная связь в данной системе реализуется посредством изменения качества и количества света, поступающего по трансформируемым тканям coleoptily, выступающих в этом случае в качестве индуцированного оптического фильтра.

Если регуляция роста и развития coleoptily осуществляется внешними факторами, то морфогенез эпикотилья в основном регулируется coleoptилем и другими структурами побега проростка. С момента прорастания пшеницы функция эпикотилья состоит в выносе главной почки побега в приповерхностный почвенный слой – место заложения будущего узла кущения. При прорастании на свету скорость роста эпикотилья коррелирует со степенью развития остальных побеговых структур проростка. Однако, если семена находятся на небольшой глубине или же на поверхности почвы, то рост эпикотилья ингибируется вследствие одновременного освещения апикальной и базальной частей coleoptily. В условиях темноты оптическая плотность эпикотилья увеличивается по мере развития проростка, повышая тем самым чувствительность к световому фактору за счёт увеличения концентрации пигментов в синей области спектра, свидетельствуя о рецепции светового потока.

Таким образом, в coleoptиле и эпикотиле обнаружено присутствие нескольких различных сенсорных и фотосинтетических пигментных систем. В условиях освещения coleoptиль является оптическим фильтром, поглощающим большую часть светового потока и, в конечном итоге, стабилизирующим освещённость участков проростка, где происходят различные морфогенетические процессы. В условиях темноты, напротив, coleoptиль «настроен» на максимальное светопроведение. Эпикотиль содержит пигменты, поглощающие в синей области спектра, которую обычно связывают с морфогенетическим ответом растения. Для морфогенеза проростков пшеницы важна как очередность, так и уровень освещённости фоторегуляторных систем, расположенных в различных частях проростка пшеницы.

## Изменение гидролитической и транспортной функций протонной АТФазы плазмалеммы в ходе роста растяжением клеток табака суспензионной культуры VBI-0

Shift in hydrolytic and transport function of proton АТase during elongation in tobacco cells of suspension line VBI-0

Кирпичникова А.А., Чэнь Т., Михайлова Ю.В., Шишова М.Ф.

Санкт-Петербургский Государственный Университет, Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д.7-9

+7 812 328-20-00, *nastin1972@mail.ru*

В ходе анализа интенсивности роста растяжением клеток колеоптилей кукурузы было показано нелинейное изменение как гидролитической, так и транспортной активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы. Принимая во внимание, что в состав колеоптилей входят клетки различных тканей, отличающиеся этапом клеточного цикла и способностью к росту растяжением, данное исследование проведено с использованием синхронизированной суспензионной культуры клеток табака VBI-0. Клетки данной культуры сохраняют способность к росту растяжением. Показано, что к 7 дню развития клетки завершают деление, на 14 день регистрируется интенсивный рост растяжением и, наконец, на 21 день клетки завершают ростовые процессы. Гидролитическую активность  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы оценивали по накоплению неорганического фосфата спектрофотометрически. Для анализа активности транспортной функции  $H^+$ -АТФазы был разработан специфичный метод визуализации закисляющей способности клеток суспензионной культуры табака. За основу разработанной тест-системы был взят метод колориметрического определения протонов, который достаточно широко применяется для анализа ацидофицирующей активности корней и других органов растений. Он основан на использовании бромкрезолового пурпурового, относящегося к кислотно-основным индикаторам — органическим соединениям, способным изменять цвет в растворе при изменении кислотности (pH). Проведенное исследование показало, что характер изменения транспортной функции полностью соответствует с таковой для гидролитической функции на 14 день развития культуры.

Таким образом, нелинейное изменение активности  $H^+$ АТФазы представляет собой общую закономерность клеток, растущих растяжением.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ 16-04-00743-а.

Регуляция биосинтеза резвератрола в культурах клеток винограда *Vitis amurensis* Rupr. с помощью генов кальций-зависимых протеинкиназ

Regulation of resveratrol biosynthesis in cell cultures of wild-growing grape *Vitis amurensis* Rupr. by overexpressing calcium-dependent protein kinase genes

Киселев К.В., Дубровина А.С., Aleynova O.A.

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет, Школа естественных наук, г. Владивосток, ул. Октябрьская 27, 690090, Российская Федерация

kiselev@biosoil.ru

Резвератрол (3,5,4'-тригидроксистильбен) – это один из самых известных вторичных метаболитов растений, ценное биологически активное вещество, привлекающее значительный интерес исследователей. Резвератрол обладает превентивными свойствами против нескольких видов рака, положительно влияет на работу сердечно-сосудистой системы. Кроме того, резвератрол интересен как защитное соединение растений (фитоалексин), синтезируемое растением в ответ на ультрафиолетовое излучение, воздействие фитопатогенов и другие стрессовые воздействия окружающей среды.

Резвератрол обнаружен во многих растениях, таких как тутовое дерево, арахис, клюква, голубика и др. Содержание резвератрола и его производных (например, пизеид и виниферины) в винограде, в том числе в диком винограде *Vitis amurensis* Rupr., является наибольшим среди всех известных растений. Было показано, что полученные культуры клеток винограда среди известных вторичных метаболитов содержали в основном производные стильбенов. Поэтому культуры клеток винограда являются удобными модельными объектами для изучения регуляции биосинтеза ценного резвератрола и его производных. Цель нашей работы – исследование молекулярно-генетических механизмов, ведущих к активному биосинтезу резвератрола клетками винограда амурского *V. amurensis*.

Ранее нами было показано, что ингибиторы  $Ca^{2+}$ -каналов способны блокировать накопление резвератрола в клетках винограда *V. amurensis*, а ионофоры  $Ca^{2+}$ , напротив, увеличивают его продукцию. Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что биосинтез резвератрола является  $Ca^{2+}$ -зависимым процессом. Известно, что основными сенсорами цитоплазматического  $Ca^{2+}$  в клетках растений являются  $Ca^{2+}$ -зависимые протеинкиназы (СДПК или СРК), поэтому основное внимание в дальнейшей работе мы решили уделить изучению участия генов *СРК* в регуляции биосинтеза резвератрола. В связи с развитием технологий рекомбинантных ДНК появилась возможность принципиально нового подхода в управлении метаболическим аппаратом клетки и исследованию функций исследуемых генов. Мы секвенировали полные последовательности кДНК некоторых генов *СРК* *V. amurensis* и клонировали их в векторные конструкции под контроль двойного CaMV35s промотора. С помощью метода агробактериальной трансформации мы получили более тридцати трансгенных каллусных



клеточных культур *V. amurensis*, сверхэкспрессирующих белок-кодирующие последовательности генов *СРК*.

Наши результаты показывают, что при трансформации *V. amurensis* геном *VaСРК20* (или *VaСРК3с*) из *V. amurensis* продукция резвератрола, по сравнению с нетрансгенными клетками, достоверно увеличилась в 9-68 раз (до 34 мг/л используемой питательной среды или до 0.42% от сухой массы клеток). Это наибольшее увеличение, которое мы смогли получить при сверхэкспрессии генов *СРК*. Так же наблюдали увеличение содержания резвератрола в 1.5-11 раз и при трансформации генами *VaСРК9* (*VaСРК1е*), *VaСРК13* (*VaСРК2а*), *VaСРК29* (*VaСРК1а*), *VaСРК1* (*VaСРК3b*), *VaСРК26* (*VaСРК3d*). При трансформации клеток *V. amurensis* генами *VaСРК3а*, *VaСРК21* (*VaСРК1d*) продукция резвератрола трансгенными культурами оставалась на прежнем уровне.

Полученные данные указывают на то, что только некоторые представители мультигенного семейства *СРК* могут быть вовлечены в сигнальный путь, регулирующий биосинтез резвератрола. Основным направлением нашей дальнейшей экспериментальной работы является изучение молекулярных механизмов работы *СРК*, обеспечивающих увеличение продукции резвератрола клетками винограда *V. amurensis*.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (14-14-00366).

## Неавтономная клеточная регуляция в апикальной меристеме побега *Picea abies* (L.) Karst.

Non-cell-autonomous regulation in the shoot apical meristem *Picea abies* (L.) Karst.

Климова Е.А.<sup>1,2</sup>, Евкайкина А.И.<sup>1</sup>, Добрякова К.С.<sup>1</sup>,  
Войцеховская О.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лаб. экологической физиологии растений, Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, 197376, ул. Проф. Попова, 2, Санкт-Петербург, Россия, +7 +7 812 372-54-43, 372-54-39;

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ), 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9, Россия

*fresanube@gmail.com, eklimova@binran.ru*

У высших растений для обмена информацией между клетками с целью координации процессов роста и развития используются уникальные структуры, соединяющие клетки – плазмодесмы. Перенос по плазмодесмам таких регуляторов развития, как микроРНК и белки-факторы транскрипции, играет ключевую роль в регуляции морфогенеза цветковых растений. Однако, неизвестно, участвует ли этот процесс в морфогенезе голосеменных растений. Объектом исследования являлось хвойное дерево *Picea abies*. В качестве модели данного исследования были выбраны неавтономные клеточные

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

факторы транскрипции, кодируемые генами *KNOX*, которые регулируют функции апикальных меристем побега растений. Эти гены наиболее хорошо изучены у представителей цветковых растений, а также некоторых представителей других таксонов. Поэтому целесообразно их использование для выявления межклеточного переноса белков у представителей ряда таксонов.

Следующие методы могут дать ответ на вопрос, существует ли неавтономная клеточная регуляция морфогенеза в апикальных меристемах белками *KNOX* у объекта данного исследования: иммуногистохимическое выявление локализации белков класса *KNOX I* в меристемах голосеменных растений; выявление паттернов экспрессии генов-гомологов *KNOX I* методом гибридизации РНК-РНК *in situ* и сравнение их с местами локализации белков *KNOX*; визуализация плазмодесм между клетками апикальной меристемы. Выявление и сравнение этих паттернов для апикальных меристем растений других таксонов позволит дать первую информацию о возможной реализации механизма неавтономной клеточной регуляции у объекта исследования.

В докладе будут представлены результаты обработки вышеперечисленных методик для апикальных меристем побега *Picea abies*.

Исследование поддержано РФФИ (№13-04-02000). Использовались оборудование ЦКП БИН РАН и Ресурсного Центра СПбГУ.

## Роль транскрипционных факторов в развитии «нерегулярных» меристем

Лутова Л.А., Додуева И.Е., Лебедева М.А., Творогова В.Е.,  
Азарахш М.

Выяснение механизмов контроля пролиферации и дифференцировки клеток в многоклеточном организме – актуальная проблема современной биологии развития. Высшие растения представляют собой уникальную модель для изучения механизмов пролиферации и дифференцировки благодаря тотипотентности всех растительных клеток. Ярким примером является процесс формирования организованных пулов стволовых клеток – меристем, на периферии которых имеют место клеточная дифференцировка и органогенез. Первичные меристемы закладываются у растений в эмбриогенезе; способность формировать новые (вторичные) меристемы сохраняется в течение всего постэмбрионального периода. Нерегулярные меристемы – вторичные меристемы, которые не являются обязательными для жизнедеятельности растения в норме и формируются у растений при определенных условиях. В качестве примеров можно привести меристемы азотфиксирующих клубеньков, каллус, а также аномальные меристемы – опухоли, развивающиеся при взаимодействии с патогенами, или спонтанно у растений с определенным генотипом. В докладе обобщены результаты по изучению генетических и физиологических механизмов закладки и поддержания стволовых клеток нерегулярных меристем, особое место уделено роли фитогормонов и меристемоспецифичных транскрипционных

факторов (ТФ) семейств WOX и KNOX. Так например, для ТФ WOX5, который ранее был известен как центральный регулятор поддержания апикальной меристемы корня, выявлена функция как необходимого компонента развития: меристем клубеньков, спонтанных опухолей и опухолей, индуцированных *Agrobacterium tumefaciens*, эмбриогенного каллуса. Наряду с ним, в контроле развития нерегулярных меристем участвуют также некоторые другие ТФ WOX. Среди представителей CLE-пептидов – обширного класса пептидных гормонов растений, регулирующих развитие меристем через контроль экспрессии генов WOX, также выявлены пептиды, специфичные для разных типов нерегулярных меристем. Среди ТФ семейства KNOX роль в развитии определенных типов нерегулярных меристем была обнаружена для ТФ KNOX класса I (например, гомологов KNAT1) и класса II (например, MtKNOX3/PsKNOX3). При этом для MtKNOX3/PsKNOX3 показана функция как прямого регулятора экспрессии генов биосинтеза цитокининов IPT и LOG, что важно для гормонального гомеостаза в меристеме азотфиксирующего клубенька.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 16-16-10011, РФФИ 15-34-00271 и РФФИ 15-29-02737.

## Гены рецепции и трансдукции цитокининового сигнала у картофеля *Solanum tuberosum*

### Genes for cytokinin signal perception and transduction in potato *Solanum tuberosum*

Мякушина Ю.А., Ломин С.Н., Архипов Д.В., Романов Г.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, 127276, ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия

+7 499 977-94-09, +7 499 977-80-18, [yulia-myakushina@yandex.ru](mailto:yulia-myakushina@yandex.ru)

Цитокинины являются производными аденина, в котором аминогруппа в шестом положении замещена различными радикалами. Эти фитогормоны стимулируют деление, рост и дифференцировку растительных клеток. Цитокинины связываются с мембранными рецепторами, вызывая каскад передачи сигнала, приводящего к активации регуляторов ответа – транскрипционных факторов. Роль рецепторов цитокининов выполняют сенсорные гистидинкиназы, которые имеют сложную мультидоменную структуру. Гормонсвязывающей активностью обладает сенсорный модуль, расположенный на N-конце молекулы рецептора. С двух сторон от сенсорного модуля находятся трансмембранные домены. В центральной части белка располагается домен с гистидинкиназной активностью, содержащий остаток консервативного гистидина, способный акцептировать фосфат от АТФ. На C-конце белка находится ресиверный домен, содержащий остаток консервативного аспартата, способного акцептировать фосфат с фосфогистидина.

Кроме арабидопсиса, за последние годы были идентифицированы и охарактеризованы цитокининовые рецепторы кукурузы *Zea mays*, риса *Oryza sativa*, рапса *Brassica napus*, сои *Glycine max* и других растений. Недавно был секвенирован и опубликован геном дублированного моноплоида картофеля *Solanum tuberosum* (вар. Phureja). Это предоставило возможность изучения особенностей рецепции и сигналинга цитокининов у одной из главных пищевых культур планеты. Целью данной работы являлась идентификация и клонирование генов рецепторов цитокининов картофеля *S. tuberosum*, а также исследование лиганд-связывающих свойств сенсорных гистидинкиназ.

В результате анализа баз данных нами были обнаружены три предсказанных гена сенсорных гистидинкиназ картофеля: *StHK2*, *StHK3* и *StHK4*, гомологичных соответствующим генам арабидопсиса *ANK2*, *ANK3* и *ANK4*. Анализ аминокислотных последовательностей исследуемых белков *StHK2*, *StHK3* и *StHK4* показал, что предсказанные гистидинкинзы, подобно гистидинкиназам арабидопсиса *ANK2*, *ANK3* и *ANK4*, имеют мультидоменную структуру и содержат сенсорный модуль, гистидинкиназный и ресиверный домены. Это указывает на то, что исследуемые белки могут успешно выполнять роль рецепторов цитокининов в картофеле.

В своей экспериментальной работе мы проводили амплификацию и клонирование генов цитокининовых рецепторов на основе генома широко используемого тетраплоидного сорта картофеля Дезире. В результате клонирования и секвенирования гена *StHK4* было подтверждено полное сходство клонированной последовательности с последовательностью, представленной в базе данных. Дополнительно к этой условно «канонической» последовательности, по ходу клонирования *StHK4* была найдена еще одна изоформа этого гена с 28-мью заменами нуклеотидов и тремя делециями. Как и в случае гена *StHK4*, в геноме тетраплоидного картофеля сорта Дезире было обнаружено две изоформы гена *StHK3*. Одна из изоформ полностью соответствовала последовательности варианта Phureja, а вторая характеризовалась наличием 23 нуклеотидных замен и трех делеций. В результате клонирования гена *StHK2* было найдено четыре изоформы этого гена сенсорной гистидинкиназы у картофеля сорта Дезире. Нуклеотидные последовательности четырех изоформ *StHK2* отличались от последовательности, представленной в базе данных, присутствием четырех, пяти, пяти и шести замен нуклеотидов, соответственно. Изоформы *StHK2* характеризовались различной комбинацией одних и тех же нуклеотидных замен. Полученные данные указывают на значительное варьирование последовательности копийных генов у тетраплоидного картофеля.

Предварительный биоинформатический анализ доменного состава и конформации найденных изоформ *StHK2*, *StHK3* и *StHK4* не выявил каких-либо существенных различий между ними, способных серьезно повлиять на функциональную активность исследуемых гистидинкиназ. Экспериментальная оценка лиганд-связывающих свойств клонированных рецепторов подтвердила способность экспрессированных белков специфично и с высоким средством связывать природные цитокинины.

Таким образом, в результате исследования транскриптома картофеля сорта Дезире нам удалось впервые обнаружить и клонировать целый ряд полноразмерных генов рецепторов цитокининов растений картофеля. Множественность генов рецепторов цитокининов в геноме указывает на большую сложность аппарата рецепции цитокининов у тетраплоидного картофеля Дезире по сравнению с дублированным моноплоидом Phureja. Наша дальнейшая работа направлена на изучение структуры и лиганд-связывающих свойств соответствующих белков-рецепторов.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда, проект № 14-14-01095.

## Гормональная и генетическая регуляция дифференцировки структурных элементов древесины карельской березы

Hormonal and genetic regulation of the wood structural elements differentiation in Karelian birch

Новицкая Л.Л., Галибина Н.А., Мошенская Ю.Л., Никерова К.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса Карельского научного центра Российской академии наук, г. Петрозаводск

+7 8142 578216, novits@krc.karelia.ru

Особенности строения узорчатой древесины карельской березы (КБ, *Betula pendula* Roth var. *carelica*), по сравнению с обычной березой повислой (ОБ, *Betula pendula* var. *pendula*), включают: (1) изменение процентного соотношения структурных элементов в результате значительного увеличения доли клеток паренхимы, (2) нарушение вертикального положения сосудов и волокнистых трахеид, вплоть до их разворота на 90° или закручивания в спиралевидные фигуры, (3) неправильная форма многих волокнистых элементов (раздвоение концов, выросты на боковых стенках).

Флоэма КБ функционирует в условиях избытка сахарозы, что индуцирует высокую активность апопластной инвертазы (в 2,5 раза выше, чем у ОБ) (Галибина и др., 2015). Продуктами реакции являются глюкоза (ГЛ) и фруктоза. По апопласту гексозы поступают в камбиальную зону, где имеет место детерминация пути развития производных камбия. В зоне роста и дифференциации ксилемы (древесины) активность апопластной инвертазы у КБ в 4 раза выше, по сравнению с ОБ. Это означает, что в апопласте зон заложения, роста и дифференциации структурных элементов ксилемы КБ уровень гексоз намного выше, чем у ОБ.

Растяжение клетки и ее ориентация в пространстве определяются направленным транспортом ауксина. Выход ауксина из клетки обеспечивают белки-транспортеры семейства PIN. Недавно было показано, что при введении экзогенной ГЛ в корнях проростков *Arabidopsis thaliana* повышался уровень транскрипции генов, кодирующих PIN-белки, содержание PIN-белков и скорость транспорта ауксина (Mishra et al., 2009). Сделан вывод, что ГЛ модулирует транспорт ауксина путем усиленной аккумуляции белков-

транспортеров на плазматической мембране. Кроме того, повышенные уровни ГЛ влияют на пространственную экспрессию PIN-белков, приводя к их большей аккумуляции на латеральных стенках. В итоге потоки ауксина изменяют направление с базипетального на латеральное, что, в зависимости от степени отклонения потока, вызывает изгиб клеток (изгиб корня) или формирование выростов на боковых клеточных стенках (начало образования корневых волосков). Другие эксперименты с применением экзогенной ГЛ продемонстрировали, что увеличение ее концентрации не только индуцирует отклонение корня от вертикальной оси, но приводит также к волнистости и спиральному закручиванию корня (Singh et al., 2014). Применительно к КБ представленные данные показывают, что нарушение формы и ориентации структурных элементов ее ксилемы может быть вызвано изменением направления потоков ауксина в связи с изменением пространственной экспрессии PIN-белков под действием повышенного уровня ГЛ в апопласте. Установлено, что экзогенная ГЛ повышает экспрессию генов биосинтеза ауксина (гены семейства YUCCA) (Mishra et al., 2009). Этот эффект глюкозы согласуется с более высоким (в 1,8 раза) содержанием ауксина в тканях коры КБ (Щетинкин, 1987). В то же время усиленный синтез ауксина при добавлении ГЛ не оказывает стимулирующего действия на уровень экспрессии индуцируемых ауксином генов. Наоборот, при росте уровня ГЛ синтез гормона сопровождается снижением экспрессии большого числа ауксин-зависимых генов, поскольку одновременно снижается экспрессия рецептора ауксина TIR1 (Mishra et al., 2009).

Ауксин необходим для дифференцировки сосудов и трахеид ксилемы (обзор Aloni, 2015). При развитии структурных аномалий древесины КБ вместо этих мертвых сильно удлинённых элементов образуются живые клетки паренхимы, длина и ширина которых различаются незначительно. Уменьшение доли сосудов и волокнистых трахеид в составе древесины КБ указывает на снижение уровня свободного ауксина в камбиальной зоне. Это коррелирует с результатами биохимического анализа, показавшими, что в тканях ствола ОБ основную массу ауксина составляет свободный ауксин (свободный/связанный = 2.9), а у КБ – связанный ауксин (свободный /связанный = 0.5) (Щетинкин, 1987). У растений широкое распространение имеет инактивация ауксина в результате взаимодействия гормона с УДФ-глюкозой, итогом реакции становится образование конъюгата ИУК-глюкоза (обзор Ludwig-Muller, 2011). Ранее мы обосновали принципиальную возможность синтеза УДФ-глюкозы в цитозоле клеток с участием глюкозы, поступающей из апопласта, и последующего образования здесь ИУК-глюкозы (Новицкая, 2015).

Обобщение имеющихся данных позволяет заключить, что индукция аномального роста тканей ствола карельской березы связана с высокой активностью апопластной инвертазы. Результатом интенсивного расщепления сахарозы становится высокий уровень глюкозы в апопласте зон заложения, роста и дифференциации производных камбия. По мере возрастания концентрации глюкозы, формирующиеся сосуды и волокнистые элементы изменяют свою форму и ориентацию в пространстве вслед за изменением локализации на плазмалемме PIN-белков, определяющих направление

потоков ауксина. Дальнейший рост уровня глюкозы приводит к конъюгации ауксина. Образование ИУК-глюкозы может быть причиной снижения экспрессии рецепторов ауксина, что влечет за собой блокирование всего каскада индуцируемых ауксином реакций, включая растяжение клеток и дифференцировку сосудов и волокон ксилемы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-01191\_a.

## Физиологическая стратегия рекальцитрантных семян

### Physiological strategy of recalcitrant seeds

Обручева Н.В., Литягина С.В., Синькевич И.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая 35, Москва, Россия

+7 499 231-83-30, +7 499 977-80-18, [obroucheva@ippras.ru](mailto:obroucheva@ippras.ru)

Рекальцитрантными («непослушными») называют семена, которые после созревания сохраняют высокую влажность, а при высыхании теряют жизнеспособность. Описано 585 видов растений, преимущественно деревьев и кустарников, обитающих главным образом в тропических и субтропических регионах и проявляющих рекальцитрантность. От обычных семян они отличаются в первую очередь тем, что погибают при потере воды после опадения в результате того, что их антиоксидантная защита не справляется с интенсивным образованием активных форм кислорода. Если же они попадают во влажную подстилку, то во влажном воздухе быстро прорастают в тропическом лесу или во время влажного сезона в субтропиках, не испытывая обезвоживания. Типичными представителями рекальцитрантных семян в нашей флоре являются каштан конский и дуб черешчатый, которые в умеренном климате уходят в зимний покой, но сохраняют свою рекальцитрантность. Данный обзор посвящен физиологическим особенностям рекальцитрантных семян, обеспечивающим быстрый переход зрелых семян к прорастанию. Рекальцитрантные семена обычно имеют крупные размеры, относительно тонкую кожуру и хорошо развитые осевые органы зародыша. Эти особенности способствуют относительно медленной потере воды после опадения, возможности поглощать воду из подстилки и из влажного воздуха, а также быстрому началу прорастания. Опавшие семена поддерживают высокую влажность (50-60%), а влажность осевых органов еще выше. Основным запасным веществом является сахароза, которая активно гидролизуется имеющимися кислой вакуолярной и апопластной инвертазами, активность которых возрастает при набухании. Кроме того, приток сахарозы из семядолей в осевые органы начинается рано, также при набухании. Медленно гидролизуемых олигосахаридов содержится мало. В целом, высокая влажность позволяет поддерживать в осевых органах активный метаболизм. Активность белкового синтеза сохраняется на высоком уровне, с использованием долго-живущих мРНК. Интенсивность дыхания осевых органов также не падает. Состояние метаболизма можно охарактеризовать как

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

метаболическую готовность к переходу к прорастанию, как только уровень оводненности осевых органов достигнет достаточной величины, поскольку вода является триггером прорастания. Для поступления воды на 20% возрастает осмотическое давление за счет накопления моносахаридов из сахарозы под действием инвертаз. Инициация роста в осевых органах каштана происходит в результате активации плазмалеммной  $H^+$ -АТФазы за счет выхода из самоингибированного состояния при увеличении оводненности и участии эндогенного активатора фузикокина. Таким образом осуществляется быстрое начало прорастания у рекальцитрантных семян, что способствует поддержанию популяции этих видов.



Этилен вовлечён в реорганизацию актинового цитоскелета в ходе гравитропической реакции корней *Arabidopsis thaliana*  
Ethylene is involved in the actin cytoskeleton rearrangement during the root gravitropic response of *Arabidopsis thaliana*

Пожванов Г.А.<sup>1</sup>, Гобова А.Е.<sup>1</sup>, Виссенберг К.<sup>2</sup>, Медведев С.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Биологический факультет, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Санкт-Петербургский государственный университет”, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Отдел биологии, Университет Антверпена, Антверпен, Бельгия  
+7 812 328-96-95, g.pozhvanov@spbu.ru

В регуляции гравитропизма – направленного роста растения относительно вектора силы тяжести – принимают участие ауксин и система его полярного транспорта, ряд вторичных посредников и цитоскелет. Ранее мы показали, что при гравистимуляции (поворот на 90°) происходила реорганизация актинового цитоскелета в клетках зоны растяжения корня *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh: уменьшалась доля аксиально ориентированных и возрастала доля наклонно и поперечно ориентированных микрофиламентов. В настоящем исследовании изучали влияние этилена и ингибиторов его синтеза на реорганизацию актинового цитоскелета в ходе гравитропической реакции проростков *A. thaliana fABD2-GFP*, экспрессирующих 2-й актин-связывающий домен белка фимбрина, слитый с зелёным флуоресцентным белком. Обработка растений этиленпродуцентом этефоном вызывала разборку микрофиламентов и расширение спектра их ориентации в клетках зоны растяжения корней. Эффект перестройки актиновых микрофиламентов, индуцированной гравистимуляцией, снимался при обработке растений ингибитором синтеза этилена – аминоксидом глицином. Салициловая кислота – также негативный регулятор синтеза этилена – вызывала нарушение реорганизации актиновых микрофиламентов. Мы полагаем, что роль этилена в регуляции гравитропической реакции корня состоит в том, чтобы с помощью рандомизации ориентации актиновых микрофиламентов повысить вероятность транспорта ауксина в латеральном направлении в клетках коры корня.

Работа выполнена за счёт средств НИР СПбГУ (1.38.233.2014, 1.42.1288.2014, 1.57.1157.2014, 1.57.163.2015) и гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-01624а) на базе Ресурсного центра “Развитие клеточных и молекулярных технологий” СПбГУ (проекты 109-72, 109-244).

## Исследование взаимодействия цитокинин-рецептор с применением широкого набора синтетических N<sup>6</sup>-производных аденина

A study of cytokinin-receptor interaction with the use of a large set of synthetic derivatives of adenine

Савельева Е.М.<sup>1</sup>, Гетман И.А.<sup>1</sup>, Ословский В.Е.<sup>2</sup>, Дреничев М.С.<sup>2</sup>, Михайлов С.Н.<sup>2</sup>, Романов Г.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, ул. Вавилова, 32, Москва, Россия

+7 499 977-94-09, +7 499 977-80-18, savelievaek@ya.ru

Цитокинины – классические фитогормоны, регулирующие рост и развитие растений и участвующие во многих физиологических процессах. Цитокининовые рецепторы, как правило, существуют в растениях в нескольких изоформах, близких по структуре, но обладающих разной лигандной специфичностью. Изучение взаимодействия различных лигандов с изоформами рецепторов одного растения и рецепторами растений разных видов позволяет выявить особенности этих белков, обеспечивающие их функциональные различия. Для расширения спектра лигандов, взаимодействующих с рецепторами, мы использовали большой ряд синтетических N<sup>6</sup>-производных аденина, сходных по строению с природными цитокининами. Оценивали как непосредственную способность этих лигандов связываться с рецепторами, так и их способность вызывать реакции, приводящие к передаче цитокининового сигнала и индукции ответа, т.е. цитокининовую активность. Мы также исследовали цитокининовую активность рибозидов некоторых синтетических и природных цитокининов, что позволило сделать выводы о работе ферментов, превращающих N<sup>6</sup>-замещенные нуклеозиды в цитокинины.

Анализ активации цитокининовых рецепторов N<sup>6</sup>-производными аденина *in planta* проводили в 2-х модельных системах на основе проростков арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) и амаранта (*Amaranthus caudatus*). В тест-системе с арабидопсисом мы использовали как растения с одним функциональным рецептором цитокининов (АНК2/АНК3/АНК4) и с репортерным геном *GUS*, находящимся под контролем промотора гена *ARR5* первичного ответа на цитокинины, так и растения *Parr5:GUS* со всеми работающими рецепторами. Цитокининовую активность соединений определяли по уровню *GUS*-активности. В биотесте с проростками амаранта активность определяли по уровню накопления семядолями пигмента амарантина, вследствие индукции транскрипции цитокинин-зависимых генов. В тестах с арабидопсисом мы провели скрининг 27-ми соединений, различающихся наличием заместителей, длиной линкера между адениновым гетероциклом и фенильным остатком и др. В результате установлены особенности строения лигандов, изменяющие их цитокининовую активность.

Например, присоединение фтора во 2-е положение гетероцикла повышало активность лиганда при взаимодействии с рецептором АНК3. С другой стороны, наличие даже малых заместителей у аденинового гетероцикла при С8 или N9, увеличение длины линкера до 4-х атомов С, замена в линкере атома N на S и пр. приводило к подавлению активности соединения. Также мы выявили 4 рецептор-специфичных соединения.

Также в этом биотесте мы проверили D- и L-рибозиды различных цитокининов. Сами по себе рибозиды не обладают гормональной активностью, а наличие GUS-активности в этом тесте говорит о способности ферментов растений гидролизовать N-гликозидную связь в этих соединениях. D-рибозиды изопентениладенина с немодифицированными и дегидроксилированными по разным положениям остатками пентозы активны, причем уровни их активности сходны. А D-рибозид бензиладенина обладает активностью только в случае, если остаток рибозы не модифицирован. Можно предположить, что работа фермента(ов), расщепляющих цитокининовые рибозиды, зависит как от основания соединения, так и от строения остатка пентозы. Также важна хиральность соединения: у L-энантиомера активного D-рибозида БА нет цитокининовой активности.

В модельной системе на основе амаранта мы исследовали 11 из 27 соединений, взятых для опыта с арабидопсисом. Несмотря на то, что активности некоторых из них значительно различались по результатам двух биотестов, в целом, мы обнаружили большое сходство в реакциях амаранта и арабидопсиса – растений двух разных семейств – на исследуемые соединения. Так, коэффициент корреляции между величинами активности соединений, полученными в этих тестах (в случае, когда у растений арабидопсиса функционируют все цитокининовые рецепторы), составляет 0.82.

Мы провели оценку уровня связывания с рецепторами арабидопсиса АНК3 и АНК4 16-ти соединений, показавших различный уровень цитокининовой активности в описанных выше опытах. Исследование проводили в модельной системе на основе трансформированных клеток бактерий *Escherichia coli*, экспрессирующих гены АНК3 или АНК4. Из бактерий мы получали сферопласты, добавляли к ним одно из исследуемых соединений и меченый тритием природный цитокинин. Сродство синтетического цитокинина к рецептору оценивали по его способности вытеснять меченый гормон из комплекса с рецептором. Мы выявили высокую степень корреляции между уровнем связывания соединения и его цитокининовой активностью, полученной в биотесте с арабидопсисом: при концентрации 1 мкМ вещества, не показавшие цитокининовую активность в биотесте, связываются с рецептором в несколько раз (иногда на порядок) слабее, чем активные соединения. Однако при высокой концентрации лиганда (10 мкМ) уровни связывания активных и неактивными веществ нередко сопоставимы и отличаются не более чем в 2 раза. Т.е. относительно высокий уровень связывания лиганда с рецептором не всегда приводит к передаче цитокининового сигнала и индукции ответа.

Работа поддержана грантами РФФИ (проекты №№ 14-04-01714 и 16-04-01594) и грантом Президента РФ МК-8496.2016.4.

## Фотохимическая активность семян *Pisum sativum* L. с желтой и зеленой окраской

Photochemical activity of *Pisum sativum* L. seeds with yellow and green color

Смоликова Г.Н., Широглазова О.В., Медведев С.С.

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра физиологии и биохимии растений, Университетская наб. 7/9, 199034 Санкт-Петербург, Россия

*g.smolikova@spbu.ru*

Растения *P. sativum* L. относятся к хлороэмбриофитам, характеризующимся тем, что на ранних стадиях эмбриогенеза амилопласты зародыша дифференцируются в фотосинтетически активные хлоропласты. Этот процесс сопровождается синтезом Хл *a* и *b*, поэтому семена в течение всего эмбриогенеза остаются зелеными и обладают способностью к фотосинтезу. Ведущей функцией хлоропластов семян является синтез НАД(Ф)•Н и АТФ, которые расходуются на превращение поступающей из материнского растения сахарозы в запасные питательные вещества (Смоликова, Медведев, *Физиология растений*, Т.63(1), 2016). По мере накопления запасных питательных веществ в семенах гранальная структура хлоропластов нарушается, хлорофиллы (Хл) распадаются и фотосинтез прекращается. При оптимальных условиях формирования семян должно происходить полное разрушение Хл. Однако на практике в зрелых семенах часто присутствуют «остаточные» Хл, которые снижают их устойчивость при хранении (Смоликова и др., *Физиология растений*, Т.58(6), 2011). Механизм, регулирующий прекращение фотосинтеза и распад Хл в процессе созревания семян, пока еще далек от понимания. Целью данной работы являлся сравнительный анализ динамики фотосинтетической активности в формирующихся семенах гороха с желтой окраской (разрушающих Хл на поздних этапах созревания) и с зеленой окраской (сохраняющих Хл при созревании). Показатели фотосинтеза регистрировали в семенной кожуре и семядолях гороха на 12 стадиях эмбриогенеза (от 7 до 53 дней после опыления).

*Сырая масса семян* на 1-10-й стадиях увеличивалась от 4 мг до 1 г, а затем уменьшалась до 0.5 г на 12-й стадии. Влагосодержание семенной кожуры и зародышей на 1-6-й стадиях составляло примерно 85% и начиная с 8-й стадии снижалось примерно до 40% (у кожуры зеленого гороха до 20%). *Суммарное содержание Хл a и b в кожуре желтого гороха* снижалось от 0,5 мг/г сух. массы на 2-й стадии до 0,04 мг/г на 10-й стадии и полностью исчезновения на 12-й стадии. В семядолях на 4-й стадии содержание Хл было равно 2,8 мг/г, на 10-й стадии – 0,04 мкг/г. На 12-й стадии Хл присутствовали только на периферии семядолей в количестве 0,02 мг/г, а в центре Хл полностью разрушались. *Суммарное содержание Хл a и b в кожуре зеленого гороха* менялось от 0,3 мг/г на 2-4-й стадиях до 0,6 мкг/г на 6-11-й стадиях и далее до 0,2 мг/г на 12-й стадии. В семядолях динамика Хл была такой же, как и в

кожуре: 0,8 мг/г на 4-й стадии, 1 мг/г на 5-8-й стадиях, 0,2 мг/г на 11-й стадии и 0,09 мг/г на 12-й стадии. На 11-12-й стадиях Хл в семядолях распределялись неравномерно – в центре они начинали разрушаться с появлением желтоватой окраски, а на периферии зеленая окраска сохранялась.

*Активность фотохимических процессов* была изучена методом РАМ-флуориметрии, основанной на импульсной амплитудной модуляции, с использованием Walz PAM-2500 (Heinz Walz GmbH, Германия). Проведен анализ быстрой кинетики флуоресценции Хл. При применении импульса актиничного света, флуоресценция Хл возрастает от начальной (O) до максимальной (P), через два плеча (J и I). В семенной кожуре и семядолях желтого и зеленого гороха фаза O – J протекала быстрее по сравнению с зеленым листом, что свидетельствует о более высокой скорости восстановления  $Q_A$  при переносе электронов от РЦ ФС II и, соответственно, более низкой приспособленности тканей семян к высокой интенсивности света по сравнению с листьями. При этом в семядолях этот процесс происходил быстрее, чем в семенной кожуре. Полученные данные подтверждает и анализ световых кривых, характеризующих зависимость между плотностью переноса электронов по ЭТЦ и интенсивностью ФАР. «Насыщение» фотосинтеза происходило в листьях гороха при 67 мкмоль электронов/м<sup>2</sup> с и 179 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup> с. В листьях кислицы, произраставшей в тени деревьев, эти показатели составляли 12 мкмоль электронов/м<sup>2</sup> с и 37 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup> с. В семенной кожуре желтого гороха вышеуказанные показатели фотохимической активности максимально достигали 3 мкмоль электронов/м<sup>2</sup> с при 15 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup> с, а в кожуре зеленого гороха – 1,5 мкмоль электронов/м<sup>2</sup> с при 14 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup> с. На периферии семядолей у желтого гороха они составляли 1,5 мкмоль электронов/м<sup>2</sup> с при 15 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup> с, а у зеленого гороха – 1,9 мкмоль электронов/м<sup>2</sup> с при 23 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup> с.

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что фотосинтез осуществляется как в семенной кожуре, так и в семядолях гороха, при этом их фотосинтетическая система приспособлена к условиям низкой освещенности. У желтого гороха кожа фотосинтезировала более активно, чем у зеленого, компенсируя таким образом более низкую активность семядолей. Фотосинтез начинал функционировать на самых ранних стадиях эмбриогенеза и прекращался в семенной кожуре на 8-ой стадии, а в семядолях на 6-ой. Прекращение фотосинтеза было сопряжено со снижением влагосодержания тканей ниже 80%. Вероятно, именно обезвоживание, а не разрушение Хл являлось триггером прекращения фотосинтеза при созревании семян.

Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда № 16-16-00026 с использованием оборудования Ресурсного центра Научного парка СПбГУ «Развитие клеточных и молекулярных технологий» (проект 109-5665).

## Фитомерный принцип регуляции гомеостаза пшеницы

Phytomeasured principle of regulation of the homeostasis of wheat

Степанов С.А., Касаткин М.Ю.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского». 410012, ул. Астраханская, 83, г. Саратов, Россия

+7 908 540-00-54, [hanin-hariton@yandex.ru](mailto:hanin-hariton@yandex.ru)

Проблема интеграции компартментов растений, от клеток до органов, привлекает в настоящее время всё большее число исследователей. Наиболее выдающиеся успехи в её решении наблюдаются на молекулярном направлении физиологии растений. Однако принцип холизма по-прежнему плодотворен для решения существующей проблемы. Взаимодействие корневой системы и побега пшеницы осуществляется на основе электрофизиологических, трофических и гормональных связей, где ауксину принадлежит особая роль в формировании фитомеров. Один из возможных экспериментальных подходов к решению проблемы взаимоотношений фитомеров заключается в нарушении целостности растения путем частичной дефолиации. В наших исследованиях при дефолиации первого листа пшеницы наблюдались различные морфогенетические явления: 1) увеличение или уменьшение длины примордиев других листьев; 2) изменение абсолютной и относительной скорости роста пластинки и влагалища листьев по сравнению с контрольными растениями; 3) изменение активности конуса нарастания побега. Наряду с субстратной функцией, нижние листья, возможно, имеют информационное значение в последующем органогенезе фитомеров побега. В частности, по результатам анализа структуры урожая установлено различие контрольных и опытных растений по числу листьев на стебле, площади листьев главного побега, массе боковых побегов, развитию элементов продуктивности колоса. Кроме того, при анализе структуры зародыша зерновки контрольных и подвергнутых дефолиации (первый лист) растений пшеницы наблюдалась меньшая длина примордиев листьев эмбрионального побега зародышей зерновок опытных растений.

На основании результатов исследования следует обратиться к тем научным представлениям, которые отражают принципы и механизмы, обеспечивающие функциональное единство частей тела растения. Рассматриваемые в научной литературе концепции целостности можно условно разделить на две основные парадигмы: 1. Растение является организмом. 2. Растение не является организмом, а представляет собой совокупность микроорганизменных экосистем, возникших путем эндо- или экзосимбиоза, надстраивающих тело растения по мере собственного размножения. В рамках первой из парадигм особая роль принадлежит доминирующим центрам, в качестве которых выступают апексы корня и побега. Наличие донорно-акцепторных отношений на уровне целого растения явилось основанием для предположения, что фитомерные структуры могут представлять донорно-акцепторную единицу,

где можно выделить несколько основных структурно-функциональных и регуляторных элементов. В тоже время было высказано мнение, что система регуляции проявления отдельных функций у растений имеет общие принципы с животным организмом, где обязательными компонентами системы являются: рецепторы, эфферентные пути проведения возбуждения, центральные регулирующие элементы, афферентные пути проведения возбуждения, исполнительные элементы (эффекторы) и элементы обратной связи между рецепторами и эффекторами.

Особенностью побега пшеницы является разновозрастность фитомеров, интегрированных узлами стебля. На основании исследования последовательности заложения конусом нарастания фитомеров побега и их последующего развития, можно предположить, что каждый из них является полуавтономной системой. В процессе инициации и развития элементов фитомеров (узла, междоузлия, листа, почки), формируются элементы системы управления. Уровень автономности фитомеров определяется наличием и степенью зрелости компонентов системы управления. Изучение последовательности развития элементов отдельных фитомеров (узел → лист → междоузлие → почка → корни) позволяет считать, что центральные регулирующие элементы расположены в узле стебля пшеницы, где объединяются проводящие пучки смежных фитомеров. В составе многих пучков, кроме флоэмы и ксилемы, присутствуют волокна склеренхимы. В настоящее время наиболее приоритетным является суждение, что распространение потенциала действия в растении осуществляется по ситовидным трубкам флоэмы. Однако более предпочтительно, на наш взгляд, рассматривать в качестве проводников потенциалов действия клетки склеренхимы (волокна и склереиды), имеющих хорошо развитую клеточную стенку. Укоренившееся представление об этой ткани, как только механической, следует подвергнуть ревизии. В настоящее время во многих работах установлено наличие живого протопласта в клетках склеренхимы. В цитоплазме клеток различных видов растений установлено наличие одного или нескольких (более 10) ядер, вакуолей, многочисленных митохондрий с хорошо развитой системой крист и плотным матриксом, хлоропластов, часто с крахмальными зернами, аппарата Гольджи, рибосом, микротелец, элементов ЭПС, отдельных липидных капель. Особый интерес представляют исследования по биоэлектрическому статусу клеток склеренхимы.

Таким образом, на основании наших исследований и анализа литературы, можно рассматривать фитомерный принцип системы регуляции целостности растения как основополагающий принцип, обеспечивающий гомеостаз растений. В онтогенезе пшеницы происходит последовательная трансформация межфитомерных связей побега.

## Новые способы оценки растяжимости клеточных стенок методом крипа, предсказывающие скорость роста растительных клеток

Novel methods for cell wall extensibility estimation by the creep method predicting plant cell growth rate

Суслов Д.В.<sup>1,3</sup>, Иваков А.А.<sup>2</sup>, Боронь А.К.<sup>3</sup>, Виссенберг К.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, 199034  
Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург, Россия

+7 812 328-96-95, [souslov@mail.ru](mailto:souslov@mail.ru)

<sup>2</sup> Australian National University, GPO Box 475, Canberra, ACT 2601, Australia  
+61261254602, [Alexander.Ivakov@anu.edu.au](mailto:Alexander.Ivakov@anu.edu.au)

<sup>3</sup> University of Antwerp, Groenenborgerlaan 171, 2020 Antwerpen, Belgium  
+3232653410, +3232653417, [kris.vissenberg@uantwerpen.be](mailto:kris.vissenberg@uantwerpen.be),  
[boronagnieszka@gmail.com](mailto:boronagnieszka@gmail.com)

В регуляции роста растений большинство путей трансдукции эндогенных и экзогенных сигналов сходится на уровне клеточных стенок, изменение растяжимости которых служит непосредственной причиной ускорения или торможения роста клеток. Растяжимость клеточных стенок в настоящее время анализируют при помощи непрямых физических методов, дающих разные показатели, отличающиеся по точности оценки растяжимости и способности предсказывать скорость роста *in vivo*.

В настоящем исследовании при помощи метода крипа была произведена оценка растяжимости клеточных стенок быстро и медленно растущих гипокотилей соответственно 3- и 4-суточных этиолированных проростков *Arabidopsis thaliana*. Провели сравнительный анализ способности нескольких показателей, полученных методом крипа (скорость крипа, скорость крипа  $\times$  напряжение<sup>-1</sup>, растяжимость клеточных стенок *in vitro* ( $\phi$ ), пороговое напряжение клеточных стенок *in vitro* ( $y$ )), предсказывать скорость роста гипокотилей *in vivo*. Значения  $\phi$  и  $y$  определяли с использованием нового алгоритма на основе измерения скорости крипа при разных одиночных нагрузках, а их статистические сравнения осуществляли при помощи специально разработанного программного обеспечения.

Растяжимость клеточных стенок *in vitro* ( $\phi$ ) оказалась самым точным индикатором скорости роста *in vivo*: трехкратное снижение скорости роста у 4-суточных гипокотилей по сравнению с 3-суточными сопровождалось трехкратным уменьшением  $\phi$ , измеренной при pH 5. Несмотря на то, что опосредованное экспансинами усиление крипа клеточных стенок при подкислении происходило исключительно за счет увеличения значений  $\phi$ , уменьшение  $\phi$  у 4-суточных гипокотилей по сравнению с 3-суточными не было связано с экспансинами, так как сохранялось и после тепловой обработки клеточных стенок, инактивирующей экспансины.



По результатам исследования даются практические рекомендации по наиболее эффективному использованию скорости крипа, скорости крипа  $\times$  напряжение<sup>1</sup>,  $\varphi$  и  $u$  для предсказания скорости роста растений *in vivo* в разных экспериментальных ситуациях.

Работа выполнена при поддержке грантов СПбГУ 1.38.233.2014 и 1.23.74.2014, и гранта РФФИ 15-04-04075.

## Гены *WOX* и *PIN* в соматическом эмбриогенезе у *Medicago truncatula*

WOX and PIN genes in somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*

Творогова В.Е., Федорова Ю.А., Лутова Л.А.

Кафедра Генетики и Биотехнологии Санкт-Петербургского

Государственного Университета. 199034, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, Россия

+7 812 328-15-90, [krubaza@mail.ru](mailto:krubaza@mail.ru)

Соматический эмбриогенез – один из видов регенерации у растений, при котором соматические клетки дают начало эмбрионам, которые в конечном счёте развиваются во взрослые растения. Протоколы получения соматических эмбрионов *in vitro* разработаны для множества видов растений, и известно большое число генов, регулирующих этот процесс. К их числу относятся гены, кодирующие транскрипционные факторы семейства *WOX*, а также транспортёры ауксина из семейства *PIN*. Для некоторых из них, например, для генов *WUSCHEL* и *PIN1 Arabidopsis thaliana*, показана экспрессия как в соматических, так и в зиготических эмбрионах. Тем не менее, вопрос об участии многих генов *PIN* и *WOX* в соматическом эмбриогенезе остаётся открытым. В настоящем исследовании была предпринята попытка выявить новые регуляторы соматического эмбриогенеза среди генов *PIN* и *WOX* у *Medicago truncatula*.

Нами были найдены три гена семейства *WOX* (*STENOFOLIA*, *Medtr2g015000* и *MtWOX11-like*) и один ген *PIN* (*MtPIN10*, или *SMOOTH LEAF MARGIN 1*), которые характеризуются повышенным уровнем экспрессии в ходе развития соматических эмбрионов, а также в семязачатках, что говорит об их участии как в зиготическом, так и в соматическом эмбриогенезе. Локальный анализ экспрессии показал, что промоторы генов *MtPIN10*, *STENOFOLIA* и *Medtr2g015000* активны непосредственно в соматических эмбрионах. Кроме того, сверхэкспрессия *STENOFOLIA* и *Medtr2g015000* ведёт к увеличению эмбриогенности каллусов, что сопровождается изменением уровня экспрессии ряда генов, предположительно, также участвующих в соматическом эмбриогенезе. В дальнейшем планируется более детальное изучение механизмов работы вышеперечисленных генов *WOX* и *PIN* в соматическом эмбриогенезе с помощью локализации кодируемых ими белков, поиска мишеней (для транскрипционных факторов *WOX*), а также анализа мутантов.

## Формирование отдельных компонентов липоксигеназного каскада растений в ходе эволюции

### Formation of selected components of plant lipoxygenase cascade during evolution

Топоркова Я.Ю., Бессолицына Е.К., Смирнова Е.О., Ермилова В.С., Горина С.С., Мухтарова Л.Ш., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н.

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, ул. Лобачевского 2/31 г. Казань

+7 843 2927347, [yanchens@yandex.ru](mailto:yanchens@yandex.ru)

Липоксигеназный каскад играет важную роль в жизнедеятельности растений. Ключевыми ферментами каскада являются липоксигеназы, катализирующие окисление жирных кислот с образованием соответствующих гидроперекисей, и цитохромы P450 семейства CYP74, ответственные за их дальнейшее превращение, к которым относятся алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). Они обеспечивают разнообразие продуктов, которыми являются окисленные производные жирных кислот – оксипиены. К оксипиенам относится большое число физиологически активных соединений, разнообразных по своей структуре: циклопентеноны, альдегиды, альдокислоты, спирты, дивиниловые эфиры, эпоксигидрокси- и тригидроксипроизводные жирных кислот и т.д. В нашей лаборатории был выявлен целый ряд т.н. неклассических оксипиенов, для которых неизвестно не только функциональное значение, но и механизм биосинтеза. И ферменты липоксигеназного каскада, и оксипиены обнаружены к настоящему времени у большого числа организмов, принадлежащих разным таксонам. Физиологические роли оксипиенов очень разнообразны. У растений они участвуют в регуляции разнообразных процессов, таких как цветение, старение, ответ на стрессовые факторы, индукции ответа при атаке фитопатогенами, заживление ран и др. Зачастую схемы защиты растения с участием оксипиенов очень сложные и специфические. Однако физиологические роли не всех оксипиенов хорошо изучены. Для многих функции так и остаются пока гипотетическими или общими. Так, например, предположения об антибактериальных и фунгицидных свойствах дивиниловых эфиров, эпокиспиртов и тригидроксикикислот зачастую основаны на данных, полученных при изучении динамики экспрессии генов и изменении профиля оксипиенов. В нашей лаборатории проведены исследования биологических свойств ряда оксипиенов.

Наиболее широкое распространение в настоящее время ферменты CYP74 получили у цветковых растений. Поэтому долгое время считалось, что ферменты данного семейства характерны исключительно для цветковых

растений. Это обстоятельство послужило основой концепции позднего происхождения семейства. Новые данные о присутствии ферментов СУР74 у бактерий, грибов, водорослей и животных дают основания для пересмотра этих представлений. Современная классификация, основанная на данных проведенных нами филогенетических исследований семейства СУР74 и суперсемейства Р450 в целом, гораздо более сложная, чем предложенная изначально.

Ферменты СУР74 являются атипичными цитохромами Р450. Практически все цитохромы Р450 являются монооксигеназами и для их каталитического действия необходимы молекулярный кислород, окислительно-восстановительный партнер и непосредственно окисляемый субстрат. Уникальной особенностью всех ферментов СУР74 является отсутствие необходимости в молекулярном кислороде, а также окислительно-восстановительных потенциалах. Гидроперекись жирной кислоты является одновременно источником того и другого. Вследствие этого, каталитический цикл ферментов СУР74 проще классического цикла цитохромов Р450. Распределение по семействам внутри суперсемейства Р450 происходит в зависимости от гомологии аминокислотных последовательностей, и, в основном, семейства включают ферменты с одним типом каталитической активности. Семейство СУР74 является уникальным также вследствие того, что в данное семейство включены разные типы ферментов: алленоксидсинтазы и дивинилэфирсинтазы являются дегидратазами, гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы являются изомеразы. В то же время, гомологичность последовательностей позволяет включить их в одно семейство. Очевидно, что в последовательностях этих четырех типов ферментов есть некоторые особенности, связанные с формированием того или иного типа катализа. Для проверки данного предположения нами были проведены эксперименты по сайт-направленному мутагенезу ферментов СУР74. В структуре этих ферментов есть ряд консервативных доменов, формирующих субстрат-связывающий карман. Внутри данных доменов были выбраны сайты, в которых у ферментов с разным типом катализа находятся несинимичные аминокислотные остатки, и проведены соответствующие замены методом сайт-направленного мутагенеза. Результаты сайт-направленного мутагенеза, в первую очередь, позволили уточнить схему переключения механизмов каталитического действия в зависимости от типа катализа. Выявлены две точки переключения катализа. Кроме этого, впервые были проведены взаимопревращения ферментов внутри семейства СУР74 между алленоксидсинтазой и гидропероксидлиазой, а также было проведено превращение дивинилэфирсинтаз в алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы – в эпоксиалкогольсинтазу. Полученные данные позволили сделать предположение о развитии семейства СУР74 в ходе эволюции.

Накопленные данные позволили нам сформировать предположение о древнем происхождении липоксигеназного каскада, в частности, ферментов СУР74, как отдельных его компонентов. Нами был приблизительно вычислен момент появления данных ферментов в эволюционной истории и собраны доказательства, подтверждающие это предположение.

## Пролиферация клеток *in vitro* – нужны ли газы?

The proliferation of cells *in vitro* – whether gases need?

Фоменков А.А., Ракитин В.Ю., Новикова Г.В., Носов А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*Artem.Fomenkov@gmail.com*

Нашими предыдущими работами было показано, что активность пролиферации культивируемых *in vitro* клеток растений разных штаммов имеет линейный характер зависимости от продукции этилена. При этом на примере культивируемых клеток *Arabidopsis thaliana* было продемонстрировано, что предобработка экзогенным этиленом стимулирует переход клеток к активной пролиферации. Тем не менее, при очень высоких и сравнимых скоростях пролиферации культивируемых клеток *A. thaliana* дикого типа (экотип Columbia Col-0, коллекционный шифр – NFC-0) и штамма клеток того же экотипа с мутацией в гене *EIN2* (*ein2-1*, коллекционный шифр – NFCE-2), кодирующем один из ключевых белков в цепи передачи сигнала этилена, было обнаружено несоответствие выше указанной зависимости. Клетки NFC-0 и NFCE-2 имели сходные максимальные удельные скорости увеличения числа клеток –  $\mu_{\max} = 1.15 \text{ сут}^{-1}$  и  $\mu_{\max} = 1.24 \text{ сут}^{-1}$  соответственно. К тому же, время удвоения числа клеток в экспоненциальной фазе роста было практически одинаковым для этих двух штаммов и сравнимым с данными для меристемы корня *A. thaliana* ( $14.4 \pm 0.53 \text{ ч}$ ). Сходным образом выглядели и динамики количества S-фазных клеток в пассаже культивируемых клеток NFC-0 и NFCE-2. Очевидно, что культивируемые клетки штаммов с полноценным геномом и мутанта показывают сравнимую активность пролиферации. Однако культивируемые клетки этих двух генотипов сильно различались по скорости продукции этилена. Производство этилена клетками NFC-0 было на порядок выше, чем у мутантного генотипа (NFCE-2). В результате – необходимо ответить на очевидный вопрос – если этилен способствует пролиферации клеток *in vitro*, то почему такой сравнительно низкий уровень продукции этилена у NFCE-2 обеспечивает активное размножение клеток? Нами было показано, что синтез этилена проростками Col-0 и *ein2-1* был одинаковым. Остаётся возможность влияния условий культивирования клеток? Штаммы дикого типа и мутанта выращивались на среде Schenk и Hildebrandt с 1 мг/л 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, синтетический ауксин) и 0.1 мг/л кинетина. Хорошо известно, что ауксины стимулируют продукцию этилена. Более того, синтетические и весьма стабильные аналоги ауксина, такие как 2,4-Д – используют в качестве гербицидов, действие которых в основном связано со стимуляцией продукции этилена. Мы проверили влияние 2,4-Д на продукцию этилена у отделённых

листьев растений двух генотипов. Результат: растения Col-0 и *ein2-1* реагировали на обработку 2,4-Д усилением производства этилена в соответствии с концентрацией 2,4-Д. Из данных литературы известно, что жасминовая кислота (jasmonic acid) влияет на эффективность пути передачи сигнала этилена на уровне белка EIN2, причём снижение уровня жасминовой кислоты приводило к возвращению чувствительности *EIN2*-мутантов к этилену. В культивируемых клетках NFC-0 и NFCE-2 количество жасминовой кислоты было в пределах средних концентраций для растений, находящихся вне стрессовых условий. Очевидно, что жасмонат в данном случае не оказывает влияния. Мы предположили, что в мутантном штамме клеток NFCE-2 не работают какие-либо основные ферменты, отвечающие за биосинтез этилена: (1) метионин-аденозилтрансфераза (МАТ, продукт – S-аденозилметионин, предшественник 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, АЦК); (2) синтаза АЦК; (3) оксидаза АЦК, активность которой приводит к продукции этилена. Эксперименты показали, что добавление АЦК стимулировало образование этилена у клеток NFC-0 и NFCE-2. Ингибитор АЦК-синтазы (2-аминоэтоксивинилглицин) снижал синтез этилена в клетках обоих генотипов. Особенность культивируемых клеток мутанта *ein2-1* – повышенная продукция оксида азота (NO), совпадающая по времени с продукцией этилена в циклах роста клеток NFC-0 и NFCE-2. Известно, что МАТ – мишень для S-нитрозилирования (посттрансляционной модификации белка), которое приводит к ингибированию активности данного фермента. Безусловно, высокая продукция NO клетками NFCE-2 создаёт все предпосылки для реализации такого сценария. Это должно привести к снижению продукции этилена. Есть ли обстоятельства для повышенной продукции NO в клетках NFCE-2? Прежде чем ответить на этот вопрос, посмотрим на факты. Опираясь на данные литературы о высокой восприимчивости мутантов *A. thaliana* по гену *EIN2* к гипоксии и на собственные экспериментальные данные с клетками NFCE-2 *in vitro*, которые сходным с растениями образом плохо переносят недостаток кислорода, и ещё хуже его внезапное поступление (реоксигенацию), и, учитывая тот факт, что в клетках NFCE-2 существует постоянная высокая экспрессия (на уровне матриц и белка) глицеральдегидфосфат дегидрогеназы (второй изоформы цитозольной локализации – GAPC2), то вывод один – активация гликолиза. Очевидно, что наблюдается биохимическая адаптация клеток NFCE-2 к жизни в «водной» среде, а значит к не оптимальным условиям снабжения кислородом – гипоксии, что заставило их опираться на гликолиз и на один из главных ферментов гликолиза, которым является GAPC2. Это приводит к избытку НАД·Н и снижению pH цитозоля, что в свою очередь благоприятствует нитратредуктазе в деле производства NO. Наконец, оказалось, что в клетках NFCE-2 конститутивно повышен уровень экспрессия гена *ERF1* (ethylene response factor 1), что означает – клеткам для активного размножения нужен сигнал этилена и он проводится альтернативным путём (минуя *EIN2*), а за повышенную неустойчивость к гипоксии отвечает канонический путь восприятия сигнала этилена.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-00834).

Влияние синтетических ауксинов на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионных культур клеток якорцев стелющихся и пажитника греческого

The effects of synthetic auxins on growth of *Tribulus terrestris* L. and *Trigonella foenum-graecum* L. suspension cell cultures and glycoside synthesis

Томилова С.В.<sup>1</sup>, Ханды М.Т.<sup>2,3</sup>, Кочкин Д.В.<sup>3,4</sup>, Иванов И.М.<sup>4</sup>, Носов А.М.<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Уральский федеральный университет, 620002, пр. Ленина, 51, Екатеринбург, Россия

*lanatomilova@yandex.ru*

<sup>2</sup> Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, 677000, ул. Кулаковского, 48, Якутск, Россия

*handy\_89@mail.ru*

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, ул. Ленинские горы, 1, стр.12, Москва, Россия

*dmitry-kochkin@mail.ru*

<sup>4</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, 127276, ул. Ботаническая, 35, Москва

*al\_nosov@mail.ru*

Количество и соотношение фитогормонов является важным фактором, определяющим ростовые и биосинтетические характеристики культур клеток высших растений. В настоящей работе приведены результаты исследования по влиянию синтетического ауксина 1-нафтилуксусной кислоты (НУК) на образование стероидных гликозидов в культурах клеток высших растений.

В качестве объектов исследования использовали суспензионные культуры клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L., штамм Tter8 №81 и пажитника греческого *Trigonella foenum-graecum* L., штамм №17. Контрольные линии выращивали на модифицированной среде MS содержащей 2.0 мг/л 2,4Д и 1.0 мг/л БАП для культуры клеток якорцев, и 1.0 мг/л 2,4Д и 0.5 мг/л кинетина для культуры клеток пажитника. Для экспериментов контрольные культуры пересаживали на аналогичные питательные среды с заменой 2,4Д на НУК (якорцы – 2.0 мг/л НУК и 1.0 мг/л БАП, пажитник – 1.0 мг/л НУК и 0.5 мг/л кинетина). Для штамма Tter8 №81 также использовали вариант с использованием двух ауксинов: 1.0 мг/л 2,4Д, 1.0 мг/л НУК и 1.0 мг/л БАП. Культивирование проводили в колбах объемом 250 мл в темноте на качалке (100 об./мин.) при 26 ± 0.5 °С.

В течение эксперимента характеризовали рост культуры и физиологическое состояние клеток: определяя сырую и сухую массу клеток, а также их жизнеспособность. Оценку содержания фураностаноловых гликозидов в сухой биомассе определяли методом ТСХ (хроматографическая пластинка Kieselgel 60 (Merck, Германия), система растворителей хлороформ — метанол — вода (65:35:10, по объему), проявитель – реактив Эрлиха).

Была исследована динамика накопления фураностаноловых гликозидов (ФГ) в культуре клеток якорцев и пажитника в течение трех циклов выращивания на средах с НУК. В контрольной линии якорцев, растущей на среде с 2,4Д в качестве ауксина, ФГ содержатся в следовых количествах. На среде с НУК на 7 сутки 1-го цикла культивирования произошло резкое повышение содержания ФГ в клетках (на хроматографических пластинках значительно увеличивается площадь и интенсивность окраски пятен, характерных для ФГ). В последующих циклах выращивания наблюдали дальнейшее увеличение содержания ФГ в культуре. В то же время использование НУК значительно ухудшило ростовые характеристики культуры. К третьему циклу выращивания жизнеспособность клеток якорцев падает с 90% до 50% и индекс роста снижается до 2 (жизнеспособность контрольной линии 95%, индекс роста 9). На среде с двумя ауксинами (НУК и 2,4Д) в первом цикле выращивания к 7 суткам культивирования также наблюдали появление ФГ, но в значительно меньшей степени, чем при полной замене 2,4Д на НУК. В последующие циклы выращивания происходило увеличение содержания ФГ в клетках, при этом, в отличие от варианта с полной заменой ауксина, рост и жизнеспособность культуры практически не отличался от контрольного варианта (жизнеспособность 90%, индекс роста 9.)

Для культуры клеток пажитника замена в среде культивирования 2,4Д на НУК вызвала практически аналогичные эффекты. В контрольной культуре ФГ также содержатся в следовых количествах, на среде с НУК с 7 суток 1-го пассажа произошло увеличение содержания ФГ, однако не столь резкое, как для культуры клеток якорцев. Максимум содержания ФГ был отмечен на 14 сутки 2-го цикла выращивания. Использование среды с НУК также снизило ростовые характеристики культуры клеток пажитника, что привело к полной гибели клеток в 3 цикле выращивания. Следует отметить, что при выращивании на средах с НУК культуры клеток якорцев и пажитника становятся более крупноагрегированными.

Таким образом, использование 1-нафтилуксусной кислоты для выращивания клеток *in vitro* интенсифицирует образование ФГ, повышает степень агрегированности клеток, и снижает рост и жизнеспособность культур. Подобное действие 1-нафтилуксусной кислоты было ранее показано на культуре клеток женьшеня *Panax ginseng* относительно образования тритерпеновых гликозидов (гинзенозидов), однако с иными временными характеристиками: образование гинзенозидов повышалось только к третьему циклу выращивания (Smolenskaya et al., 2007).

## Донорно-акцепторные отношения и регуляция фотосинтеза в системе целого растения

### Donor-acceptor relationships and regulation of photosynthesis in the whole plant

Чиков В.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, 420111. Ул. Лобачевского, д. 2/31. Россия

+7 843 231-90-46, [vichikov@bk.ru](mailto:vichikov@bk.ru)

Представлена концепция регуляции фотосинтеза в системе целого растения, основой которой являются ДАО между фотосинтезирующими и потребляющими ассимиляты органами. Выделены следующие этапы фотосинтетического метаболизма углерода, которые участвуют в регуляции фотосинтеза и транспорта ассимилятов по растению.

1. Образование органических кислот и их восстановление до сахаров в хлоропластах, меняющее рН цитозоля, вакуоли и апопласта.
2. Изменение активности внеклеточной инвертазы под влиянием повышения кислотности водной среды в апопласте.
3. Усиленный гидролиз сахарозы в апопласте изменяющий осмотичность окружающей водной среды, которая возрастает в направлении устьичной полости, где происходит основное испарение воды.
4. Возрастание осмотичности вокруг замыкающих клеток устьиц приводящее к увеличению сопротивления диффузии  $\text{CO}_2$  в лист, которое является исполнительным механизмом согласования темновых и световых реакций хлоропластов и защиты их структур от фотодеструкции через усиление фотодыхания.
5. Торможение (в результате действия активированной инвертазы) оттока сахаров из листа приводящее к перераспределению ассимилятов между надземными органами и корневой системой.
6. Степень снабжения корней ассимилятами изменяющая соотношение между нисходящим потоком сахаров и восходящим – нитратов, влияющая на уровень восстановленности нитратов и неферментативного образование в апопласте окиси азота (NO).
7. Появление в побеге сигнальной молекулы NO активирующей перестройку метаболизма и новообразование (точек роста или репродуктивных органов) в ответ на изменившиеся условия среды. Последнее, в конечном итоге, восстанавливает равновесие между потоками сахаров и нитратов, что нормализует и соотношение световых и темновых процессов фотосинтеза в листе.

Все эти звенья действуют согласованно в едином регуляторном механизме, но при этом каждое из них самостоятельно реагирует на изменение фотосинтетического потока углерода и функционально связанного с ним соседнего звена через свои индивидуальные физико-химическими свойства,



которые были подобраны в процессе длительного эволюционного поиска. При изменении условий процесс адаптации развивается следующим образом. Снижение образования в ходе фотосинтеза сахаров (например, при уменьшении освещенности или их потребления надземными органами-акцепторами) вызывает нарушение снабжения ими корневой системы, восстановления нитратов и их поступление в надземные органы в невозстановленном виде. Одновременно избыток фосфатов сахаров в цикле Кальвина активирует шикиматный путь образования бензойного кольца, а затем ароматических аминокислот и фитогормонов.

Поток  $\text{NO}_3^-$  при своем движении вверх сопровождается появлением (последовательно на каждом ярусе побега) молекул  $\text{NO}$ , которые, через активацию каллозы, закупоривают поры в ситовидных трубках флоэмы, что тормозит отток сахаров из листьев. При этом происходит субстратное активирование апопластной инвертазы.

Торможение оттока сахаров из фотосинтезирующих клеток усиливает фотодыхание, а избыточное количество продуктов гликолатного пути не в состоянии восстановиться в цикле Кальвина и образуют дополнительный пул органических кислот, что подкисляет водную среду (в том числе в апопласте). Снижение pH в апопласте активирует инвертазу, которая гидролизует сахарозу, препятствуя ее «загрузке» во флоэму и повышает осмотичность водной среды иницирующей закрытие устьиц.

Уменьшение поступления  $\text{CO}_2$  в лист снижает фотосинтез, повышает фотодыхание и метаболизм гликолата, что нормализует равновесие между темновыми и световыми реакциями и защищает хлоропласты от фотодеструкции. При повышении освещенности или потребления сахаров органами-акцепторами происходит обратное.

**Изменение активности протонной АТФазы тонопласта на транскрипционном уровне в ходе роста растяжением клеток табака суспензионной культуры VBI-0.**

The regulation of tonoplast proton pump at the transcription level during elongation in tobacco cells of suspension line VBI-0.

Чэнь Т., Михайлова Ю.В., Романюк Д.А., Емельянов В.В., Шишова М.Ф.

Санкт-Петербургский Государственный Университет, Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д.7-9

+7 812 328-20-00, [ctz1985@mail.ru](mailto:ctz1985@mail.ru)

Синхронизированная суспензионная культура клеток табака VBI-0 была использована в качестве модельной системы для изучения процессов, происходящих в ходе роста растяжением. Ранее было выявлено, что этот процесс сопровождается нелинейным изменением активности  $\text{H}^+$ -АТФаз как плазмалеммы, так и тонопласта. В данной работе особое внимание было уделено возможным изменениям активности  $\text{H}^+$ -АТФазы тонопласта и

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

особенностям регуляции активности этого фермента на транскрипционном уровне.

Показано нелинейное изменение гидролитической активности фермента с достижением максимума на 2 неделю развития культуры, характеризующейся активным ростом растяжением клеток табака. Принимая во внимание сложность организации фермента, нами была проанализирована экспрессия генов, кодирующих его субъединицы. Абсолютное большинство характеризовалось увеличением экспрессии на вторую неделю. Однако интенсивность изменений несколько различалась, что свидетельствует о возможной регуляции на трансляционном уровне. Усиление экспрессии сопровождалось увеличением содержания субъединицы В в составе фракции тонопласта, что указывает на представленность фермента повышается с ускорением роста и интенсификацией вакуолизации.

Таким образом, установлена общая тенденция – усиление активности протон-транспортирующих АТФаз как плазмалеммы, так и тонопласта для обеспечения интенсивных перестроек в ходе роста растяжением и отражает динамические процессы, происходящие в составе мембран: плазмалеммы и тонопласта.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ 16-04-00743-а.

## Прогестерон как эндогенный регулятор роста, развития и продуктивности растений

Progesterone as endogenous regulator of vegetative growth, development and productivity of plants

Шпаковский Г.В.<sup>1</sup>, Бабак О.Г.<sup>2</sup>, Халилуев М.Р.<sup>3</sup>, Бердичевец И.Н.<sup>2</sup>, Словохотов И.Ю.<sup>1</sup>, Спивак С.Г.<sup>2</sup>, Шпаковский Д.Г.<sup>1</sup>, Шематорова Е.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Россия

+7 495 330-65-83, +7 495 335-71-03, [gvs@ibch.ru](mailto:gvs@ibch.ru)

<sup>2</sup>ГНУ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220072, г. Минск, ул. Академическая 27, Республика Беларусь

(10-375)-17-284-19-16, (10-375)-17-284-19-17, [babak\\_olga@mail.ru](mailto:babak_olga@mail.ru)

<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, 127550 Москва, ул. Тимирязевская, 49, Россия

+7 499 976-40-72, +7 499 976-04-28, [marat131084@rambler.ru](mailto:marat131084@rambler.ru)

Прогестерон широко известен прежде всего как стероидный гормон млекопитающих, секретируемый яичниками и играющий важную роль в подготовке матки к установлению и последующему поддержанию беременности. Синтетические версии прогестерона, прогестины, с 1951 года

используются в качестве контрацептивных таблеток для контроля рождаемости. В то время, как биологическая роль прогестерона интенсивно изучалась у животных, причина его присутствия у растений не столь очевидна. Вместе с тем, детальный анализ ранних работ середины 60-ых и 70-ых годов XX века и ряда работ, опубликованных с начала XXI века, ясно показывает, что прогестерон и/или его предшественник прегненолон синтезируются практически в каждом из изученных в этом отношении растений, причём в количествах, свойственным соединениям гормонального ряда. При этом химическая и даже стереохимическая (пространственная) идентичность молекул прогестерона, синтезируемых в растительных и животных организмах, сомнений не вызывает, ибо в 2008-2010 гг доказана как иммунологическими, так и самыми современными физико-химическими методами (UPLC-MS/MS, DCI-NH<sub>3</sub>-MS, 1D/2D [<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C] NMR). Скорее всего, подобно другим стероидным гормонам, прогестерон по своему происхождению является древним биорегулятором, который появился многие миллионы лет назад (millions years ago, Mya), ещё до разделения ветвей, ведущих к современным растениям и животным, т.е. ~1600 Mya.

В ранних работах по изучению превращений прогестерона в растениях суспензионные культуры клеток или целые растения обрабатывали радиоактивно мечеными стероидами (прежде всего, прегненолоном, прогестероном или их стероиновыми предшественниками: холестерином, 20-гидроксихолестерином,

β-ситостерином, стигмастерином и т.д.) и анализировали распределение метки в различных метаболитах. Было установлено, что именно приведённые выше стериды являются предшественниками прогестерона, а прегненолон служит промежуточным звеном на пути синтеза прогестерона в растениях. В ряде более современных работ было изучено влияние экзогенного прогестерона на физиологию и репродукцию растений. Установлено, что прогестерон даже при очень низких концентрациях стимулирует созревание пыльцы и рост пыльцевой трубки у табака, индуцирует цветение и генеративное развитие у пшеницы и арабидопсиса, ускоряет и на свету, и в темноте рост семян *Arabidopsis thaliana*, улучшает рост *lh*-линии гороха с мутацией по гиббереллинам, стимулирует активность антиокислительного фермента каталазы у нута, ингибирует рост ряда патогенных и сапрофитных бактерий и грибов, таких, как *Rhizopus nigricans*.

Подтверждением того, что отмеченные выше гормональные функции может осуществлять и эндогенный (т.е. синтезируемый в самих растениях) прогестерон, могут служить результаты, полученные нами на трансгенных растениях табака, наперстянки и томата, экспрессирующих ген *CYP11A1* животных. Продукт экспрессии этого гена, цитохром P450<sub>sc</sub> (side chain cleavage), в митохондриях коры надпочечников животных катализирует реакции 22- и 20-гидроксилирования и расщепления связи C20-C22 с удалением боковой цепи в молекуле холестерина и превращением его в прегненолон. Хотя во всех изученных к настоящему времени протеомах растений не найдены цитохромы P450 «митохондриального» типа (the mito CYP clan), в 2002-2010 гг мы показали, что этот уникальный только для

## C-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

животных ключевой фермент стероидогенеза, цитохром CYP11A1 (P450<sub>sc</sub>), успешно синтезирует прегненолон в митохондриях трансгенных растений табака, что приводит в дальнейшем к повышению в 3-5 раз уровня эндогенного прогестерона. Фактически, впервые показано, что отдельные компоненты систем биосинтеза стероидных гормонов животных и растений совместимы друг с другом *in vivo* и могут работать сообща, существенно улучшая процессы роста, развития и даже иммунитет растений. Действительно, полученные трансгенные растения характеризуются сокращённым периодом вегетативного развития (раннее цветение и созревание семенных коробочек), повышенной продуктивностью и большей устойчивостью к абиотическим (недостаток воды, повышенное засоление) и биотическим (гораздо более лучшая сопротивляемость к инфекции грибным фитопатогеном *Botrytis cinerea*) стрессам. В совокупности с недавними работами по обнаружению у растений мембранных стероидсвязывающих белков, все эти данные указывают на регуляторную, по существу гормональную роль эндогенного прогестерона в растениях.

### Определение характеристик вызванной стрессом запрограммированной гибели клеток в процессе соматического эмбриогенеза манчжурского ясеня (*Fraxinus mandshurica* Rupr.): роль реактивных видов кислорода

Reactive oxygen species as markers of stress-induced programmed cell death in somatic embryogenesis of Manchurian ash

Ян Лин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Центральная государственная лаборатория генетики и селекции лесного хозяйства, Лесной факультет, Северо-восточный университет лесного хозяйства, Харбин 150040, КНР

+86-0451-8219150, +86-0451-82191044, yangl-cf@nefu.edu.cn,  
yangling082477@yahoo.com

Запрограммированная гибель клеток (ЗГК) является обязательной составляющей развития растений, эмбриогенеза и реакций на абиотический стресс или патогены. При этом лишь в небольшом количестве исследований рассматривается роль ЗГК во время соматического эмбриогенеза растений. Сигнальный путь ЗГК и механизмы, связанные с приобретением эмбрионной компетенции, не были в полной мере изучены. В нашей работе описывается роль реактивных видов кислорода в запрограммированной гибели клеток во время соматического эмбриогенеза эксплантов семядолей манчжурского ясеня (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) в культуре *in vitro*. Мы обнаружили, что клетки зрелых эксплантов семядолей демонстрировали отличительные признаки запрограммированной гибели клеток, например, конденсацию хроматина и фрагментацию ядерной ДНК на олигонуклеотиды в ходе соматического эмбриогенеза при добавлении в культуральную среду регуляторов роста растений, нафталенуксусной кислоты и 6-бензиладенина и

сахарозы в концентрации  $75 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ . Наблюдались выбросы  $\text{H}_2\text{O}_2$ , которые коррелировали с запрограммированной гибелью клеток и образованием ранних соматических эмбрионов. Это предполагает, что окислительная реакция обычно предшествует запрограммированной гибели клеток при соматическом эмбриогенезе. Уменьшение концентрации сахарозы в культуральной среде до  $37,5 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ , приводившее к снижению осмотического давления культуральной среды, или удаление регуляторов роста растений из среды в середине эксперимента приводило к значительному уменьшению концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в клетках экспланта и количества клеток, подвергающихся запрограммированной гибели, в каждом случае по сравнению с эксплантами, которые выращивались в среде с более высокой концентрацией сахарозы и наличием факторов роста растений. Поэтому концентрация сахарозы и наличие регуляторов роста растений были важны для индукции и культивирования соматического эмбриогенеза *F. mandshurica*. Результаты нашего исследования позволяют глубже понять механизм регуляции ЗГК на стадии экспрессии генов тотипотентности в клетках древесины лиственных пород благодаря определению характеристик соматического эмбриогенеза и механизмов, лежащих в его основе.

## Стендовые доклады

### Роль фитогормонов в реализации рост-стимулирующего действия оксида азота на растения пшеницы

The role of phytohormones in the realization of growth stimulatory effect of nitric oxide on the wheat plants

Аллагулова Ч.Р., Масленникова Д.Р., Федорова К.А., Авальбаев А.М., Плотников А.А., Шакирова Ф.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, 450054, пр. Октября, 71, Уфа, РБ, Россия

+7 347 235-60-88, +7 347 235-60-88, [shakirova@anrb.ru](mailto:shakirova@anrb.ru)

Оксид азота (NO) является внутриклеточной сигнальной молекулой, вовлекаемой в регуляцию основных физиологических процессов на всех этапах жизненного цикла растений. Так, показано активное участие NO в регуляции прорастания семян, корнеобразования, гравитропизма, закрывания устьиц, цветения, созревания плодов, процессов старения. Кроме того, имеются сведения о способности NO повышать устойчивость растений к широкому спектру стрессовых воздействий абиотической и биотической природы. В связи с этим обсуждается возможность применения экзогенных доноров NO для повышения стресс-устойчивости культурных растений с целью управления их продуктивностью и улучшением качества урожая. Это свидетельствует об актуальности исследований, направленных на выяснение молекулярных механизмов действия NO на растения пшеницы.

В качестве донора оксида азота с целью изучения его эффектов на растительные объекты в экспериментальных работах наиболее широко применяются нитропруссид натрия (SNP от Sodium Nitroprusside), хотя концентрационные пороги его влияния на растения сильно варьируют, вплоть до негативного действия на них. В связи с этим важно было провести эксперименты по отбору действующей концентрации нитропруссид натрия, эффективной в стимуляции роста растений пшеницы в нормальных условиях произрастания. С этой целью было проведено исследование влияния SNP в диапазоне концентраций от 50 до 500 мкМ с градацией 50 мкМ на интенсивность ростовых процессов растений пшеницы. Работу проводили на 3-4-суточных проростках мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Салават Юлаев. В опытах использовали два способа обработки: 1) проращивание семян в течение 3-х суток в присутствии SNP в разных концентрациях, контролем в этих опытах служили проростки, растущие на дистиллированной воде; 2) 24-часовая обработка SNP 3-х суточных отделенных от эндосперма проростков в разных концентрациях, при этом как опытные, так и контрольные проростки инкубировали на 2 %-ной сахарозе. Интенсивность ростовых процессов оценивали по энергии прорастания семян, линейным размерам, сырой и сухой массе проростков. Результаты опытов показали, что наиболее выраженный стимулирующий эффект на энергию прорастания

семян SNP оказал в концентрациях 50, 100 и особенно 200 мкМ. При этом присутствие в среде прорастания SNP в концентрации 200 мкМ отразилось в увеличении более чем на 20 % количества проросших семян относительно контроля в первые трое суток. Доказательством того, что SNP проявляет максимальную рост-стимулирующую активность в концентрации 200 мкМ, послужили данные результатов анализа линейных размеров 3-сут проростков, их сырой и сухой массы. Так, присутствие SNP в среде прорастания привело к более, чем 30 %-ному увеличению линейных размеров проростков и возрастанию их сырой и сухой массы на 30 % и 20 %, соответственно. Важно отметить, что 200 мкМ SNP оказал рост-стимулирующий эффект и при обработке 3-сут проростков в течение 24 ч, о чем также судили по линейным размерам проростков, их сырой и сухой массе.

Поскольку в регуляции и координации молекулярно-биологических и физиолого-биохимических процессов, лежащих в основе роста растений, ключевую роль отводят гормональной системе, интересно было исследовать характер влияния обработки SNP в концентрации 200 мкМ на гормональный статус растений пшеницы. Количественную оценку свободных фитогормонов 3-х суточных проростков пшеницы в одной растительной навеске проводили методом иммуноанализа. Результаты опытов показали, что инкубирование проростков в присутствии 200 мкМ SNP в течение 5 ч не оказало влияния на концентрацию ИУК в сравнении с контролем на протяжении всего опыта. Вместе с тем обработка SNP вызвала в проростках некоторое увеличение содержания АБК и почти двукратное транзитное увеличение концентрации цитокининов с максимумом на два часа от момента воздействия NO.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что нитропруссид натрия как донор NO в концентрации 200 мкМ способен проявлять свойство стимулятора роста растений пшеницы, о чем свидетельствуют данные по увеличению энергии прорастания семян, линейных размеров, сырой и сухой массе проростков. Важный вклад в реализацию рост-стимулирующего действия SNP на растения пшеницы, вероятно, вносит его способность вызывать в них значительное накопление гормонов цитокининовой природы.

## Изменение ростовой активности и скорости транспорта воды у растений при блокировании кальциевых каналов

### Change in growth activity and water transport rate in plants at blockage of calcium channels

Будаговская Н.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Москва  
119992, Россия

*postnabu@mail.ru*

Кальций-зависимые сигнальные системы играют значительную роль в регуляции функциональной активности растений. В проведении сигналов участвуют кальциевые каналы. Снижение проводимости кальциевых каналов вызывает дисбаланс в системах сигнализации, что может приводить к нарушению функциональной активности растений. Исследовалось влияние блокатора кальциевых каналов верапамила, внесенного в корневую зону, на процессы роста и транспорта воды у растений кукурузы, риса, гречихи и гороха. Показано, что верапамил вызывает снижение скорости роста растений, уменьшение водонагнетающей активности корней и скорости транспорта воды в стеблях и листьях. Динамика скорости роста растений в присутствии верапамила соответствовала динамике транспорта воды в них. Отмечено кратковременное усиление и последующее снижение скорости роста растений и скорости транспорта воды после добавления верапамила. Нарушения в процессах транспорта воды и роста растений были выражены сильнее при увеличении времени действия верапамила или его концентрации. При невысоких концентрациях верапамила растения способны частично восстанавливать сниженную блокатором кальциевых каналов скорость роста в течение нескольких часов. При более высоких концентрациях верапамила скорость роста растений снижалась необратимо. Верапамил в высоких концентрациях приводил к прекращению роста растений через несколько часов от момента добавления верапамила. Растения варианта с верапамилем менее интенсивно испаряли воду, чем контрольные, у них был снижен тургор листьев и стеблей. Развитие корневой системы и надземной части растений варианта с верапамилем задерживалось по сравнению с растениями из контрольного варианта. В длительных экспериментах у растений варианта с верапамилем наблюдалось пожелтение и подсыхание концов листьев, образование некрозов на них, ослизнение корней. Верапамил вызывал дефицит кальция в тканях растений. Таким образом, блокирование кальциевых каналов приводит к значительным нарушениям процессов роста и транспорта воды у растений.



## Влияние концентрации макроэлементов в питательной среде на рост корней и содержание цитокининов в клетках корней растений пшеницы

The effect of concentration of essential nutrients on the root growth and cytokinin content in the root cells of wheat plants

Веселов С.Ю.<sup>1</sup>, Ахиярова Г.Р.<sup>2</sup>, Иванов И.И.<sup>2</sup>, Кудоярова Г.Р.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Башкирский Государственный Университет, 450076 Уфа, ул. Заки Валиди, 32, Россия,

<sup>2</sup>Уфимский институт биологии РАН, 450054 Уфа, пр. Октября, 69, Россия  
+7 347 235-53-62, [guzel@anrb.ru](mailto:guzel@anrb.ru)

Неравномерность распределения ионов и воды в почве – одно из важных свойств среды обитания корней. Ростовая реакция корней на изменение концентрации ионов обеспечивает их эффективное поглощение растением. Одной из таких реакций является торможение удлинения корней под влиянием локального повышения концентрации макроэлементов. Эта реакция, в сочетании с усиленным ветвлением, обеспечивает захват растением элементов минерального питания из очага с их повышенной концентрацией. Известно, что повышение уровня минерального питания приводит к накоплению цитокининов в растениях. Цитокинины способны подавлять удлинение корней, как за счет непосредственного ингибирования деления их клеток, так и подавления их растяжения за счет стимуляции цитокининами синтеза этилена. Эти данные позволяют предполагать, что повышение содержания цитокининов в корнях при увеличении концентрации элементов минерального питания может способствовать ингибированию удлинения корней. Однако до сих пор содержание цитокининов при изменении уровня минерального питания определяли во всей массе корней, в то время как рост происходит в их кончиках. В данной работе мы применили метод иммуногистохимической локализации с использованием специфических антител к цитокининам для оценки влияния концентрации макроэлементов в питательной среде на уровень цитокининов в отдельных клетках корней растений пшеницы.

Влияние концентрации макроэлементов изучали в опытах с разделенной корневой системой (split root system). Недельные проростки яровой пшеницы высаживали в цилиндрические сосуды, разделяя корни растения между растворами Хогланда-Арнона I разной концентрации – 5% и 300%. Освещенность составляла 400 ммоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> при 14 ч световом дне. Дневную/ночную температуру поддерживали на уровне 26/20 °С. Максимальную длину корней измеряли ежедневно.

Распределение цитокининов в тканях растений оценивали с помощью иммуногистохимического подхода, используя специфические антитела к рибозиду зеатина, способные взаимодействовать не только с рибозидом зеатина, но и его свободным основанием и нуклеотидом. Был использована модификация, позволяющая раздельно выявлять присутствие в клетках или зеатина или его рибозилированной формы. Рибозилированные формы

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

цитокенинов конъюгируют с помощью периодата, который активирует гидроксильные группы сахаров путем их окисления, что обеспечивает их связывание с белками. В модельных опытах была также показана конъюгация нуклеотида аденина с белками с помощью периодата натрия. Для конъюгации свободных оснований с белками используют смесь альдегидов. Модификация, предложенная Веселовым и Вальке, позволяет предотвратить конъюгацию свободных оснований с белками за счет повышения рН раствора при обработке ткани смесью альдегидов (показано, что при рН 9,6 конъюгирования свободных азотистых оснований в присутствии смеси альдегидов не происходит). Таким образом, оригинальный способ конъюгации гормонов позволяет связать с белками только свободные основания (в смеси глутарового альдегида и параформальдегида, приготовленной на фосфатном буфере (рН 7,2)) или их рибозиды (с помощью метапериодата натрия в карбонатном буфере с последующей фиксацией белков в смеси глутарового альдегида и 4% параформальдегида, приготовленной на карбонатном буфере (рН 9,6), при которой связывания зеатина не происходит).

Оценка скорости удлинения корней в растворах с различной концентрацией макроэлементов показала, что в отсеке с повышенной концентрацией ионов корни удлинялись медленнее. Иммунолокализация цитокенинов в кончиках корней выявила более интенсивное окрашивание на зеатин клеток в зоне деления у корней, контактирующих с повышенной концентрацией макроэлементов.

Представляет интерес то, что в отличие от зеатина, который равномерно распределялся между клетками кончика корней в зоне деления, иммунолокализация рибозилированных форм цитокенинов выявила более интенсивное окрашивание клеток в области центрального цилиндра (перицикла и окружающих его клеток). Обработка корней раствором протонофора карбонилцианид-м-хлорфенилгидразона (КЦХФ) снижала окрашивание на зеатин, но не влияла на окрашивание рибозилированных форм цитокенинов в рядах клеток центрального цилиндра. Изучение экспрессии генов, контролирующих синтез цитокенинов у растений арабидопсиса, выявило синтез цитокенинов в области формирующихся сосудов. Поскольку цитокенины синтезируются в форме нуклеотидов, а иммунное окрашивание фиксированных с помощью периодата срезов позволяет выявить присутствие этих метаболитов, интенсивное окрашивание клеток в области центрального цилиндра корней, может быть связано с синтезом цитокенинов в этих клетках корней пшеницы. Поскольку считается, что нуклеотиды не транспортируются через мембраны клеток, отсутствие чувствительности окрашивания к действию протонофора подтверждает то, что оно связано с присутствием нуклеотидов в клетках. Результаты позволяют предполагать, что повышенная концентрация цитокенинов в корнях может быть обусловлена их синтезом. Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 15-04-04750-а.

## Сигнальные функции оксилипинов у *Neurospora crassa*

### Oxylipins signaling in *Neurospora crassa*

Белозерская Т.А.,<sup>1</sup> Гесслер Н.Н.,<sup>1</sup> Филиппович С.Ю.,<sup>1</sup> Бачурина Г.П.,<sup>1</sup>  
Гроза Н.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н.Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, <sup>2</sup>Московский технологический университет, Институт тонких химических технологий, Москва, Россия

*tabinbi@mail.ru*

Оксигенированные производные жирных кислот – оксилипины – регулируют физиологические функции у животных, растений, бактерий и грибов. У грибов они регулируют межклеточные взаимодействия, биосинтез вторичных метаболитов, диморфизм, а также взаимоотношения паразит-хозяин у патогенов растений. Наибольший интерес представляет их участие в регуляции баланса полового и бесполого воспроизведения у грибов, так называемой ауторегуляции развития, обычно происходящей под влиянием определенных внешних воздействий.

В работе использовали производные линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот. Оксилипины были получены на кафедре «Химия и технология биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского» Московского технологического университета (МИТХТ), к. х. н. Грозой Н.В. На грибе *Neurospora crassa* было показано торможение роста гиф под влиянием оксилипинов различного строения – 18-гидрокси-(9Z,12Z)-октадекадиеновой кислоты (18-HODE) и 3-гидрокси-(5Z,8Z,11Z,14Z)-эйкозатетраеновой кислоты (3-НЕТЕ). Оксилипины оказывали заметное влияние на процессы размножения, причем эффект зависел от их строения. Так, 3-НЕТЕ и 18-HODE в несколько раз увеличивали образование протоперитециев в темноте, при этом их действие проявлялось в малых концентрациях (5-10 мкМ) и было сравнимо с действием света. Соединение 20-гидрокси-(5Z,8Z,11Z,14Z)-эйкозатетраеновая кислота (20-НЕТЕ) заметного влияния на половой цикл развития не оказывала. Оксилипины также могут модулировать образование конидий.

Процесс передачи сигнала оксилипинов у грибов изучен плохо. Гриб-аскомицет *N. crassa* является удобным объектом для изучения оксилипинового сигналинга и его влияния на процессы полового и бесполого воспроизведения. У *N. crassa* характер размножения определяется совокупностью действия факторов питания и условий освещения. Конидии образуются в условиях углеводного голодания, а предшественники половых структур – протоперитеции – при азотном голодании. Оба способа размножения стимулируются светом сине-фиолетовой области спектра и контролируются фоторецепторным комплексом WCC. WCC образуется двумя PAS-домен-содержащими полипептидами WC-1 (непосредственный фоторецептор, связывающий кофактор ФАД) и WC-2. Эти мультидоменные белки являются продуктами генов *white collar-1* (*wc-1*) и *white collar-2* (*wc-2*). WCC является одновременно фоторецептором и фактором транскрипции у *N.*

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

*crassa*. Таким образом, выбранный объект исследования дает возможность проследить сигнальную роль оксипинов как в отсутствии освещения, так и под влиянием света.

В работе исследовано регуляторное действие двух оксипинов –18-NODE, производного линолевой кислоты, и 18-гидрокси-(9Z,12Z,15Z)-октадекатриеновой кислоты (18-HOTrE), производного линоленовой кислоты, на половое и бесполое размножение дикого типа *N. crassa* и мутантов по фоторецепторному комплексу *wc-1* и *wc-2*.

Показано, что 18-NODE (5, 10, 20 мкМ) и 18-HOTrE в тех же концентрациях не влияли на конидиогенез дикого типа *N. crassa* в темноте. При освещении 18-NODE стимулировала образование конидий на 54%, а 18-HOTrE ингибировала конидиогенез на 30-50%. Таким образом, производное линолевой кислоты (превалирующей у *N. crassa*) 18-NODE и производное линоленовой кислоты 18-HOTrE действовали по-разному на конидиогенез.

Оба оксипина стимулировали конидиогенез у мутанта *wc-1* в темноте (18-NODE на 55%, 18-HOTrE – на 35%), но не влияли на конидиогенез у мутанта *wc-2*. По-видимому, передача сигнала оксипинов в процессе конидиогенеза не зависит от функционирования WCC.

Обработка культуры 18-NODE приводила к увеличению количества протоперитециев в темноте. При концентрации 18-NODE 5 мкМ выявлено совместное действие оксипина и света на формирование протоперитециев у гриба. Инкубация с 18-HOTrE не отражалась на количестве протоперитециев в темноте в концентрациях от 5 до 50 мкМ, однако на свету это соединение вызывало незначительное (20%) ингибирование этого процесса. Исследуемые оксипины не влияли на образование протоперитециев у мутантов по WC-комплексу. Таким образом, полученные данные относительно действия 18-NODE на формирование протоперитециев у дикого типа *N. crassa* и мутантов по фоторецепторному комплексу позволяют сделать предположение, что WCC участвует в передаче сигнала оксипинов.

## Мелатонин регулирует физиологические процессы в проростках *Lychnis chalconica* в темноте и на синем свете

Melatonin regulates physiological processes in the seedlings *Lychnis chalconica* in the dark and under the blue light

Бойко Е.В., Головацкая И.Ф., Видершпан А.Н.

Национальный исследовательский Томский государственный университет,  
Томск, Россия

*caterinasoloveva@gmail.com*

Мелатонин как один из основных гормонов эпифиза человека и животных, участвует в регуляции ряда физиологических процессов: деятельности эндокринной системы, ведения суточного ритма, процессов старения. Он обладает антиоксидантными свойствами. Мелатонин обнаружен и у растений, но его функциональное значение до настоящего времени не определено. Синтезируется он из аминокислоты триптофана, предшественника гормона растений индолил-3-уксусной кислоты. Неизвестно участвует ли мелатонин в гормональной регуляции жизнедеятельности растений. У растений локализация и интенсивность ростовых процессов обусловлены реализацией программ ското- и фотоморфогенеза. Эти программы развития включаются в растения в зависимости от уровня освещения и спектрального состава света. Не изучена зависимость регуляции программ развития от уровня мелатонина. В связи с этим целью данного исследования стало изучение регуляции мелатонином роста и развития проростков *Lychnis chalconica* L. в темноте и на синем свете.

Исследование проводили на 7-дневных проростках *L. chalconica* L., культивированных *in vitro* на питательной среде Мурасиге-Скуга в темноте и на синем свете. 5-ти дневные этиолированные и зеленые проростки лихниса культивировали в течение 2 суток на питательной среде МС (контроль) или МС с добавлением мелатонина в концентрациях 0,1 пМ и 1 мкМ (опыт). Определяли ростовые параметры (длину корня и гипокотилея, площадь семядолей), содержание фотосинтетических пигментов и интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) по содержанию его продукта – малонового диальдегида (МДА).

В ходе исследования отметили, что проростки лихниса, выращенные в темноте, имели этиолированный фенотип, характеризующийся удлинённым гипокотилем и небольшими семядолями, в свою очередь проростки, выращенные на синем свете, имели типичный световой фенотип с укороченным гипокотилем и большими, полностью сформированными семядолями. Действие мелатонина на ростовые процессы в проростках лихниса также зависело от условий освещения. В темноте при 48-часовой обработке мелатонин не оказывал влияния на размеры органов проростка, тогда как на синем свете мелатонин в высокой концентрации значительно увеличивал площадь поверхности семядолей, не изменяя рост осевых органов проростка.

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

На синем свете мелатонин изменял уровень и состав фотосинтетических пигментов в семядолях. Низкая концентрация экзогенного гормона повышала уровень хлорофилла *a* и каротиноидов и снижала уровень хлорофилла *b*. Повышение уровня основного пигмента фотосинтеза было обусловлено защитной функцией каротиноидов, поскольку отмечалась положительная корреляция уровней этих пигментов. На основе этих данных можно предполагать, что именно через увеличение антиоксидантов осуществлялась регуляторная роль мелатонина. Высокая концентрация экзогенного гормона снизила содержание хлорофиллов *a* и *b*, что могло быть связано с изменением окислительного статуса клеток семядоли.

Установлена зависимость интенсивности перекисного окисления липидов от условий освещения. У проростков, выращенных на синем свете, интенсивность ПОЛ была выше, чем у проростков, выращенных в темноте. Наиболее вероятно, что наблюдаемая зависимость могла быть обусловлена высокой интенсивностью процесса фотосинтеза, который является естественным источником образования активных форм кислорода. В темноте с увеличением концентрации мелатонина интенсивность ПОЛ возрастала в семядолях, и снижалась в гипокотильях. На синем свете интенсивность ПОЛ снижалась при действии низкой концентрации гормона, при высокой концентрации данный показатель не изменялся. Сопоставляя динамику содержания пигментов и интенсивности ПОЛ, предположили, что снижение ПОЛ мелатонином проходило через активацию антиоксидантных систем растений, например, путем увеличения уровня каротиноидов.

В ходе адаптации методики определения МДА для исследуемого объекта – проростков *L. chalconica* – была установлена органоспецифичность процесса ПОЛ. Были отмечены значительные различия показателей уровня ПОЛ в целом побеге проростка (семядоли + гипокотиль) и отдельно в каждом органе, вероятно, это было связано с разными функциональными особенностями семядолей и гипокотыля. В семядолях происходит большое количество энергетических процессов, в результате которых образуется множество свободных радикалов, а гипокотиль выполняет преимущественно функцию транспорта веществ, в связи с этим уровень МДА в семядолях проростков, был выше в 2 раза, чем в гипокотильях. При определении уровня МДА в целом побеге (семядоли + гипокотиль) данный показатель усредняется, тем самым искажается интерпретация происходящих в проростках процессов. Таким образом, установлена органоспецифичность процесса ПОЛ в проростках *L. chalconica*. Показано участие мелатонина в регуляции функциональной активности и развитии проростков в разных условиях освещения. Одним из механизмов действия мелатонина может выступать его антиоксидантное действия.

## Особенности реакции растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.) на действие дефицита воды и фосфатов по отдельности и в их сочетании

Reaction of barley plants on water and phosphate deficiency

Веселов Д.С.<sup>1</sup>, Шарипова Г.В.<sup>1</sup>, Федяев В.В.<sup>2</sup>, Фархутдинов Р.Г.<sup>2</sup>,  
Веселов С.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Уфимский институт биологии РАН, 450054, Пр. Октября, 69, Уфа, РФ

<sup>2</sup>Башкирский государственный университет, ул. Заки Валиди, 32, Уфа, РФ

+73427355362, veselov@anrb.ru

В природных условиях растения редко бывают подвержены действию лишь одного неблагоприятного фактора, и, гораздо чаще, они испытывают одновременно ряд стрессовых воздействий. Сочетание дефицита воды и фосфатов наиболее вероятно в естественных условиях, поскольку многие регионы страдают от аридности климата, а фосфаты в большинстве случаев труднодоступны для растений из-за их связывания с алюминием и кальцием почвы, что превращает фосфаты в малорастворимые соединения. Реакция растений на дефицит воды и фосфора интенсивно изучается. Вместе с тем, редко можно встретить работы, где исследовалось одновременное воздействие на растения этих двух неблагоприятных факторов. В нашей работе было изучены особенности реакции растений на действие дефицита воды и фосфатов по отдельности и в их сочетании.

Семена ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт Михайловский) проращивали на водопроводной воде в темноте при комнатной температуре. Через сутки половину проросших проростков перенесли на 10%-ный раствор Хогланда-Арнона (контроль, +P-растения), другую часть - на раствор с исключением фосфора (-P-растения) и выращивали при температуре  $27 \pm 3^\circ\text{C}$  и 16 часовой продолжительностью светового дня. На 7-е сутки от момента посева семян у проростков у даляли зерновку. На 8 сутки растения помещали на 50% раствор полной питательной смеси Хогланда- Арнона (контроль) и с исключением фосфора. 9- суточные растения использовали для проведения исследований с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000 в концентрации 6%, что соответствовало осмотическому давлению 0,37 МПа. Через сутки после начала осмотического стресса измеряли водный потенциал - с помощью психрометра "Psyspro" (Wescor, США), взвешивали корни и рассчитывали гидравлическую проводимость по формуле  $L=T(\Psi_s-\Psi_l)^{-1}P^{-1}$ , где T – транспирация, P - вес корней,  $\Psi_s$  и  $\Psi_l$  – водный потенциал питательного раствора и листа соответственно. Осмотический потенциал корней измеряли с помощью криосометра (Osmomat 030, Германия). Содержание цитокининов в побегах и корнях растений ячменя определяли с помощью иммуноферментного анализа.

Дефицит фосфора привел к незначительному снижению водного потенциала (ВП) листа (с -0.25 МПа до -0.35 МПа). В большей степени ВП снизился в случае водного дефицита (почти в 3 раза в случае +P-растений и почти в 2 раза в случае -P-растений). Гидравлическая проводимость (ГП) в контрольных

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

условиях была выше у +P-растений по сравнению с –P-растениями (245 и 120 раст<sup>-1</sup>ч<sup>-1</sup>МПа<sup>-1</sup> соответственно). Однако, в случае дефицита воды ГП у +P-растений снижалась в 2,5 раза, в то время как у –P-растений – возрастала в 1,5 раза.

Меньшее снижение ВП у –P-растений по сравнению с +P-растениями при действии водного дефицита могло быть связано с зарегистрированным нами возрастанием ГП. За счет чего оно могло происходить? Ранее мы делали сравнение динамики показателей водного обмена у растений ячменя другого сорта (Прерия) которое показало, что повышение гидравлической проводимости, обусловленное увеличением уровня аквапоринов в плазмолемме, происходит только после накопления в клетках осмотически активных веществ. Повышение уровня экспрессии РР аквапоринов под влиянием засоления также наблюдали у растений кукурузы вслед за осмотической регуляцией. Поэтому представляло интерес сравнить осмотический потенциал у растений в наших экспериментах. Мы зарегистрировали достоверное накопление осмотиков в корнях у –P-растений на фоне ПЭГ, и именно на фоне накопления осмотиков гидравлическая проводимость достигала максимума. Важно было попытаться выявить возможный механизм накопления осмотиков на фоне дефицита фосфора.

Известно, что цитокинины могут стимулировать накопление осмотиков у растений. Поэтому представляла интерес оценка влияния дефицита воды и фосфора на концентрацию цитокининов в растениях ячменя. Нами было обнаружено повышенное содержание цитокининов в корнях -P-растений на фоне ПЭГ, которое могло стимулировать накопление осмотиков.

Таким образом, дефицит фосфора повышал устойчивость водного обмена растений ячменя к последствию дефицита воды. Наши результаты соответствуют данным о том, что в отсутствии удобрений растения были более устойчивыми к действию засухи. Это не исключает отрицательного действия дефицита фосфора на рост растений. Тем не менее, изучение реакции на дефицит воды на фоне дефицита фосфора выявило некоторые закономерности гормонального сигналинга, которые могут быть полезны для разработки биотехнологии повышения устойчивости растений к засухе.

## Регуляция продукционного процесса у зеленных растений при выращивании в светокультуре на основе узкополосных светоиспускающих диодов

Ильин А.С., Слепцов Н.Н., Анисимов А.А., Тараканов И.Г.

В настоящее время все большую актуальность приобретает выращивание растений с использованием светоиспускающих диодов. Это позволяет сократить затраты электроэнергии на досвечивание в условиях светокультуры и повысить ее рентабельность. Регулирование фотопериода и спектрального состава света, в том числе по мере прохождения растениями этапов онтогенеза, позволяет оптимизировать продукционный процесс и предупреждать нежелательные фотоморфогенетические реакции



(стеблевание растений салата и редиса, хлороз у томата, нарушение синтеза антоцианов у салата). Свет как один из главных факторов регуляции жизнедеятельности растений участвует в двух типах фотобиологических реакций, выполняющих как субстратную, так и регуляторную функции. Субстратная роль связана с поддержанием фотосинтеза (высокоэнергетические реакции), а регуляторная, или сигнальная, обеспечивает фотоморфогенетическую регуляцию роста и развития (низкоэнергетические реакции). Инновационные технологии светокультуры растений с использованием сверхъярких узкополосных светоиспускающих диодов позволяют обеспечить тонкую регуляцию процессов роста и развития растений и оптимизировать таким образом их производственный процесс, добиваясь, в том числе, и повышения качества продукции. Изучение физиологических механизмов действия света на растения с учетом новых экспериментальных возможностей, открывающихся с использованием светодиодных облучателей, позволяет подойти к разработке световых режимов интенсивного культивирования растений, в том числе с учетом их биологических особенностей на видовом и сортовом уровнях, на принципиально новой основе.

В наших экспериментах были исследованы физиологические реакции (фотосинтетическая деятельность, рост и развитие) растений, относящихся к разным жизненным формам с различающейся организацией донорно-акцепторных отношений, на выращивание в условиях искусственных световых режимов, характеризующихся разным спектральным составом света и фотопериодом. Варьирование спектральных характеристик экспериментальных световых режимов осуществлялось с использованием инновационных узкополосных светодиодных облучателей. Их применение существенно расширило экспериментальные возможности в исследованиях по фотофизиологии. Были получены данные по оптимальному соотношению красного и синего света в спектре излучения облучателей на разных этапах онтогенеза растений, необходимые для тонкой регуляции их роста, развития и производственного процесса в целом.

## Воздействие узкополосного света на содержание низкомолекулярных антиоксидантов в корнях и хвое сеянцев сосны обыкновенной

Effects of narrow-band light on the content of low-molecular antioxidants in the roots and needles of scots pine seedlings

Карташов А.В.<sup>1</sup>, Иванов Ю.В.<sup>1</sup>, Пашковский П.П.<sup>1</sup>, Мальков С.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, д. 35, г. Москва, Россия

+7 499 977-80-22, +7 499 977-80-18, [botanius@yandex.ru](mailto:botanius@yandex.ru)

<sup>2</sup>ФГБУ ВПО «Московский государственный университет леса», ул. 1-я Институтская, д. 1, г. Мытищи-5, Московская область, Россия

+7 495 583-64-90

Свет является наиболее важным фактором внешней среды, необходимым для роста и развития растений. Изменение спектрального состава света влияет не только на протекание фотосинтеза, но и на другие, связанные с ним, процессы, в частности, образование белков и вторичных метаболитов, а также формирование антиоксидантного статуса клеток. Изучение действия узкополосного света на функционирование антиоксидантной системы растений является перспективной научной задачей, решение которой позволит разработать теоретические основы повышения устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям среды.

Несмотря на существенный прогресс, достигнутый в области изучения воздействия красного и синего света на развитие культурных растений (пшеница, картофель, томат, табак, капуста, салат и др.) особенности действия узкополосного света на хвойные растения изучены недостаточно.

В работе исследовали влияние узкополосного синего и красного света на рост и развитие сеянцев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), а также на содержание низкомолекулярных антиоксидантов в их органах. В качестве источников света использовали светодиодные матрицы мощностью 50 ватт с пиками излучения 660 нм (красный свет) и 450 нм (синий свет). В качестве референсного варианта освещения использовали люминесцентные лампы OSRAM L36W/765, излучение которых имеет широкий спектр (белый свет). Выращивание растений проводили в водной культуре в светозащищенных боксах в условиях 16-часового фотопериода.

Биомасса сеянцев сосны, выращенных под красным светом, существенно не отличалась от референсной группы растений, выращенных под белым светом. Воздействие синего света приводило, к снижению биомассы сеянцев в сравнении с белым светом. Красный свет вызывал увеличение длины семянодлей и хвои сеянцев сосны, в сравнении с растениями, выращенными под белым и синим светом. Синий и красный свет вызывали сокращение числа хвоинок в сравнении с белым светом. При действии красного света у сеянцев сосны отмечалась меньшая длина главного корня, по сравнению с

референсной группой. В отличие от красного света воздействие синего света приводило к менее выраженному укорочению главного корня сеянцев.

Для установления общего уровня низкомолекулярных антиоксидантов в сеянцах сосны была определена антиоксидантная способность этанольных экстрактов из корней и хвои исследуемых растений с использованием радикального зонда ABTS. Освещение узкополосным светом вызывало существенное повышение антиоксидантной способности экстрактов из корней сеянцев: красный свет в 4,3 раза, синий свет в 6,1 раза, в сравнении с растениями, выращенными на белом свете. В хвое рост антиоксидантных свойств экстрактов наблюдался только при выращивании сеянцев сосны под красным светом (на 18%).

Ранее нами было показано, что наибольшими антиоксидантными свойствами в этанольных экстрактах сеянцев сосны обладают фенольные соединения. Воздействие красного и синего света приводило к кратному увеличению содержания фенольных соединений (в 4,2 раза) в этанольных экстрактах из корней сеянцев относительно белого света. В остальных органах (гипокотили, семядоли, хвоя) различия в содержании фенолов не были столь значительными. Вместе с этим освещение сеянцев красным светом приводило к росту фенольных соединений в хвое на 20 %, относительно референсной группы растений, а освещение синим светом, наоборот, не влияло на этот показатель.

Выявление основных групп веществ фенольной природы в этанольных экстрактах показало, что наибольший вклад в изменение антиоксидантного статуса сеянцев, выращенных под красным и синим светом, вносят катехины и проантоцианидины.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что наибольший эффект воздействия узкополосного света на антиоксидантный статус сеянцев сосны наблюдался в корне. Освещение синим светом обладало более локальным (только в корне), но, вместе с этим, и более мощным действием на антиоксидантную систему сеянцев сосны. Красный свет влиял менее интенсивно на содержание низкомолекулярных антиоксидантов, чем синий, но затрагивал все органы исследуемых растений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-01269 мол\_а.

## Сравнительный анализ экспрессии генов сигналинга цитокининов в растениях картофеля *Solanum tuberosum* (L.)

Колачевская О.О., Гетман И.А., Мякушина Ю.А., Ломин С.Н., Бургутин А.Б., Романов Г.А.

Институт физиологии растений РАН, 127276 Москва, Ботаническая 35

В нашей лаборатории исследуются гены сигналинга цитокининов в растениях картофеля. Мы сравнили экспрессию этих генов по органам растений, выращенных *in vitro* в условиях, благоприятных либо для роста (1.5% сахарозы), либо для клубнеобразования (5% сахарозы), в течение 5 недель в условиях длинного дня при температуре 20-22<sup>0</sup> С. Помимо экспрессии как таковой, мы исследовали реакцию этих генов на повышение уровня цитокинина. Для этого растения, выращенные на мостиках на водной среде МС, обрабатывали такой же средой с добавлением бензиладенина (БА, 10<sup>-6</sup> М) в течение 1 или 3 ч и сравнивали экспрессию генов в этих растениях с контрольными, которые проходили такую же обработку, но средой без БА. Таким образом, в зависимости от условий культивирования получилось 8 вариантов растений. Кроме того, мы протестировали экспрессию генов по органам у растений, выращенных *in vivo* в почве (в вазонах) в тех же световых и температурных условиях в течение 3 месяцев. К этому возрасту растения образуют клубни и достигают, по всей видимости, физиологического статуса, сопоставимого с растениями, развивавшимися в пробирках при 5% сахарозы в среде 5-6 недель.

По окончании эксперимента растения фиксировали, разделяя по органам, и выделяли РНК тризольным методом, затем получали кДНК методом обратной транскрипции. Полученную кДНК проверяли на отсутствие примесей геномной ДНК методом ПЦР с праймерами, образующими разные по длине ампликоны на матрицах кДНК и геномной ДНК; бэнд, обусловленный геномной ДНК, на геле отсутствовал. Наиболее подробно методом qRT PCR мы изучили экспрессию генов цитокининовых рецепторов. Их в картофеле выявлено 3 типа, соответствующих генам рецепторов арабидопсиса: *StHK2*, *StHK3*, *StHK4*. К каждому из них были подобраны две или более пар праймеров. Обе пары праймеров к *StHK2* подобраны для одного экзона и разницы в уровне экспрессии этого гена в зависимости от пары праймеров практически не было. Праймеры к другим двум генам подобраны для амплификации ДНК как внутри экзона, так и разных экзонов через интрон. Соотношение уровней экспрессии данных генов по органам имело сходные тенденции, но различалось по абсолютным значениям в зависимости от пары праймеров. Вероятной причиной различий может быть альтернативный сплайсинг, при котором часть транскриптов данного гена лишается отдельных экзонов. В целом можно отметить, что среди генов рецепторов цитокининов наиболее активно в картофеле экспрессировался *StHK3*, выше всего в корнях и листьях. Реакция на обработку БА заметна только у этого гена, в основном в корнях, причём сначала экспрессия росла, а затем резко падала относительно контроля. В растениях, выращенных на среде с 5% сахарозой, картина принципиально не отличалась. Сходный паттерн экспрессии наблюдался у

растений, выращенных в почве, за исключением более высокого уровня экспрессии гена в стеблях. Таким образом, можно сделать вывод, что основным рецептором цитокининов у картофеля является *StHK3*.

Среди изученных генов фосфотрансмиттеров наиболее активным был *StHP1*. В условиях клубнеобразования у растений как в почве, так и *in vitro* активность генов *StHP8* и *StHP7* была выше, чем в условиях вегетативного роста. Реакция на обработку БА проявилась только в условиях высокой сахарозы в среде, причём была явно отрицательной во всех органах, особенно в течение часа после обработки. Было обнаружено, что в картофеле присутствуют как минимум две изоформы гена *StHP4*, причём обе были активны только в листьях и не проявляли реакции на экзогенный цитокинин.

Среди шести рассмотренных генов регуляторов ответа типа А три практически не экспрессировались. Наиболее активным был ген *StRR4A*, превосходя экспрессию *StRR9A* и *StRR9C* в среднем на порядок. В условиях низкой сахарозы через час после обработки растений цитокинином активность проявлял ген *StRR9D*, уступая затем первенство *StRR9C*. Заметна существенная стимуляция активности всех генов этой группы обработкой экзогенным БА в течение первого часа, сохранявшаяся в корнях и через три часа.

Гены регуляторов ответа типа В разделились на три группы по активности: *StRR18a* и *StRR18b* проявляли высокий уровень экспрессии во всех органах растений, *StRRB11* и *StRRB14* – средний, а *StRR1a* и *StRR1b* – низкий. Реакция на обработку БА в первый час проявилась у ряда генов только на высокой сахарозе и была негативной, к третьему часу этот эффект уменьшался. В условиях низкой сахарозы эти гены проявляли снижение уровня экспрессии к третьему часу после обработки БА. В целом можно отметить, что регуляторы ответа типа А и типа В проявляли противоположную реакцию на обработку БА.

Таким образом, проанализировав ряд генов картофеля, предположительно связанных с начальными этапами сигналинга цитокининов, мы выявили среди них активные и обнаружили для некоторых из них зависимость уровня экспрессии от уровня цитокинина. В дальнейшей работе мы планируем исследовать механизмы, обеспечивающие такую реакцию и изучить активность генов биосинтеза и деградации цитокининов в растениях картофеля.

## Особенности развития корней мутанта арабидопсиса по гену *NRT1* при разбавлении питательного раствора

Distinctions of root branching of arabidopsis mutant for *NRT1.1* gene under dilution of nutrient solution

Коробова А.В., Высоцкая Л.Б., Феоктистова А.В., Иванов И.И., Кудоярова Г.Р.

Уфимский институт биологии РАН, 450054 Уфа, пр. Октября, 69, Россия  
+7 347 235-53-62, [muksin@mail.ru](mailto:muksin@mail.ru)

Изменение архитектуры корней, их ветвления - важная ростовая реакция, обеспечивающая повышение эффективности поглощения воды и растворенных в ней ионов. Недавние исследования Krouk с соавторами показали, что переносчик нитратов *NRT1.1* способен, в отсутствие нитратов, транспортировать через мембрану ауксины. Было показано, что в отличие от растений исходного генотипа, у дефицитного по этому гену мутанта наблюдается стимуляция роста боковых корней в отсутствие нитратов, что указывает на то, что нормальное функционирование *NRT1.1* подавляет рост боковых корней в этих условиях. Обнаруженный эффект объясняли тем, что в отсутствие нитратов этот переносчик способствует выходу ауксинов из клеток. С помощью репортерных конструкций было показано, что снижение концентрации нитратов предотвращает накопление ауксинов в клетках примордиев, а пониженное содержание этого гормона подавляет процесс прорастания боковых корней. Вместе с тем, этот феномен был выявлен при выращивании растений на агаре. Представляло интерес сравнить ростовую реакцию корней мутанта *nrt1* и растений исходного генотипа при их выращивании в гидропонической культуре. В нашей работе мы снижали концентрацию не только нитратов, но и других макроэлементов, поскольку ранее при изучении ростовой реакции пшеницы была выявлена такая же ростовая реакция на разбавление питательного раствора, как и на удаление нитратов из среды, т.е. подавление ветвления.

Семена мутантных растений арабидопсиса *nrt1/chl1* и исходного экотипа Col после стратификации при 4 °С в течение трех дней проращивали в песке, насыщенном питательным раствором Хогланда-Арнона. Двухнедельные проростки переносили по одному в лунки микропланшета с просверленными для корней отверстиями. В предварительных опытах было показано, что раствор Хогланда-Арнона, разведенный в 10 раз (далее – 10%), обеспечивает максимальную скорость накопления массы растений арабидопсиса при выращивании их в гидропонической культуре. Планшеты плавали в растворе Хогланда-Арнона, разведенном в 10 и 100 раз (10 и 1 % раствор, соответственно) при постоянной аэрации. Концентрация микроэлементов была одинаковой в обоих вариантах питательного раствора. Растворы обновляли ежедневно. Через 7 дней после размещения растений на растворах разной концентрации измеряли количество боковых корней второго и третьего порядка, массу и длину корней и площадь их сканированных изображений с помощью программы ImageJ.

Разбавление питательного раствора снижало скорость накопления биомассы растений, что свидетельствует о недостаточном для их роста содержании макроэлементов в 1 % среде. Дефицит элементов питания приводил к увеличению количества боковых корней у растений обоих генотипов (Col и *nrt1.1*). По этой реакции растения арабидопсиса резко отличались от растений пшеницы, у которых разведение питательного раствора подавляло ветвление. Ростовый ответ растений в наших опытах напоминал известную реакцию на дефицит фосфора. На фоне разведения питательного раствора, суммарное количество боковых корней второго и третьего порядка было больше у мутантных *nrt1.1* растений по сравнению с исходным генотипом. Стимуляция ветвления под влиянием дефицита макроэлементов, обнаруженная у мутантных растений, соответствовала данным Krouk с соавторами, которые были получены на среде без азота.

Мы обнаружили различия между растениями двух генотипов не только по ветвлению их корней, но также их длине и массе. Корни мутантных растений были длиннее и имели больший вес, чем у растений исходного генотипа, на фоне достаточного снабжения макроэлементами (10 % среда). Площадь корней растений исходного генотипа увеличивалась при снижении концентрации макроэлементов в питательном растворе, что коррелировало с активацией их ветвления. Эта характерная реакция на дефицит питания, которая обеспечивает повышение способности корней поглощать ионы. У мутантных растений площадь корней была одинаковой на обоих фонах минерального питания. На фоне 10 % питательной среды меньшее количество боковых корней компенсировалось большей массой и длиной корней по сравнению с растениями, которые росли на 1 % среде. Относительное торможение роста и развития корней на фоне достаточного снабжения растений макроэлементами считается важной адаптивной реакцией, обеспечивающей мобилизацию ресурсов, необходимых для активного роста побега. Одинаковая площадь корней у мутантных растений, зарегистрированная нами на обоих фонах минерального питания, свидетельствуют о возможной роли NRT1.1 в ограничении роста и развития корней на фоне достаточного снабжения макроэлементами, что, в определенных условиях, важно для мобилизации ресурсов в пользу побега.

Известно, что NRT1.1 не только играет роль переносчика, но и является рецептором нитратов, ответственным за изменения экспрессии чувствительных к нитратам генов. Полученные нами результаты не только подтверждают данные Krouk с соавторами об участии NRT1.1 в регуляции ветвления корней, но и свидетельствуют о его роли в регуляции накопления их массы и длины при изменении уровня минерального питания.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 15-04-04750-а.

## Эндогенные стимуляторы, повышающие эффективность ризогенеза в условиях водного дефицита

Endogenous stimulators increasing the efficiency of root formation in the conditions of water deficit

Ларская И.А., Трофимова О.И., Горшкова Т.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, а/я 30, Казань, 420111, Россия

*pzl@mail.ru*

Морфология растений подвержена значительному влиянию окружающей среды. Рост и развитие корневой системы является превосходной моделью пластичности развития, поскольку одной из адаптивных стратегий в изменившихся условиях водоснабжения является увеличение длины корней, их количества и разветвленности

Исследование процесса корнеобразования в условиях водного дефицита (ПЭГ 6000) проводили на эксплантах, полученных из первичного корня проростков кукурузы (*Zea mays* L.). Количество корней на среде MS/2 в отсутствие гормонов было незначительным и увеличивалось при добавлении 3 мкМ ИУК. При концентрации 20% ПЭГ и выше наблюдалось снижение количества корней на эксплантах. Однако умеренный водный дефицит (концентрация ПЭГ 5-10%) не только не ингибировал, но, наоборот, стимулировал корнеобразование.

Новообразование латеральных корней в изменившихся условиях, как способ приспособления растений, возможен благодаря активации определенной группы клеток, потенциально способных к реализации дальнейшей программы развития. Однако вопрос о механизмах и направлении дифференцировки таких клеток все еще остается открытым. В этом контексте, большой интерес представляет идентифицированный нами биологически активный олигосахарид - новая эндогенная сигнальная молекула углеводной природы, которая как было показано ранее, вовлечена в инициацию боковых корней в стационарных условиях. В условиях умеренного водного дефицита (диапазон концентраций ПЭГ от 5 до 10%) олигосахарин, внесенный в среду культивирования эксплантов в концентрации 5 мкг/мл, вызывал дополнительное увеличение количества корней. При других концентрациях ПЭГ подобного эффекта не было отмечено.

Таким образом, очевидно, что поскольку одним из способов повышения засухоустойчивости может быть усиление их водообеспечения вследствие более развитой корневой системы, то расшифровка механизма действия олигосахарида на процесс корнеобразования в условиях умеренного водного дефицита поможет выявить регуляторные пути и лимитирующие стадии формирования корневой системы, что является многообещающим подходом для получения более устойчивых сортов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 14-04-01591).



Адаптация методов ДНК-маркирования генов, детерминирующих биосинтез флавоноидов в плодах перца сладкого (*Capsicum annuum* L.)

Adaptation of DNA-marking of genes methods determining the biosynthesis of flavonoids in sweet pepper fruits (*Capsicum annuum* L.)

Никитинская Т.В., Яцевич К.К., Некрашевич Н.А., Бабак О.Г., Кильчевский А.В.

ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси». ул. Академическая, 27, г. Минск, Республика Беларусь, 220072  
+375(17)284-19-12, [Nikitinskaja@yandex.ru](mailto:Nikitinskaja@yandex.ru)

Флавоноиды принадлежат к классу полифенольных соединений растительного происхождения. Они не только обеспечивают пигментацию генеративных и вегетативных частей растений, но и играют заметную роль в передаче химических сигналов, определяя созревание плодов и семян, защитные свойства растений от неблагоприятных факторов окружающей среды и другие процессы роста и развития.

Ранее нами выполнены исследования по оптимизации методов ДНК-типирования аллелей гена *Ant1*, детерминирующего высокое накопление антоцианов и формирующего Aft (Anthocyanin fruit tomato) фенотип, характеризующийся специфической окраской вегетативной массы и темно-синей окраской плодов в период их формирования у томата. Согласно литературным данным, проявление Aft фенотипа обусловлено полиморфизмом единственного локуса на хромосоме 10 – *Ant1*. Ген *Anthocyanin1* (*Ant1*) кодирует *Myb* фактор транскрипции, регулирующий накопление антоциана в различных частях растений и определяющий степень проявления фенотипа Aft (Sapir M., Oren-Shamir M. et al., 2008). Для этого был использован *Ant1\_NcoI* CAPS маркер (Patent WO 2008/096354 A2). Апробацию проводили на коллекции образцов из Центра генетических ресурсов томата (Калифорния, США) и сорте китайской селекции Индиго из коллекции ИГЦ. Данный маркер синтезирует фрагмент размером около 478 п.н. и содержит 1 сайт рестрикции для фермента *NcoI* для форм с зелеными плодами. В результате рестрикции у образцов с зеленой окраской плода на технической стадии спелости образуются 2 фрагмента размером 271 п.н. и 207 п.н., а у генотипов с фиолетовоокрашенными плодами на технической стадии спелости фрагмент в 478 п.н. остается неизменным. Полученные результаты подтвердили эффективность применения данного праймера и возможность типирования растений на наличие аллеля *Ant1* в гомо- и гетерозиготном состоянии.

Целью настоящей работы является адаптация методов ДНК-маркирования генов биосинтеза флавоноидов у перца сладкого (*Capsicum annuum* L.) для создания форм с повышенной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды.

В качестве экспериментального материала использовались образцы перца сладкого коллекции ИГЦ НАН Беларуси и ВНИИССОК (РФ), отличающиеся

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

окраской перикарпия на стадии технической спелости плодов. Для ДНК-типирования образцов перца сладкого были применены STS-маркер ORF/UTR (Borovsky Y. et al., 2004) для фактора транскрипции *Myb<sub>A</sub>* гомологичного гену *Anthocyanin2* претунии, и вышеуказанный маркер Ant1\_NcoI к гену фактора транскрипции *Ant1*.

Borovsky Y. et al., 2004 описали применение маркера ORF/UTR на геномной ДНК перца с фиолетовоокрашенными плодами на технической стадии созревания. В результате его применения у всех образцов коллекции был получен фрагмент размером около 1690 п.н. и видимых различий на электрофорезе между генотипами с фиолетовой и зеленой окраской плодов на технической стадии зрелости выявлено не было.

Также были выполнены исследования с использованием маркера Ant1\_NcoI на образцах перца сладкого. В результате применения маркера с условиями ПЦР-реакции, подобранными для томата, получен неспецифический фрагмент, что подтверждено его секвенированием. В результате адаптации условий реакции был получен фрагмент длиной 478 п.н. равный фрагменту томата. Применение фермента *NcoI* выявило полиморфизм по сайту рестрикции у изучаемых форм. После рестрикции у сорта Шоколадная красавица получено 2 фрагмента размерами 271 п.н. и 207 п.н., а у форм Фиолетовый красавец, Черный красавец и Игрок – 3 фрагмента размерами 478 п.н., 271 п.н. и 207 п.н. В результате секвенирования нуклеотидные последовательности образцов Игрок, Фиолетовый красавец и Черный красавец были идентичны, при этом степень проявления антоциановой окраски на плодах у них различна. Сравнение нуклеотидной последовательности маркируемого фрагмента сорта Шоколадная красавица с последовательностью аллеля *Ant1<sup>L</sup>* томата (*Solanum lycopersicum*) показало 100% уровень сходства. Это свидетельствует об отсутствии мутантного аллеля *Ant1* у данного образца. Анализ продуктов рестрикции и нуклеотидных последовательностей сортов перца сладкого (Игрок, Фиолетовый красавец, Черный красавец) указывает, что в геноме данных форм присутствует как нормальный аллель *Ant1<sup>L</sup>*, так и мутантный аллель *Ant1<sup>C</sup>* (описанный у дикой формы томата *L. chilense*).

Таким образом, CAPS маркер Ant1\_NcoI может быть использован и для анализа полиморфизма гена перца сладкого, гомологичного *Anthocyanin1* томата.

## Участие цитокининов и АБК во взаимодействии растение – гемибiotрофный патоген (*Triticum aestivum* L. – *Septoria nodorum* Berk.)

The involvement of cytokinins and ABA in the plant - gemibiotrophic pathogen interactions (*Triticum aestivum* L. - *Septoria nodorum* Berk.)

Нужная Т.В., Веселова С.В., Архипова Т.Н., Сорокань А.В., Максимов И.В.

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, пр. Октября 71, г. Уфа, Россия

+7 347 235-60-88, [tanyawww89@mail.ru](mailto:tanyawww89@mail.ru)

<sup>2</sup>ФГБУН Уфимский институт биологии РАН, пр. Октября 69, г. Уфа, Россия

+7 347 235-62-47

Фитогормональным сигнальным системам принадлежит важная роль в регуляции защитных механизмов растений, активируемых против патогенов. При этом инфицирование различными патогенами сопровождается изменениями в гормональном балансе растений. Известно, что важную роль в регуляции иммунитета растений играют салициловая (СК) и жасмоновая (ЖК) кислоты, а также этилен. Однако исследования показывают, что иммунитет растений регулируется не только СК, ЖК и этиленом, но комплексом всех фитогормонов, в том числе цитокининами (ЦК) и АБК. Хорошо известно, что ЦК и АБК проявляют антагонизм в регуляции физиологических процессов (движение устьиц, развитие хлоропластов, созревание плодов, старение листьев), но сведения о роли этих фитогормонов в патогенезе противоречивы. Так, с одной стороны, ЦК способствуют росту и размножению биотрофных патогенов за счет аттракции питательных веществ к зоне инфицирования, а АБК усиливает прорастание спор патогенов и способствует колонизации ими растений. С другой стороны, ЦК вовлекаются в СК-сигнальный путь защиты от патогенов, а АБК участвует в формировании защитного ответа растений, регулируя сигнальный путь ЖК и процессы образования каллозы. Исходя из вышесказанного, роль ЦК и АБК в защите растений представляется неоднозначной. Возможно, как отрицательное, так и положительное влияние этих фитогормонов в развитии устойчивости растений к патогенам.

Нами была изучена роль ЦК и АБК в индукции защитных реакций в растениях (исследованные показатели: площадь поражения, накопление мРНК генов *PR-1*, *PR-2*, *PR-3*, *PR-9*) пшеницы (*Triticum aestivum* L.) двух контрастных по устойчивости сортов (восприимчивый – Жница, устойчивый – Башкирская 26 (Баш26)) инфицированных гемибiotрофным грибом *Septoria nodorum* Berk., а также влияние самого патогена на гормональный баланс растений пшеницы. Гриб *S. nodorum* - возбудитель септориоза пшеницы, изученный в этой работе, является одним из наиболее распространенных патогенов зерновых культур, особенностью паразитирования которого является гемибiotрофный характер питания, т.е. сочетание в своем развитии биотрофной и некротрофной фаз. В листьях устойчивого сорта Баш26 на раннем этапе инфицирования (1 сутки),

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

соответствующем биотрофной фазе развития, нами было обнаружено накопление ЦК, а на поздней фазе инфицирования (4 суток), соответствующей началу некротрофного периода развития, небольшое накопление АБК и сдвиг баланса в сторону ЦК на протяжении всего периода заражения. Это говорит об индукции данными фитогормонами сигнальных путей СК и ЖК в растениях в разные фазы развития патогена, что подтверждается нашими данными по накоплению транскриптов маркерных генов СК-пути (*PR-1*, *PR-2*) и ЖК-пути (*PR-3*, *PR-9*), соответственно. В листьях восприимчивого сорта Жница было обнаружено накопление АБК на протяжении всего периода заражения и сдвиг баланса в сторону АБК на ранней фазе инфицирования, что может предполагать развитие восприимчивости за счет подавления СК-сигнального пути в растениях, о чем говорит отсутствие накопления мРНК маркерных генов СК-пути (*PR-1*, *PR-2*). Кроме того, в листьях восприимчивого сорта было обнаружено накопление ЦК в поздней фазе инфицирования. Известно, что патогены способны изменять гормональный баланс растений влияя на их метаболизм или продуцируя гормоны самостоятельно, что способствует развитию инфекционного процесса. Гистохимический анализ распределения данных фитогормонов показал, что в листьях восприимчивого сорта ЦК и АБК локализовались в основном в развивающихся грибных структурах, тогда как клетки самого растения были лишены этих фитогормонов. Одним из возможных объяснений аккумуляции АБК и ЦК в пределах локализации грибных структур может быть их активное поглощение грибом с участием переносчиков из апопласта растений. Так, нами было показано, что *S. nodorum in vitro* способен активно поглощать данные фитогормоны накапливая их в своем мицелии, так как протонофор СССР (от carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) снижал это накопление. Также накопление АБК, но не ЦК, в развивающемся мицелии можно объяснить способностью *S. nodorum* синтезировать этот гормон, обнаруженную нами. Такое распределение фитогормонов в листьях восприимчивого сорта может предполагать формирование совместимых реакций, обеспечивающих последующую успешность развития заболевания. Напротив, в листьях устойчивого сорта ЦК и АБК локализовались в клетках растения, а грибные структуры не развивались, что предполагает активацию гормональных сигнальных систем, приводящих к запуску защитных реакций в растениях.

Таким образом, наши результаты показали важное значение гормонального баланса в иммунитете растений. Скорее всего, патоген *S. nodorum* сдвигал гормональный баланс в сторону АБК за счет синтеза этого гормона, а поглощение грибом растительных ЦК приводило к подавлению развития защитных реакций растений по СК-сигнальному пути, индуцируемых ЦК. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-97079-р\_поволжье\_a.

## Влияние производных стевии на физиологические показатели и газообмен в проростках пшеницы

The influence of steviol derivatives on physiological parameters of the wheat seedling

Огороднова У.А., Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю.

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, кафедра ботаники и физиологии растений. ул. Кремлевская, 18, г. Казань, Россия  
+7 843 233-71- 42, +7 843 233-78-14, [uliana\\_ogo@mail.ru](mailto:uliana_ogo@mail.ru)

На сегодняшний день развитие мирового сельского хозяйства и растениеводства невозможно без применения определенных химических препаратов, обладающих специфическим биологическим действием. К таким соединениям в частности относятся и природные регуляторы роста растений, активизирующие основные процессы жизнедеятельности, являющиеся экологически безопасными и экономически выгодными.

Стевиозид – один из энт-кауреновых гликозидов *Stevia rebaudiana*, агликоном для которых служит стевииол, имеющий структурное с фитогормоном гибберелловой кислотой, что обусловлено общими реакциями синтеза этих соединений в *Stevia rebaudiana* через каурен. Стевиол-гликозиды отличаются количеством и природой сахарных остатков, например, стевиозид имеет три глюкозных остатка, а ребаудиозид А четыре. Благодаря сладкому вкусу стевииол-гликозиды получили широкое применение в пищевой промышленности как сахарозаменители. В частности продукт «SWETA» представляет собой смесь гликозидов стевии (основной компонент ребаудиозид А).

В первой серии экспериментов, основываясь на данных морфометрии, были определены активные концентрации для ребаудиозид А и «SWETA». Исследования проводили на проростках пшеницы сорта Омская 33, выращенных на растворах исследуемых соединений. Стевиозид в концентрации  $10^{-8}$ М был взят в качестве положительного контроля, исходя из ранее полученных данных. В варианте с ребаудиозидом А в концентрации  $10^{-8}$ М на 7 сутки выращивания наблюдалось наибольшее увеличение надземной части проростка, а длина корней практически не изменялась. «SWETA» в концентрации  $10^{-8}$ М оказывала схожее с ребаудиозидом А влияние на рост листьев. Не смотря на это эффект данных соединений не превысил положительный контроль – вариант со стевиозидом (в концентрации  $10^{-8}$ М). Таким образом, для исследуемых соединений концентрацию  $10^{-8}$ М можно считать активной.

В следующей серии экспериментов мы определяли активность амилолитических ферментов. Все исследуемые вещества приводили к увеличению активности  $\alpha$ -амилазы в суточных проростках пшеницы относительно растений, выращенных на воде, но в разной степени. Обработка стевиозидом приводила к наибольшей активации фермента, а смесь гликозидов «SWETA» оказывала наименьший стимулирующий эффект на исследуемый параметр. При этом активность суммарной амилазы при

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

действию «SWETA» не изменялась, а в вариантах с чистыми гликозидами несколько ингибировалась.

Содержание белка в растении может служить одним из показателей усиления ростовых процессов. Индуцированное стевиозидом повышение данного показателя в проростках пшеницы сорта Омская 33, коррелировало с данными полученными при морфометрии. «SWETA» и ребаудиозид А не оказывали влияния на суммарное содержание белка в 7-суточных проростках пшеницы. Анализ влияния стевиол-гликозидов на отдельные параметры газообмена у растений Омской 33 показал, что исследуемые соединения достоверно не изменяли интенсивность фотосинтеза. При этом все гликозиды повышали интенсивность транспирации: стевиозид ( $10^{-8}$  М) – на 20%; ребаудиозид А ( $10^{-8}$  М) – на 24%; «SWETA» ( $10^{-8}$  М) – на 23%. Соответственно, увеличились показатели, рассчитанные по данным о транспирации: устьичная проводимость  $\text{CO}_2$  была максимальной в варианте со стевиозидом (составила 137% от контроля), с ребаудиозидом А – 109%, с препаратом «SWETA» – 105%. При этом внутрилистовая концентрация  $\text{CO}_2$  увеличивалась в растениях, выращенных на растворах со стевиозидом на 10%, ребаудиозидом А на 7,4% и «SWETA» на 13,5%. Индуцируемое стевиол-гликозидами увеличение устьичной проводимости и внутриклеточной концентрации  $\text{CO}_2$ , может способствовать поддержанию фотосинтеза на более высоком уровне при неблагоприятных воздействиях.

Не смотря на то, что и ребаудиозид А, и коммерческий препарат «SWETA» в активной концентрации  $10^{-8}$  М оказывают стимулирующие влияние на некоторые физиолого-биохимические процессы в проростках пшеницы, их действие проявляется в меньшей степени, чем у стевиозида (в концентрации  $10^{-8}$  М). Таким образом, химическая структура, количество углеводных остатков в молекулах исследуемых гликозидов и состав смеси веществ играет значительную роль в регуляции процессов жизнедеятельности растения и должно учитываться при исследовании этих соединений в качестве регуляторов роста и развития растений.

## Антиоксидантное действие препарата женьшеня при некорневой обработке яровой пшеницы

Antioxidant effect of ginseng drug under foliar treatment of spring wheat

Пахомова В.М., Даминова А.И.

ФГБОУ ВО «Казанский государственный аграрный университет», ул. К. Маркса, 65, г. Казань, 420015, Россия

+7 843 590-49-09, [pahomovav@mail.ru](mailto:pahomovav@mail.ru)

Как известно, одним из ранних признаков стресс-реакции клеток растений является развитие свободнорадикальных процессов, приводящих к нарушению барьерных свойств мембран, ферментативной активности, развитию мутагенеза, окислению хлорофилла и др. В связи с этим является актуальным поиск и расширение ассортимента антиоксидантов, применяемых в растениеводстве с целью повышения устойчивости и урожайности сельскохозяйственных культур. Представляло интерес изучение возможного проявления адаптогенного действия препарата женьшеня при его экзогенном воздействии на сельскохозяйственные растения, поскольку ранее был показано его мощное стресс-лимитирующее, антиоксидантное и протекторное влияния на организм человека и животных. Это и явилось целью настоящей работы.

Объектом исследования являлась яровая пшеница сорта МиС. Опыты проводились на опытных полях Учхоза КазГАУ на серой лесной почве среднесуглинистого механического состава. Агротехника общепринятая для яровой пшеницы для данной зоны. Урожай убирали прямым комбайнированием «Сампо-500».

Схема опыта: 1 вариант – пшеница без обработки; 2 вариант – растения опрыскивались 0,05% раствором деалкоголизированного промышленного препарата «Женьшень» производства ОАО «Тверская фармацевтическая фабрика» однократно в фазу кущения; 3 вариант – растения обрабатывались этим препаратом двукратно в фазах кущения и выхода в трубку; 4 вариант – растения обрабатывались трехкратно в фазах кущения, выхода в трубку и колошения-цветения. Расход рабочей жидкости женьшеня – 1,5 л/га.

Перекисное окисление липидов характеризовали по содержанию малонового диальдегида (МДА), активность пероксидазы оценивали по Бояркину, накопление углерода в листьях яровой пшеницы – мокрым сжиганием по Аликову, сухую биомассу – весовым методом после высушивания до постоянного веса при температуре 105°C, площадь листьев - по формуле, площадь флагового листа - методом промеров длины и ширины листовой пластинки с расчетом по формуле  $S = 0,67 \cdot A \cdot B$ , где А – ширина и В – длина листа, S – площадь листьев в см<sup>2</sup>, оценку устойчивости к полеганию - весовым методом по Аткинсу-Кокостелеву, урожайность - путем поделяночного обмолота с пересчетом на 100% чистоту и стандартную влажность.

Метеусловия 2008 г. складывались следующим образом. В начальный период развития растений условия были оптимальными для развития яровой пшеницы (май и июнь месяцы). Июль месяц был неблагоприятным по

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

количеству выпавших осадков, их количество превысило среднемноголетние значения на 27,5 мм. В августе отмечалась жаркая сухая погода.

Статистическая обработка данных проводилась дисперсионным методом и методом математической статистики с программным обеспечением Excel и Statistic. Повторность опытов 3-10 кратная. О достоверности разницы между вариантами судили по критерию Стьюдента при уровне значимости  $P_{0,05}$ .

При трехкратной обработке препаратом наблюдалось увеличение урожайности яровой пшеницы на 8,9 ц/га, сухой биомассы в фазу колошение-цветение (на 30 %) и устойчивости к полеганию (на 18%), что очень важно в условиях переувлажнения опытного года на определенных этапах онтогенеза растений пшеницы. Показано возрастание накопление углерода в листьях в фазу колошение-цветение при всех обработках (соответственно, на 35, 50 и 67 %). Зарегистрировано также снижение образования МДА в листьях растений в фазу кущения при однократной обработке (на 38%) и в фазу колошение-цветение при двух- и трехкратной обработках (соответственно, на 30 и 21,5%). Активность пероксидазы увеличивалась в фазу колошение-цветение при двух- и трехкратном опрыскивании (на 11 и 14%, соответственно). При этом не менялись следующие показатели: площадь листовой поверхности растений и площадь флагового листа, сохранность растений к уборке и высота растений. На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что, по крайней мере, трехкратная обработка вегетирующих растений препаратом женьшеня оказывала достоверное полифункциональное действие: мембраностабилизирующее и антиоксидантное (судя по активности перекисного окисления липидов и одного из ферментов антиоксидантной защиты клеток - пероксидазы), анаболическое (судя по накоплению углерода, сухой биомассы и урожайности) и адаптогенное (судя по устойчивости к полеганию). Таким образом, препарат женьшеня проявляет универсальное адаптогенное влияние на различные биосистемы.



Связь между путем ранней трансдукции ауксина, включающего AXR1 и регуляцией уровня ИУК в растениях арабидопсиса

Crosslink between early auxin transduction pathway involving AXR1 and the regulation of IAA level in *Arabidopsis* plants

Романюк Д.А.<sup>1</sup>, Емельянов В.В.<sup>1,2</sup>, Пузанский Р.К.<sup>1,3</sup>, Шишова М.Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербургский Государственный Университет, 199034, Университетская наб. д.7-9, Санкт-Петербург, Россия, Тел/факс: +7 (812) 328-20-00.

<sup>2</sup> Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский Государственный Университет, 199034, Университетская наб. д.7-9, Санкт-Петербург, Россия, Тел/факс: +7 (812) 328-20-00.

<sup>3</sup> Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН), 197376, ул. Профессора Попова, д. 2, г. Санкт-Петербург, Россия

+7 812 372-54-43, [daria-rom@yandex.ru](mailto:daria-rom@yandex.ru)

Известно, что ауксин обладает самым широким спектром физиологического действия. Под его контролем находятся деление и растяжение растительных клеток, дифференцировка различных тканей, регуляция целого ряда морфогенетических программ. Столь большое разнообразие реакций на внесение одного и того же химического соединения предполагает изменение чувствительности клеток к гормону в зависимости от их локализации и стадии онтогенеза. Накопленные данные свидетельствуют о том, что характер и интенсивность индуцируемых ответных реакций клетки может зависеть как от величины концентрации свободного гормона так и от интенсивности поступления гормона в из клетки.

Согласно современным представлениям рецепция фитогормона осуществляется следующим образом. Оказавшись внутри клетки ауксин связывается с растворимым рецептором TIR1/AFB. AXR1 кодирует E1-подобный белок, который взаимодействует с ECR1 белком и тем самым активирует RUB белок для конъюгации с куллинами. Активность AXR1 приводит к неделированию SCF<sub>TIR1</sub>-лигазного комплекса RUB белком, необходимым для дальнейшего полиубиквитинирования AUX/IAA белков, которое инициирует их деградацию в 26S протеасоме. Деградация репрессоров транскрипции AUX/IAA при повышении концентрации ауксина приводит к высвобождению транскрипционных факторов ARF, что инициирует экспрессию генов ауксинового ответа.

В работе проведен комплексный анализ роста, развития, содержания эндогенной свободной ИУК (индолил-3-уксусной кислоты) и экспрессии генов, отвечающих за его синтез (гены семейства YUC), транспорт (гены семейства AUX, PIN, ABCB) и конъюгацию (гены семейства GH3) в корнях и побегах *Arabidopsis thaliana* дикого типа и мутанта *axr1-3*, выращенных на среде без или с добавлением экзогенного ауксина (ИУК-индолил-3-уксусная кислота или ее синтетического аналога 1-НУК-1-нафтилуксусной кислоты). Для анализа экспрессии генов в работе использовали инновационный подход с использованием платформы Fluidigm, сочетающей свойства технологии

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

микро-чипов и РТ-ПЦР. Полученные данные анализировали методами мультивариантной статистики. Показано что экзогенная обработка ИУК привела к накоплению свободной эндогенной ИУК только в побегах проростков дикого типа. Выявленные изменения в содержании эндогенной свободной ИУК в корнях и побегах мутанта *axr1-3* с измененной чувствительностью к гормону коррелируют с изменением экспрессии гена *TAA1* и ряда генов *YUC*, кодирующих ферменты, участвующие в биосинтезе ауксина. В связи с тем, что пути деградации ауксина плохо изучены и не известны гены и/или ферменты отвечающие за окисление ИУК в растениях, данные об экспрессии генов участвующих в этом процессе отсутствуют. Поэтому, для того, чтобы оценить вклад деградации ИУК в регуляции внутриклеточного гомеостаза ауксина был проведен анализ активности ИУК-оксидазы. Основываясь на экспериментальных данных, предположена модель регуляции интенсивности накопления ауксина в побегах и корнях *A.thaliana* на транскрипционном уровне при изменении чувствительности к фитогормону.

Работа поддержана грантами РФФИ 16-04-00743 и СПбГУ 1.50.123.2014.

## Участие оксида азота в регуляции ростовой активности неморфогенного каллуса гречихи татарской

Participation of nitric oxide in the regulation of growth activity of non-morphogenic calli of tatar buckwheat

Сибгатуллина Г.В., Акулов А.Н., Горшков О.В., Румянцева Н.И.

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, а/я 30, Казань, Россия

+7 843 231-90-42, kam-guz@yandex.ru

Изучали взаимосвязь между динамикой внутриклеточного содержания NO и изменением уровня экспрессии генов клеточного цикла *CYCD3;1* и *CDKAI;1* в течение культурального цикла в неморфогенном, быстро нарастающем каллусе гречихи татарской. Локализацию NO оценивали с помощью флуоресцентного красителя диаминофлуоресцеина. Содержание NO в клетках изменяли, добавляя в среду культивирования либо донор NO нитропруссид натрия, либо скэвенджер NO сPTiO. Показано, что внутриклеточное содержание NO в ходе пассажа варьирует от 0,2 до 0,8 мкМ/г сух веса, при этом значительных изменений в локализации оксида азота в клетках неморфогенного каллуса в течение пассажа обнаружено не было (NO обнаруживали вблизи клеточных стенок). Пик содержания эндогенного NO отмечали на 1-е сут культивирования, и он предшествовал пику митотической активности клеток каллуса (2-е сут). Добавление в среду культивирования нитропруссид натрия вызывало увеличение экспрессии *CYCD3;1*, тогда как добавление скэвенджера NO сPTiO приводило к снижению экспрессии *CYCD3;1*. В случае *CDKAI;1*: в обоих вариантах воздействия было обнаружено снижение уровня экспрессии этого гена. Установлено, что как нитропруссид натрия, так и сPTiO вызывали снижение содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках каллуса. Важно отметить, что увеличение или снижение содержания внутриклеточного NO оказывало влияние (активирующее или подавляющее) на митотическую активность и прирост биомассы каллусной культуры. Таким образом, было установлено, что NO регулирует экспрессию генов клеточного цикла *CYCD3;1* и *CDKAI;1*, митотическую активность и рост каллуса гречихи татарской. Предполагается, что регуляторный эффект NO на экспрессию *CDKAI;1* может быть опосредован изменением редокс-статуса клеток.

## STENOFOLIA как потенциальный регулятор соматического эмбриогенеза у *medicago truncatula*

STENOFOLIA potentially regulates somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*

Федорова Ю.А.<sup>1</sup>, Творогова В.Е.<sup>1</sup>, Tadege M.<sup>2</sup>, Zhang F.<sup>2</sup>, Лутова Л.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Oklahoma State University, Ardmore, USA

*julchen.fedorowa@gmail.com*

Соматический эмбриогенез (СЭ) является особым типом регенерации растений из соматических клеток и широко используется в биотехнологии растений. На СЭ оказывают влияние множество факторов, таких как фитогормоны, транскрипционные факторы, условия культивирования и другие. В частности, важными участниками этого процесса являются гомеодомен-содержащие транскрипционные факторы семейства *WOX*. Для некоторых из них показано участие как в СЭ, так и в обычном зиготическом эмбриогенезе (ЗЭ), который происходит после слияния мужских и женских гамет. Однако роли многих генов *WOX* в СЭ остаются неизученными. Целью нашего исследования является поиск новых регуляторов СЭ в семействе генов *WOX*.

Мы обнаружили, что в клеточной культуре *Medicago truncatula* повышенная экспрессия гена *STENOFOLIA (STF)*, принадлежащего к семейству *WOX*, ассоциирована с СЭ. В растениях *in vivo* *STF* активно экспрессируется в генеративных органах — плодах и цветках, что позволяет также предположить его участие и в ЗЭ. Локальный анализ экспрессии *STF* показал, что промотор этого гена активен в соматических эмбрионах. Сверхэкспрессия *STF* приводит к увеличению количества соматических эмбрионов на каллусах и коррелирует с уменьшением уровней экспрессии генов *MtGH3.6* и *MtHBI*, участвующих в метаболизме ауксина и в сигналинге абсцизовой кислоты, соответственно.

Неожиданным образом, мутанты с потерей функции *STF* также продемонстрировали повышенную способность к СЭ.

Эти данные позволяют предположить, что *STF* может оказывать воздействие на процесс СЭ посредством разных механизмов. Для изучения этих механизмов мы планируем найти среди уже известных участников СЭ мишени *STF* и белки, взаимодействующие с этим транскрипционным фактором, с помощью количественной ПЦР, EMSA, дрожжевой двугибридной системы и метода бимолекулярной флуоресцентной комплементации.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-34-20071 и грантом СПбГУ 1.42.1288.2014.

## Влияние ванадата и дефицита фосфора на содержание гормонов, рост и развитие растений арабидопсиса

Effect of vanadate and phosphorus deficit on the hormone content, growth and development of Arabidopsis plants

Феоктистова А.В., Высоцкая Л.Б., Кудоярова Г.Р.

Уфимский институт биологии РАН, 450054 Уфа, пр. Октября, 69, Россия

+7 347 2355362, [trekozova.a@yandex.ru](mailto:trekozova.a@yandex.ru)

Гормоны играют важную роль в реакции растений на уровень минерального питания, в том числе, на дефицит фосфора (P). Ранее нами было обнаружено, что быстрое торможение роста побега растений арабидопсиса и ячменя при дефиците фосфора связано со снижением содержания цитокининов в побеге. Поскольку при этом было зарегистрировано накопление цитокининов в корнях, мы предположили, что падение уровня цитокининов в побеге является результатом уменьшения их оттока из корней. В 2014 г. Donghui Ko с соавторами показали, что накопление цитокининов в корнях и их пониженный уровень в побеге мутанта по гену транспортера *ABCG14* могут быть связаны с нарушением транспорта цитокининов из корней. Для того, чтобы проверить гипотезу о том, что изменение распределения гормонов между побегом и корнем при дефиците фосфора зависит от активности связанных с ABC транспортерами АТФ-аз, мы обработали растения специфическим ингибитором АТФ-аз ванадатом. Кроме цитокининов, мы также определяли содержание других гормонов, поскольку подавление активности ABC транспортеров могло сказаться на их уровне.

Растения арабидопсиса экотипа Columbia (*Col*) после холодной индукции прорастивали в чашках Петри, пересаживали в стаканчики с песком, пропитанным раствором Хогланда–Арнона, и выращивали до двух-трех настоящих листьев. Затем растения пересаживали в лунки микропланшетов из полистирола с отверстиями, планшеты с растениями переносили на разведенную в 10 раз среду Хогланда–Арнона с фосфатами или без них. К части растений в среду, содержащую фосфаты добавили ванадат до конечной концентрации 1 мМ. Через 5 дней после перенесения растений на среду с фосфатами и без них подсчитывали количество боковых корней. Через сутки после обработки ванадатом (2 суток воздействия дефицита фосфора) определяли содержание фитогормонов после спиртовой экстракции с помощью иммуноферментного анализа.

Определение содержания цитокининов выявило их накопление в корнях и снижение в побегах растений арабидопсиса под влиянием дефицита фосфатов. Таким образом, в данных экспериментах воспроизвелся описанный ранее эффект. Однако, вопреки ожиданиям, обработка ванадатом растений, росших на среде с фосфатами (P<sup>+</sup>), снижала, а не повышала содержание цитокининов в корнях. Таким образом, эти результаты опровергли наше предположение о том, что накопление цитокининов в корнях было связано со снижением активности транспортных АТФ-аз.

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

Вместе с тем, обнаружено сходство в изменении содержания АБК в корнях  $P^-$ -растений, обработанных ванадатом, и растений которые росли на среде без фосфатов ( $P^-$ ). В обоих случаях содержание АБК в корнях было более низким по сравнению с  $P^+$ -растениями, росшими без ванадата. Недавние исследования Киготоги (2011) с соавторами показали необходимость АВС-транспортеров для транспорта и накопления АБК в растениях арабидопсиса. Полученные нами результаты подтверждают, что ингибирование АВС-транспортеров с помощью ванадата снижает накоплением АБК в корнях растений арабидопсиса.

Одновременно со снижением содержания АБК в корнях  $P^-$ -растений и  $P^+$ -растений, обработанных ванадатом, мы зарегистрировали увеличение числа боковых корней по сравнению с  $P^+$ -растениями, росшими без ванадата. Активация ветвления корней является одной из наиболее известных ростовых реакций растений арабидопсиса на дефицит фосфатов. Ранее мы высказывали предположение, что активация образования боковых корней у  $P^-$ -растений может быть связана с пониженным уровнем АБК в корнях. Это предположение опиралось на данные De Smet (2006) с коллегами о способности АБК ингибировать ветвление корней. Полученные в настоящей работе результаты подтверждают наличие связи между снижением уровня АБК в корнях и стимуляцией их ветвления и позволяют предполагать, что ростовая реакция растений может зависеть от активности АВС-транспортеров. Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 15-04-04750.

Идентификация локусов хромосом, определяющих проявление признаков продуктивности у гексаплоидной мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в контролируемых условиях агроэкобиополигона

Identification of chromosome loci which determined traits of productivity in hexaploid soft wheat (*Triticum aestivum* L.) in controlled environment conditions of agroecobiopolygon

Мирская Г.В.<sup>1</sup>, Канаш Е.В.<sup>1</sup>, Кочерина Н.В.<sup>2</sup>, Фатеев Д.А.<sup>2</sup>,  
Кравцова А.В.<sup>1</sup>, Русаков Д.В.<sup>1</sup>, Ловассер У.<sup>3</sup>, Бёрнер А.<sup>3</sup>,  
Чесноков Ю.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Агрофизический научно-исследовательский институт»,  
Гражданский проспект, д.14, 195220 Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», ул. Большая Морская, д.44, 190000 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Лейбниц-Институт генетики растений и исследования возделываемых культур, Корренштрассе, д.3, 06466 Гатерслебен, Германия

+7 812 571-82-74, [yu.chesnokov@vir.nw.ru](mailto:yu.chesnokov@vir.nw.ru)

Большинство морфологических и хозяйственно значимых признаков, определяющих продуктивность у высших растений, обычно, являются количественными и, как правило, определяются аллельной структурой определенного числа генетических локусов. В связи с этим, как следует из накопленных к сегодняшнему дню данных, спектр генов, детерминирующих среднюю величину и генетическую дисперсию количественного признака, зачастую, определяется лимитирующим фактором внешней среды. Смена лимитирующего фактора влечет за собой также смену спектра генетических локусов определяющих изменчивость признака.

Установление природы эколого-генетического и эколого-физиологического взаимодействия “генотип-среда” является одной из тех фундаментальных задач, решение которых возможно через установление механизмов наследования и регуляции реализации на физиологическом и молекулярно-генетическом уровнях генетических компонентов систем индивидуальной и популяционной приспособленности. Соотносительное ранжирование генотипов, обычно, варьирует в различных условиях окружающей среды, и их взаимодействие может быть комплексным. Многие количественные признаки продуктивности у пшеницы, включая урожай зерна, время цветения, устойчивость к различным заболеваниям, демонстрируют достоверную изменчивость своего проявления во взаимодействии “генотип-среда”. В то же время, большинство современных исследований по физиолого-генетическому изучению взаимодействия “генотип-среда” и картированию QTL, в основном, ограничиваются измерением сезонных воздействий на ту или иную картирующую популяцию либо проводится работа по изучению различных картирующих популяций, но в сходных условиях произрастания.

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

В наших исследованиях впервые предпринята попытка установления количества и точной хромосомной локализации генетических детерминант (QTL), вовлеченных в физиолого-генетический процесс реализации сложных признаков продуктивности у яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), проявляющих себя в контролируемых условиях регулируемой агроэкосистемы биополигона. В двух экспериментах отличающихся друг от друга режимами температуры (24-25°C - день/19-20°C ночь и 28-29°C - день/23-24°C ночь, в первом и втором экспериментах, соответственно) и освещенности (40±0.5 Вт/м<sup>2</sup> ФАР и 50±0.5 Вт/м<sup>2</sup> ФАР в первом и втором экспериментах, соответственно) при строгом контроле и неизменности остальных параметров выращивания в общей сложности было идентифицировано 99 QTL, определяющих 30 различных агрономически значимых признаков. Результаты, значимые на уровне  $p < 0.01$ , рассматривали как статистически значимые, а результаты с уровнем  $p < 0.001$  – как высоко значимые. Достоверность взаимосвязи между идентифицированными QTL и полиморфизмом по тому или иному признаку оценивали на основе порогового значения отношения правдоподобия логарифма шансов LOD-score (logarithm of odds). Выполненное картирование QTL позволило установить распределение идентифицированных локусов по группам сцепления. По результатам QTL и однофакторного дисперсионного анализом было установлено, что при изменении температурного режима и режима освещенности, из 30 оцененных признаков 21 оставались стабильными в своем проявлении, и только 9 признаков варьировали, указывая на то, что их проявление зависит от изменения данных режимов. Следует отметить, что из девяти варьирующих признаков четыре напрямую связаны с продуктивностью зерна, что определяет не только хозяйственную ценность данных признаков, но и их значение для выживания, сохранения и распространения вида. Еще четыре признака выполняют защитно-адаптивную функцию в жизнеобеспечении растений в процессе их вегетации, а один признак реализуется в фазе начального роста и развития растений, играя инициаторную роль реализации всего каскада физиолого-генетических механизмов, определяющих максимально возможную в данных условиях среды продуктивность растений. Кроме того, с помощью QTL анализа выявлена блочная структура строения генома *T. aestivum*, процент фенотипической изменчивости, определяемой каждым из идентифицированных QTL, а также то, каким из родителей привнесен тот или иной аллель QTL. Полученные результаты представляют интерес для последующего изучения физиолого-генетических механизмов реализации оцененных во взаимодействии “генотип-среда” признаков и для проведения маркер-вспомогательной селекции у пшеницы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ 16-04-00311-а.



## Влияние 24-эпибрассинолида на содержание фитогормонов, АЗП и митотический индекс клеток зародышевого каллуса у различающихся по устойчивости к засухе сортов мягкой пшеницы

Effect of 24-epibrassinolide on the content of phytohormones, WGA and mitotic index of embryo callus cells of differing in drought resistance wheat cultivars

Шакирова Ф.М.<sup>1</sup>, Безрукова<sup>1</sup> М.В., Лубянова<sup>1</sup> А.Р., Сельдимирова О.А.<sup>2</sup>,  
И.Р. Галин<sup>2</sup>, Н.Н. Круглова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФБГУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 71, Россия

<sup>2</sup> ФБГУН Уфимский Институт биологии РАН, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 69, Россия

+7 234 7356088, +7 234 72356088, shakirova@anrb.ru

Из данных литературы известны сведения о формировании каллусных культур на питательных средах, содержащих вместо цитокининов кинетина или 6-бензиламинопурина брассиностероиды. Нами из незрелых зародышей контрастных по засухоустойчивости сортов яровой мягкой пшеницы Башкирская 26 (Б26, устойчивый к засухе) и Салават Юлаев (СЮ, неустойчивый к засухе) получены *in vitro* с использованием индукционной питательной среды двух вариантов: среды MS-I, составленной по прописи Мурасиге-Скуга с добавлением 2.0 мг/л 2,4-Д и 0.2 мг/л кинетина (контрольные варианты), и среды MS-II, в которой кинетин заменен на 0.2 мг/л 24-эпибрассинолида (ЭБ) (опытные варианты). Каллусы обоих сортов, растущих на среде, содержащей ЭБ, характеризовались существенно большей сырой массой и % митотического индекса клеток к концу пассажа относительно контрольных вариантов. Ключевую роль в регуляции роста, как интактных растений, так и клеток каллусов играют фитогормоны. Нами выявлено, что каллусы обоих сортов, культивируемых на среде MS-I, характеризовались одним пиком накопления в них АБК - у сорта Б26 максимум содержания АБК приходился на 10-е сут опыта, после чего наблюдалось относительно быстрое падение содержания гормона до исходного уровня, тогда как у сорта СЮ повышение уровня АБК было более продолжительным с максимумом на 21-е сут. Известно, что эндогенная АБК играет ключевую роль в индукции транскрипции гена агглютинина зародыша пшеницы (АЗП) и увеличения его количественного уровня. Преимущественным местом синтеза и накопления этого лектина являются кончики корней, поэтому неудивительно, что он, обладая митогенными свойствами, вовлечен в деление клеток кончиков корней в нормальных условиях произрастания и способствует уменьшению уровня негативного действия стрессовых факторов на митотическую активность апикальной меристемы корней пшеницы. Исследование содержания АЗП в каллусах обоих сортов, культивируемых на среде MS-I, выявило более чем двукратное увеличение уровня белка с максимумами на 13-15-е сут у сорта Б26 и 21-24-е

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

сут у сорта СЮ, после чего содержание АЗП снижалось вследствие его экскреции во внешнюю среду. Важно отметить, что существенное возрастание концентрации АЗП наблюдалось в каллусах обоих сортов в ходе их культивирования на среде, содержащей ЭБ, на фоне отсутствия каких-либо сдвигов в содержании АБК, при этом в каллусах Б26 содержание АЗП было самым высоким с максимумом на 20-25-е сут опыта. Вместе с тем, в каллусах обоих сортов, растущих на среде, содержащей ЭБ, обнаружено более чем двукратное стойкое накопление цитокининов с максимумом у каллусов СЮ на 20-25-е сут и существенно большее по уровню - у каллусов сорта Б26 с максимумом на 15-20-е сут. Полученные данные указывают на способность ЭБ индуцировать синтез и накопление АЗП независимо от эндогенной АБК и вносить свой вклад в активацию митотической активности каллусных клеток исследуемых сортов. Так, митотический индекс каллусов, полученных из незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы неустойчивого к засухе сорта СЮ и засухоустойчивого сорта Б26, культивируемых на среде MS-I в течение 27 сут, составил 3.8 и 4.7 %, тогда как при культивировании каллусов этих сортов на среде MS-II – 4.5 и 5.3 %, соответственно. Совокупность полученных результатов демонстрирует эффективность культивирования каллусов пшеницы обоих сортов на среде MS-II, в которой цитокинин заменен на 24-эпибрассинолид, о чем свидетельствуют данные об ускорении роста опытных каллусов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00731.

## Влияния экзогенных элиситоров на содержание эндогенных ИУК и АБК в проростках озимой пшеницы

The influence of exogenous elicitors on the endogenous IAA and ABA in seedlings winter wheat

Яблонская Е.К.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный аграрный университет», 350044, ул. им. Калинина, 13, г. Краснодар, Россия  
+7 861 221-59-42, [yablonskay@mail.ru](mailto:yablonskay@mail.ru)

Применение физиологически активных веществ на ранних стадиях онтогенеза путем предпосевной обработки семян позволяет повысить интенсивность обменных процессов при прорастании и более эффективно использовать запасные вещества семени. В результате активизируется рост проростков, их развитие, повышается жизнеспособность и, как следствие, продуктивность растений.

В последние годы весьма актуально при выращивании озимой пшеницы использовать индукторы иммунитета, в том числе антитоды, обладающие элиситорной активностью, в качестве эффективного агротехнического приема, позволяющего повысить адаптационные возможности растений, снизить загрязнение окружающей среды пестицидами, обеспечить получение экологически чистой продукции и понизить ее себестоимость. К таким препаратам относятся аминокислота метионин, являющаяся предшественником этилена (стрессового гормона) в растениях и созданный в ФГБОУ ВПО КубГТУ регулятор роста растений препарат фуролан. Известно, что фуролан повышает продуктивность растений пшеницы, улучшает физико-химические показатели качества зерна, повышает устойчивость растений к поражению грибными заболеваниями и засухе, является антитодом гербицида 2,4-Д. Метионин применяется для повышения устойчивости растений пшеницы и др. культур к поражению бактериозами. Они малотоксичны, применяются в микродозах, экологически безопасны. Ранее нами установлены физиолого-биохимические закономерности элиситорной, антистрессовой, а также антитодной активности композиции метионина и фуролана к гербициду 2,4-Д, являющемуся действующим веществом большинства современных гербицидов.

Для изучения влияния препарата фуролан, метионин и их композиции на формирование продуктивности, устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессовым факторам, а также на качество зерна, использовались сорта озимой пшеницы Краснодарская 99, Таня, Иришка, Юка и Фортуна селекции Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко, отличающиеся повышенным потенциалом к накоплению белка и интенсивностью роста.

Применение препаратов оказывает положительное влияние на процесс прорастания семян. Они достоверно увеличивают всхожесть семян на 15-18%, в сравнении с контролем, что обуславливает улучшение посевных качеств семян озимой пшеницы у всех изучаемых сортов озимой пшеницы. У

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

проростков пшеницы препарат фуrolан в большей степени активирует длину побеговой системы, способствуя накоплению массы преимущественно в надземной части проростков, препарат метионин – в корнях, что указывает на изменение распределения пластических веществ между побеговой и корневой системами в этих вариантах опыта в сравнении с контролем. Композиция препаратов способствует более активному и равномерному накоплению биомассы как в корнях, так и в побеговой системе проростков озимой пшеницы, что наблюдается в контрольном варианте. Следовательно, композиция препаратов фуrolан и метионин равномерно активирует рост как корневой, так и побеговой систем проростков озимой пшеницы и не оказывает существенного влияния на донорно-акцепторные отношения в проростках озимой пшеницы всех изучаемых сортов.

Активация роста 7-дневных проростков озимой пшеницы обусловлена увеличением соотношения между ИУК и АБК: метионин - на 13%, фуrolан – в 2,2 раза, метионин+фуrolан – в 2,5 раза. Препараты увеличивают значение этого показателя, что и обуславливает более интенсивный рост проростков.

Предпосевная обработка семян озимой пшеницы препаратом фуrolан и композицией препаратов фуrolан и метионин (в дозах по 5 г/т семян каждого) улучшает посевные качества семян и позволяет получить более жизнеспособные проростки. При этом отмечается синергетический эффект от воздействия препаратов преимущественно на ростовые и синтетические процессы в побеговой системе в сравнении с контролем.

Во всех вариантах опыта выявлено влияние препаратов на всхожесть семян, препарата фуrolан – на рост как корневой системы, так и побегов проростков, а также накопление в них биомассы, препарата метионин – на рост корневой системы, а его композиции с фуrolаном – преимущественно на рост побегов проростков. Причем наибольшее влияние на синтетические процессы в проростках в составе композиции препаратов оказывает фуrolан.

Этот препарат активирует рост побеговой и корневой систем проростков озимой пшеницы как делением, так и растяжением клеток, а метионин – растяжением клеток, но при совместном их применении наблюдается синергизм их действия на рост как побеговой, так и корневой систем проростков растяжением клеток. Установлено перераспределение пластических веществ под действием фуrolана и его композиции с метионином преимущественно в побеговую систему проростков, что позволяет предположить более активное накопление пластических веществ в ней, и, как следствие, увеличение потенциальной продуктивности.

## Заочное участие

Роль генетических систем контроля темпов развития растений в детерминации каллусогенеза изолиний NILs пшеницы и сои

Role of genetic control systems of plants rates development in determination callusogenesis isolines NILS of wheat and soybeans

Авксентьева О.А.<sup>1</sup>, Васильченко М.С.<sup>2</sup>, Шулик В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская 64, 01601, Киев, УКРАИНА

<sup>2</sup> Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы 4, 61022, Харьков, УКРАИНА

[avksentyeva@rambler.ru](mailto:avksentyeva@rambler.ru)

Культура растительных клеток *in vitro* является уникальным инструментом для изучения фундаментальных проблем биологии, включая вопросы физиологии, генетики, устойчивости, роста и развития растений. Каллусогенез - это процесс активной, постоянной пролиферации и неограниченного роста недифференцированных клеток. Эффективность каллусогенеза зависит от многих факторов эндогенной природы, а также условий культивирования. В настоящее время способность растений к каллусогенезу, в основном, рассматривается как свойство генотипа. Однако, несмотря на большое количество исследований по каллусогенезу *in vitro* многие вопросы этого уникального пути развития растений остаются нерешенными. В частности, малочисленны сведения о влиянии индивидуальных генов на проявление тотипотентности растительных клеток *in vitro*. В связи с этим актуальной задачей является выявление влияния конкретных генетических систем и индивидуальных генов на способность растительных эксплантов к культивированию. Известно, что продолжительность онтогенеза, а также тип развития растительного организма - эволюционно сформированный, наследственно закреплённый признак, который детерминируется и контролируется несколькими генетическими системами. У пшеницы мягкой это система генов *VRN* (vernalization), определяющая тип развития (яровой или озимый) и система генов *PPD* (photoperiod), детерминирующая степень чувствительности и/или нечувствительности к фотопериоду. У сои культурной в регуляции скорости развития ведущая роль принадлежит системе генов *EE* (early maturity genes), детерминирующих продолжительность периода до цветения и фотопериодическую чувствительность растений. В настоящее время данные генетические системы активно исследуются на молекулярно-генетическом уровне регуляции онтогенеза *in vivo*. Возможно, что эти генетические системы также участвуют в контроле процессов каллусогенеза при культивировании растений *in vitro*. Целью данной работы было исследование возможной роли генетических систем контроля темпов развития растений в детерминации индукции первичного каллусогенеза, а также ростовых процессов пересадочной каллусной культуры у изогенных линий пшеницы и сои. Материалом

исследований служили почти изогенные линии NILs озимой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. – по системе генов *VRN* и фотопериодической чувствительности *PPD*, а также полностью рецессивный по всем этим генам сорт Мироновская 808 и изолинии NILs по генам *EE*-серии сои культурной *Glycine max* (L.) Merr. сорта Clark, различающиеся по фотопериодической реакции – нейтральнодневные и короткодневные генотипы. При культивировании данных изолиний *in vivo* было установлено, что быстроразвивающимися линиями у пшеницы являются изолинии *VRN 1* и *VRN 3*, *PPD 1* и *PPD 3*; медленноразвивающимися, т.е. позже всех переходящими к колошению, являются изолинии *VRN 2*, *PPD 2* и растения сорта. Среди изолиний сои более продолжительным периодом до цветения характеризовались короткодневные изолинии, по сравнению с фотопериодически нейтральными. Для индукции первичного каллусогенеза в качестве эксплантов использовали различные органы проростков пшеницы и сои (первичный лист, корни, зрелые зародыши; гипокотили, семядоли, корни). Экспланты культивировали в чашках Петри на стандартной среде Мурасиге и Скуга (МС) с полным набором макро- и микросолей, витаминов, содержащей 2,4 Д (2 мг/л для пшеницы и 10 мг/л для сои), в термостате при 26°C. Результаты исследований показали, что все изученные генотипы формировали первичный каллус, но с различной частотой. В целом, изолинии сои значительно легче вводятся в культуру *in vitro* по сравнению с пшеницей. Среди генотипов пшеницы изолинии *VRN* (яровой тип развития) характеризовались более низкими показателями эффективности каллусогенеза в сравнении с изолиниями *PPD* (озимый тип развития). При исследовании данных генетических систем в условиях *in vitro* установлено, что медленноразвивающиеся изолинии независимо от типа выбранного экспланта эффективнее вводятся в культуру *in vitro* - характеризуются более высоким потенциалом первичного каллусогенеза, скоростью роста каллусных тканей, оводнёностью, накоплением сырой/сухой биомассы. Быстроразвивающиеся изолинии характеризовались более высокими показателями проявления разных форм морфогенного потенциала – геммогенеза, гемморизогенеза и соматического эмбриодогенеза. У сои показано, что изолинии с короткодневной фотопериодической реакцией характеризуются более быстрыми темпами первичного каллусогенеза и максимальными показателями ростового индекса (РИ), по сравнению с фотопериодически нейтральными линиями. Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что гены контроля темпов развития пшеницы *VRN*, *PPD* и *EE* сои, определяющие скорость развития растений в условиях *in vivo*, участвуют в детерминации процессов каллусогенеза *in vitro*.

## Влияние фотопериодической индукции на формирование плодов и семян сои культурной (*Glycine max* (L.) Merr.)

Influence of photoperiodic induction on the formation fruit and seeds of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)

Al-Hamadani Hayder Nabeel, Zhmurko V.V.

V.N. Karazin Kharkiv National University, 4, Svobody square, Kharkov, Ukraine  
*agroch1984@hotmail.com*

The duration of photoperiod is an important environmental factor, which determines distribution of plants in zones of growth, adaptability and productivity. Plants get photoperiodic signal in a certain length ratio of light and dark period of day, change nature of the internal regulatory processes, ensuring transition to flowering and fruiting at the most favorable conditions for this environment. Therefore, a sufficient amount of fruits and seeds is formed on a plant with high viability, which is one of the most important factors supporting species' existence. Reaction of cultivated plants for photoperiod duration is one of the most important agronomic traits, since it determines their prevalence in zones of cultivation, adaptability to environmental factors, productivity and crop quality.

As soybean refers to short-day and thermophilic plants so during expansion of its crops in regions with relatively long photoperiod and insufficiently high amount effective temperature, it retards development, whereby later flowering and ripening, resulting in loss of crops corn and reducing of its quality. One of problem's solutions of soybean crops expansion in different agro-climatic zones is to create varieties with low photoperiodic sensitivity and sufficiently high level of productivity and quality of grain. From this point of view very important issue is the question of soybean varieties identification and lowered photoperiodic sensitivity and effect of day length on formation of fruits and seeds and their quality at this crucial food, feed and industrial crop.

There are available data in literature only on effect of varying lengths of photoperiod on yield and its structure in different soybean varieties.

The goal of our research was to determine extent of soybean varieties reaction on photoperiod and its influence on formation dynamics of fruits and seeds, crop structure and content in seeds of carbohydrates as the most important compounds that provide with plastic and energy material forming seedling.

Field experiments were conducted at experimental site of plant physiology and biochemistry of microorganisms department of V.N. Karazin Kharkiv National University. In the experiments Ukrainian selection soybean varieties were used of - Ustia, Annushka, Yatranand Hadzhibey. Plants were grown under optimum terms of sowing (2<sup>nd</sup> decade of May) on 1m<sup>2</sup> plots in triplicate for each variant of the experiment.

In phase of 3 true leaves of each plant's variety part was influenced by photoperiodic induction by short (9-hour day) for 14 days. It was created by darkening plants with opaque cabins from 18 to 9 hours. The second part of plants were grown for the whole experience in a natural long day (16 hours at a latitude of Kharkov, 50<sup>o</sup> of N.L.). In experiments fenotyping was conducted - period of transition to flowering

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

and maturation was determined, dynamics of fruits and seeds' formation, yield structure elements, content of sugar and starch in seeds.

The results showed that varieties Ustia, Anushka and Yatran were photoperiodic neutral, as their bloom and fruit ripening occurred at the same time as in long and so in short photoperiod. Variety Hadzhibey was short-day, as in it's short day flowering occurred for 11 days, and ripening for 16 days than on a long day.

Determining of plants structure and individual productivity showed that under influence of short photoperiod in all varieties decreased plant height and number of leaves in main shoot. These changes were less expressed in neutral varieties. The number of beans on plant, number of grains and grain mass per plant under influence of short photoperiod was decreased in photoperiodic neutral varieties Ustia and Annushka and short-day varieties Hadzhibey, while in neutral varieties Yatran these indicators on a short day were higher than long bottom.

Studying formation dynamics of fruits and seeds showed that all varieties under short photoperiod it occurred more rapidly than in conditions of long photoperiod. The biggest differences were in short-day varieties whose seed formation on short day began 20 days earlier than in natural long day.

Induction by short photoperiod led to an increase in content of oligosaccharides in seeds of all tested varieties, to increase starch content in seeds of varieties of neutral, but did not change it in the short-day varieties of seeds.

Thus, among studied varieties of soybeans are allocated photoperiodic neutral and short-day. The formation of fruits and seeds, as well as their quality is dependent on photoperiodic control. One possible mechanisms of its use can be increased in terms of products' assimilation into short photoperiod for process of fruits and seeds formation.



## Рецепция цитокининов в различных группах растений Cytokinin perception in different plant groups

Ломин С.Н., Мякушина Ю.А., Архипов Д.В., Романов Г.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук, 127276, ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия

+7 499 977-94-09, +7 499 977-80-18, losn1@yandex.ru

Цитокинины являются производными аденина, в котором аминокетильная группа в шестом положении замещена различными радикалами. Эти фитогормоны стимулируют деление, рост и дифференцировку растительных клеток. Цитокинины связываются с мембранными рецепторами, вызывая каскад передачи сигнала, приводящего к активации регуляторов ответа – транскрипционных факторов. Роль рецепторов цитокининов выполняют сенсорные гистидинкиназы, которые имеют сложную мультидоменную структуру. Гормонсвязывающей активностью обладает сенсорный модуль, расположенный на N-конце молекулы рецептора. С двух сторон от сенсорного модуля находятся трансмембранные домены. В центральной части белка располагается домен с гистидинкиназной активностью, содержащий остаток консервативного гистидина, способный акцептировать фосфат от АТФ. На C-конце белка находится ресиверный домен, содержащий остаток консервативного аспартата, способного акцептировать фосфат с фосфогистидина.

На данный момент секвенированы геномы нескольких десятков видов растений. В основной своей массе они принадлежат к группе цветковых растений. Но помимо этого есть информация по трем представителям мохообразных (*Physcomitrella patens*, *Sphagnum phallax*, *Marchantia polymorpha*), одному представителю плауновидных (*Selaginella moellendorffii*), двум голосеменным (*Picea abies*, *Pinus taeda*). У всех изученных растений обнаружено несколько рецепторов цитокининов. Наилучшим образом рецепция изучена у цветковых растений. У *Arabidopsis thaliana* имеется три рецептора цитокинина: АНК2, 3 и 4. При этом физиологическая роль этих рецепторов не идентична. АНК4 доминирует в корне, а АНК2 и 3 – в побеге. Различна и лигандная специфичность рецепторов. АНК4 предпочитает изопентениладенин, а АНК2 и 3 – *транс*-зеатин. Филогенетически рецепторы цветковых растений подразделяются на три группы, соответствующие ортологам арабидопсиса. Исследование свойств рецепторов картофеля, кукурузы, риса показало, что они близки таковым рецепторам арабидопсиса. При этом, как и следовало ожидать, рецепторы картофеля ближе к арабидопсису, чем кукурузе и рису. У представителей злаков имеется два ортолога АНК4, один из которых (*ZmHK1*) является строгим изопентениладениновым рецептором. Помимо этого, данный рецептор связывает *транс*- и *цис*-зеатин с одинаковым сродством, что нехарактерно для изученных рецепторов двудольных растений.

Подобное разделение среди рецепторов играет важную роль в жизнедеятельности растений. Однако эволюционно оно возникло довольно

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

поздно. И самым филогенетически древним представителем с подобной структурой является базовый вид цветковых растений, занимающий сестринское положение ко всем остальным, *Amborella trichopoda*. Рецепторы хвойных образуют собственную группу в основании эволюционного древа рецепторов цветковых растений. Соответственно, подобное подразделение свойств и функций характерно не для семенных, а именно для цветковых растений.

У цветковых растений изопентенилтрансферазы, ферменты, осуществляющие первый этап в синтезе цитокининов, представлены двумя группами ферментов: тРНК-изопентенилтрансферазами и АДФ/АТФ-изопентенилтрансферазами. При этом собственно в синтезе цитокининов принимают участие только АДФ/АТФ-изопентенилтрансферазы, а тРНК-изопентенилтрансферазы ответственны за модификацию тРНК и синтез *цис*-зеатина. У представителей мохообразных и плауновидных генов АДФ/АТФ-изопентенилтрансфераз нет. Нет у них и ортологов генов, ответственных за синтез *транс*-зеатина. Хотя сам *транс*-зеатин имеется у *Physcomitrella patens*, но его количество существенно меньше изопентениладенина и *цис*-зеатина. Про представителей голосеменных определенно сказать пока не представляется возможным ввиду неполноты информации, имеющейся в данный момент. Тем самым, за пределами цветковых растений беднее и спектр лигандов.

Что касается трансдукции сигнала цитокинина, нужно отметить, что она на базовом уровне сходна у всех растений, но у цветковых каждый ее этап представлен большим числом белков. Кроме того, только для цветковых растений характерно наличие псевдофосфотрансмиттеров, осуществляющих выключение цитокининового сигналинга в отдельных тканях растения. Следовательно, помимо увеличения количества участвующих белков, цветковые растения имеют дополнительные уровни регуляции сигналинга.

Таким образом, сигналинг цитокининов у цветковых организован наиболее сложным образом среди растений. Тем не менее, это не является следствием появления революционно новых качеств. Многие особенности жизнедеятельности, контролируемые цитокининами у цветковых растений сложным способом, имеются, по крайней мере, уже у хвойных. Наша дальнейшая работа направлена на продолжение исследований особенностей организации сигналинга цитокининов у растений, в том числе за пределами группы цветковых.

Работа поддержана грантами Российского научного фонда, проекты №№ 14-04-01714 и 16-04-01502.

Мутация *si* - «стерильная кисть» культивируемой люцерны как эпизод отклонения в *ABC-модели* генетического контроля развития органов цветка

«Sterile inflorescence» mutation *si* of cultivated alfalfa as an episode of ABC-model of genetic control of flower organs development deviation

Дзюбенко Е.А., Дзюбенко Н.И.

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, 190000, ул.Большая Морская д.42

*n.dzyubenko @vir.nw.ru*

Для решения задач современной генетики развития растений важно аккумулировать фактический материал реакции фенотипа на взаимодействие генов, отвечающих за регуляцию развития апикальных меристем побега и флоральных меристем у представителей разных таксонов. Существенные данные о механизмах действия генов семейства MADS-BOX собраны для семейства *FABACEAE*. На основании синтении геномов возможна экстраполяция данных о вовлечённости генов в формирование мутаций по морфологическим признакам у модельных объектов семейства бобовых, в частности *Lotus japonicas* и *Medicago truncatula*., на другие представители семейства, в частности культивируемую люцерну.

В ВИРе создавалась генетическая коллекция люцерны посевной *Medicago sativa* L. и люцерны изменчивой *Medicago varia* Mart. Для культивируемой люцерны описано 65 различных мутаций, имеющих фенотипическое проявление, из них 30 были получены и идентифицированы нами, в том числе 12 получено впервые. Наиболее значимы для селекционных целей формы с детерминированным ростом (*ti*-мутанты) и заблокированным ветвлением (*nbr – non-branched*) мутанты, меняющие архитектуру растения и достоверно повышающие семенную продуктивность. Другие мутации значимы для расширения представлений о генетике развития растений семейства бобовых. Все мутантные формы были выделены в поколениях потомств от искусственного самоопыления (S-1) при большой выборке семян (не менее 100 потомков на растение) на питомниках изучения на Приаральской опытной станции ВИР в индивидуальном стоянии растений. Так, растения с мутацией «длинная кисть» (*lp-long petiole*) получены в S-1 люцерны изменчивой сорта *Vela*. На цветоносах длиной до 28 см (норма 1-6) формировалось 60-100 цветков и завязывалось от 30 до 70 бобов на кисть. При глубоком инбридинге в одном из потомств растений с мутацией «длинная кисть» (*lp*) впервые выщепились формы с редуцированным околоцветником и множественными органами цветка. Длина цветочной кисти при этом соответствовала норме. Цветки аномального строения на растении обладали бело-зеленоватой окраской. Мутация получила название *si* (*sterile inflorescence*) – «стерильная кисть». Растения со стерильными цветками не образовывали семян. В связи с полной стерильностью наследование признака изучалось в скрещиваниях сестринских растений мутанта с нормальными растениями потомств. Анализ

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

расщепления потомств F2, F3, S1, S2 показал, что признак контролируется единичным тетрасомным геном *si*, находящимся в нуллиплексном состоянии. Для цитоэмбриологического изучения стерильные кисти были зафиксированы фиксатором Карнуа в соответствии с общепринятыми цитоэмбриологическими методиками, промыты в серии спиртов и оставлены на хранение в спиртовом растворе. При изучении строения цветка (световая микроскопия) наблюдаются расположенные в кругах множественные лепестковидные тычинки и множественные несомкнутые плодолистки, в открытой завязи которых располагаются недифференцированные бугорки семяпочек. Характерно отсутствие срастания плодолистиков. Центральная тычиночно-пестичная колонка отсутствует. На некоторых лепестковидных тычинках присутствуют пыльники, стенки пыльников сформированы нормально. В выполненных пыльниках содержатся микроспороциты в ранней стадии дифференциации. Большая часть элементов цветка представлена лепестковидными узкими структурами, карпеллоидными тычинками. Цветоложе цветка разросшееся, лепестки отсутствуют. Строение цветка данного мутанта люцерны актиноморфно, фактически мутация приводит к появлению махровости, множественности повторения элементов андроеца и гинецея в кругах. Цветок фенотипически имеет черты сходства с двойным мутантом *Arabidopsis thaliana*, где мутации в генах *APETALA1* (*AP1*) и *APETALA2* (*AP2*) приводят к образованию уродливых плодолистиков вместо чашелистиков и тычинок вместо лепестков. Данная мутация у резуховидки Таля возникает в результате нарушения гомеозисной функции А, обуславливающей активность генов *AP1* и *AP2* в соответствии с принятой в настоящее время генетической моделью *ABC* развития цветка. Предположительно механизм формирования/отсутствия органов в аномальных цветках у мутации люцерны изменчивой «стерильная кисть» (*si*) также связан с нарушением функции А в модели *ABC* генетического контроля формирования органов цветка.

## Гормональная регуляция продуктивности клеточной культуры *Atragene speciosa* Weinm. *in vitro*

Hormonal regulation of *Atragene speciosa* Weinm. cell culture productivity *in vitro*

Дорофеев В.Ю., Медведева Ю.В., Карначук Р.А.

Томский государственный университет, пр. Ленина, 36, Томск, Россия

+7 3822 529765, dorofeev.v2012@yandex.ru

В фармакологическом производстве лекарственных веществ часто используются биотехнологические методы для получения ценных метаболитов лекарственных растений, ввиду того, что природные источники сырья малочисленны, имеют ограниченные ареалы, а биологическая особенность вида не позволяет успешно его интродуцировать. К таким редким и ценным лекарственным растениям относится княжик сибирский (*Atragene speciosa* Weinm.) сем. Ranunculaceae. Растение издавна используется в традиционной тибетской медицине для лечения широкого спектра заболеваний. Это обусловило интерес к изучению состава фармакологически активных веществ этого растения. Получена фармакологически активная фракция, в которую входят фенолоспирты, сапонины и флавоноиды.

Впервые на кафедре физиологии растений и биотехнологии под руководством проф. Р.А. Карначук была получена клеточная культура княжика сибирского *in vitro*. Показано, что состав биологически активных соединений культуры *in vitro* соответствует таковым в интактном растении. Разработаны оптимальные условия для индукции каллусообразования и культивирования культуры княжика сибирского.

Известно, что для масштабирования процесса культивирования в промышленности используют суспензионные культуры растений. При таком периодическом глубинном культивировании растительных клеток происходит интенсификация ростовых процессов и в ряде случаев увеличивается биосинтетический потенциал.

Ранее получено несколько линий каллусной культуры княжика сибирского *in vitro*, которые отличались морфологией, жизнеспособностью, ростовой активностью, а также содержанием фенолоспиртов. Наиболее продуктивные линии накапливали в несколько раз больше фенолоспиртов, чем интактные растения, и являлись источником для получения суспензионной культуры *Atragene speciosa* Weinm. *in vitro*.

Суспензионную культуру княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.), выращивали в питательной среде по прописи Мурасиге - Скуга с добавлением гормонов 2,4-Д и 6-БАП в течение 20 суток в условиях освещения красным и синим светом и темноте в стеклянных колбах Эрленмейера 100 мл на орбитальных шейкерах BioSan OS-10 при 120 об./мин. Анализ содержания физиологически активных веществ проводили спектрофотометрическим методом с использованием двулучевого сканирующего спектрофотометра Shimadzu UV-1650. Статистическая обработка данных проводилась с помощью электронных таблиц Excel.

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

Важным этапом при культивировании клеточных культур является оптимизация продукционного процесса добавлением в питательную среду физиологически активных соединений, в том числе, гормонов.

Проведены исследования по влиянию 24-эпибрассинолида на рост клеток в каллусной и суспензионной культурах. 24-Эпибрассинолид в концентрации  $10^{-9}$  М стимулировал прирост как каллусной, так и суспензионной культуры клеток. При добавлении 24-эпибрассинолида в концентрации  $10^{-6}$  М наблюдали максимальное содержание флавоноидов (5,15%) в каллусной культуре клеток со второго по шестое субкультивирования, сопоставимое с их количеством в листьях интактного растения. 24-Эпибрассинолид в концентрации  $10^{-8}$  М стимулировал образование высокополярных тритерпеновых сапонинов в суспензионной культуре десятого субкультивирования.

Результаты исследований являются перспективными в использовании 24-эпибрассинолида в качестве регулятора продуктивности суспензионной культуры *Atragene speciosa* Weinm. в опытно-промышленном культивировании для получения максимального выхода физиологически активных веществ с целью создания фитопрепарата с адаптогенным и ноотропным действием.

## Гормональная регуляция прорастания и роста мужского гаметофита в прогамной фазе оплодотворения: взаимодействие сигналинга этилена и ИУК

Hormonal regulation of male gametophyte germination and growth in progamic phase of fertilization: interactions of ethylene and IAA signaling

Ковалева Л.В.<sup>1</sup>, Воронков А.С.<sup>1</sup>, Захарова Е.В.<sup>2</sup>, Тимофеева Г.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН Ботаническая 35 Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева, Тимирязевская 49, Москва, Россия

Этилен участвует в регуляции репродуктивного процесса растений, от закладки цветочных почек до созревания плодов. Результаты исследований, проведенных на орхидее, гвоздике, табаке и петунии, дали основание полагать, что индуцированное опылением образование и выделение этилена тканями пестика является фактором, необходимым для прорастания пыльцевых зерен, роста пыльцевых трубок и успешного оплодотворения. Взаимодействия мужского гаметофита петунии со спорофитными тканями рыльца и столбика в прогамной фазе оплодотворения сопряжены со значительным ростом содержания предшественника этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) и образования этилена в пестике (Ковалева и др., 2009, 2011). Ключевым механизмом контроля образования этилена в растениях, по-видимому, является регуляция транскрипции генов АЦК-синтазы. В настоящее время развиваются представления об АЦК, как сигнальной молекуле в процессах роста и развития растений и как точке пересечения сигнальных путей биосинтеза этилена с другими сигнальными путями. Ауксин входит в большую группу внутренних и внешних сигналов, модулирующих биосинтез этилена и действующих на уровне экспрессии генов АЦК-синтазы.

Эффекты фармакологической модуляции прорастания пыльцевых зерен, роста пыльцевых трубок и синтеза АЦК исследовали на прорастающем *in vitro* мужском гаметофите и системе пыльца-рыльце петунии (*Petunia hybrida* L.) с использованием фитогормонов (этилена и ИУК), ингибиторов действия этилена 1-метилциклопропена (1-МСП), синтеза АЦК аминоксиуксусной кислоты (АОК) и транспорта ИУК триодбензойной кислоты (ТИБК). Установлено, что 1-МСП и ТИБК ингибировали прорастание 100% пыльцевых зерен, тогда как АОК снижала прорастание и рост пыльцевых трубок на 50-60%. ИУК снимала ингибиторный эффект 1-МСП и АОК на прорастание пыльцевых зерен и рост пыльцевых трубок, при этом длина трубок почти достигала уровня длины контрольных трубок. Этрел частично снимал ингибиторный эффект ТИБК на прорастание пыльцевых зерен.

Результаты фармакологической модуляции синтеза АЦК показали, что экзогенная ИУК не влияла на уровень содержания АЦК в прорастающем *in vitro* мужском гаметофите и неопыленных рыльцах, но влияла на ее уровень в системе пыльца-рыльце. Влияние ИУК на синтез АЦК в системе пыльца-рыльце мы исследовали на опыленных рыльцах, предварительно перед

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

опылением обработанных: ИУК, АОК, АОК+ИУК. Обработка рылец перед опылением ИУК влияла на динамику содержания АЦК в системе пыльца-рыльце, а именно ИУК незначительно повышала уровень АЦК и полностью снимала ингибиторное действие АОК на содержание АЦК при совместной обработке. ИУК полностью восстанавливала уровень АЦК и рост пыльцевых трубок до значения контрольных трубок при снятии ингибиторного действия 1-МСП на синтез АЦК в системе пыльца-рыльце (опыление проводили пылью, предварительно обработанной 1-МСП).

Таким образом, этилен и ИУК участвуют в регуляции прорастания и роста мужского гаметофита петунии в прогамной фазе оплодотворения. Прорастание пыльцевых зерен и рост пыльцевых трубок в разной степени чувствительны к действию экзогенных этилена и ИУК, а полное или частичное нарушение функционирования любого из этих гормонов ингибиторами их действия, транспорта или синтеза приводит к полному или частичному торможению их прорастания и роста. Результаты фармакологической модуляции динамики содержания АЦК в прорастающем *in vitro* и *in vivo* мужском гаметофите дают основание полагать, что АЦК мужского гаметофита может быть сигнальной молекулой в гормональной регуляции прогамной фазы оплодотворения и выступать в качестве индуктора АЦК-синтазы в системе пыльца-пестик. Полагаем, что АЦК пыльцы превращается АЦК-оксидазой рыльца до этилена, который, индуцируя экспрессию генов АЦК-синтазы, запускает автокаталитический синтез этилена.



## Реакция фитогормонов и фотохимической активности хлоропластов растений картофеля на деструкцию актинового цитоскелета

The reaction of phytohormones and photochemical activity of chloroplasts of potato plants on the destruction of the actin cytoskeleton

Ланцев В.Л., Пузина Т.И.

ФГБОУ ВО "Орловский государственный университет имени И.С.

Тургенева", 302026, ул. Комсомольская, д. 95, г. Орел, Россия

+7 4862 77-78-18, vic\_lan@mail.ru

Взаимодействие элементов цитоскелета с гормональной системой растений до сих пор остается малоизученным. Отсутствуют сведения о зависимости гормонального статуса от целостности микрофиламентов и микротрубочек. Имеются лишь указания на участие актинового цитоскелета в транспорте рецепторов ауксинов. Известно, что фитогормоны во многом определяют ход и направленность мембранных процессов. Элементы цитоскелета взаимодействуют не только друг с другом через ассоциированные белки, но и с мембранами. Однако, несмотря на признание существования цитоскелет - мембранного комплекса, сведения об участии элементов цитоскелета в регуляции мембранных процессов остаются единичными. Поэтому целью данной работы было выявить участие микрофиламентов в формировании гормонального статуса *Solanum tuberosum*, а именно, содержание цитокининов и абсцизовой кислоты, а также определить фотохимическую активность изолированных хлоропластов. Исследования проводили на растениях картофеля сорта Удача, выращенных в почвенной культуре. Обработку растений 0,1 мМ раствором цитохалазина Б (Sigma, США) - специфического ингибитора полимеризации актинового цитоскелета проводили путем опрыскивания через 15 суток после появления всходов, а также раствором цитохалазина Б совместно с  $5,71 \cdot 10^{-5}$  М раствором индолилуксусной кислоты (Serva, Германия). Контрольные растения обрабатывали водой. Содержание цитокининов (зеатина) и абсцизовой кислоты определяли в листьях седьмого яруса методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием реактивов фирмы "Уралинвест" (Уфа, Россия). Фотохимическую активность изолированных хлоропластов определяли по восстановлению феррицианида калия. Выявлено, что деструкция актиновых микрофиламентов уменьшила содержание зеатина, однако повысило уровень абсцизовой кислоты. В этих условиях добавление индолилуксусной кислоты (в варианте цитохалазин Б + ИУК) существенным образом уменьшило количество абсцизовой кислоты. Нарушение актинового цитоскелета вызывало значительное усиление начальных этапов фотосинтеза, а именно, фотохимической активности изолированных хлоропластов. Возможно, этот эффект связан с увеличением уровня абсцизовой кислоты в данном варианте опыта. Вместе с тем, наши предыдущие данные показали, что цитохалазин Б подавлял процесс фотосинтетического фосфорилирования. Экзогенная индолилуксусная кислота при деструкции микрофиламентов практически полностью снимала

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

стимулирующий эффект цитохалазина Б на фотохимическую активность хлоропластов. Это наблюдалось на фоне снижения уровня абсцизовой кислоты. Таким образом, структурированность актинового цитоскелета оказывает воздействие на содержание цитокининов и абсцизовой кислоты и транспорт электронов, сопряженный с нециклическим фотофосфорилированием.

### Влияние препарата эпин-экстра на холодоустойчивость растений сорго веничного

Influence of preparation Epin-ekstra on cold resistance of plants *Sorghum technicus* Moench.

Луговская А.А., Кучер Е.Н., Чмелева С.И.

Крымский Федеральный Университет имени В.И. Вернадского, Проспект Вернадского, 4, г. Симферополь, Республика Крым, Российская Федерация

[tsvet-ann@mail.ru](mailto:tsvet-ann@mail.ru)

Одним из экономически выгодных и безопасных для окружающей среды материалов для изготовления изделий хозяйственного назначения, является сорго веничное. Основные его преимущества - это высокая продуктивность, стабильность урожая по годам, хорошие кормовые достоинства и универсальность использования. Сорго отличается высокой устойчивостью к влиянию неблагоприятных факторов среды, таких как воздушная и почвенная засуха, засоление почв; однако, растения страдают от воздействия низких положительных температур.

Особенностью земледелия Крыма являются часто повторяющиеся в период начала вегетации растений холода. В качестве современного способа поддержать и активизировать жизненные процессы в испытывающих стресс растениях используются стимуляторы роста и развития. Одним из таких адаптогенных препаратов является Эпин – экстра, действующим веществом в котором служит эпибрасинолид. Препарат практически не опасен для человека, теплокровных животных, рыб, пчел, не загрязняет окружающую среду.

Целью проведенного нами исследования было изучение особенностей влияния Эпин-экстра на холодоустойчивость сорго веничного на ранних этапах онтогенеза. Применяли предпосевную обработку семян сорго веничного сорта Любимое – 80 (*Sorghum technicus* Moench. CV 'Любимое – 80') в течение 4 часов растворами препарата в концентрациях: 0,05; 0,038; 0,025; 0,0125; 0,009 и 0,006 мг/л. Семена проращивали в термостате типа ТС-80М-2 в темноте при температуре +25°C (ГОСТ 12038-84). Исследуемые растения выращивали на питательной среде Кнопа в вегетационных сосудах емкостью 0,5 л при естественном освещении и температуре +22-+24°C в течение 5 суток. На 6-е сутки они были помещены на 20 часов в холодильную камеру (t=+4°C). Затем возвращены в нормальные условия и выращивались еще в течение 8 суток в водной культуре.

В ходе исследований было установлено, что результатом действия низкой положительной температуры на растения в контроле 2 стало снижение величины параметров роста по сравнению с контрольными, выращенными при оптимальной температуре (контроль 1). Так, высота надземной части растений в неблагоприятных условиях меньше, чем в контроле 1 на 19,4%, длина корневой системы – на 26,3 %, площадь листовой поверхности – на 23,3%, масса сырого вещества – на 22,2%, а масса сырого вещества – на 25,0%.

Использование препарата Эпин-экстра привело к увеличению значений морфометрических показателей растений сорго веничного на ранних этапах онтогенеза в условиях температурного стресса ( $t=+4^{\circ}\text{C}$ ). Наиболее выраженный стимулирующий эффект при различных температурных режимах выращивания оказывает концентрация раствора регулятора роста, равная 0,025 мг/л. При предпосевной обработке семян регулятором роста в этой концентрации длина корневой системы растений в условиях холодого стресса превышала величину параметра в контроле 2 на 20%, высота побега – на 18,1%, площадь листовой поверхности – на 14,1%, масса сырого вещества – на 13,1 %, а масса сухого вещества – на 9,8 %.

Полученные результаты подтвердили перспективность использования препарата Эпин-экстра для предпосевной обработки семян с целью повышения стрессоустойчивости растений.

## Фото- и диагравитропизм столонов и корневищ:

### физиологические и молекулярные аспекты

#### Photo- and diagravotropism of stolon and rhizome: physiological and molecular aspects

Маслова С.П., Головки Т.К.

ФГБУН Институт биологии Коми НЦ УрО РАН

ул. Коммунистическая, 28, Сыктывкар, Россия

*maslova@ib.komisc.ru*

В физиологии растений исследования по тропизмам имеют давнюю историю, сформированы классические представления по механизмам ростовых движений органов побеговой природы – гипокотили, эпикотили (Went, 1932; Холодный, 1939; Wilkins, 1979; Полевой, 1986; Hensel, 1986; Evans, 1992; Leopold, 1992; Trewavas, 1992; Медведев, 1996; Chen et al., 1999 и др.). В современной науке достигнут значительный прогресс в изучении механизмов фототропизма и гравитропизма, показано участие различных фоторецепторов и их взаимодействия в регуляции этих процессов, выявлена роль фитохромов в гравитропизме и фототропизме побегов и корней *Arabidopsis thaliana* (Smith, 1995; 2000; Ruppel et al., 2001; Lariguet et al., 2003, 2006; Kiss et al., 2003; Kumar et al., 2008; Hopkins, Kiss, 2012; Liscum et al., 2014). Известно, что эпикотиль, гипокотиль проявляют положительный фототропизм и отрицательный гравитропизм. Однако существуют исключения – диагравитропные побеги – корневища, столоны, усы, плети, которые продолжительное время растут в горизонтальном положении под или на поверхности почвы, не проявляя фото- или гравитропических реакций. Диагравитропизм клеток, органов и организма в целом является одним из древнейших механизмов ростовых ориентаций, возникшей в результате адаптивной эволюции растений при выходе на сушу. Диагравитропизм встречается у водорослей из отдела Chlorophyta (*Fritschiella tuberosa*, *Caulerpa prolifera*), ископаемых риниофитов (*Rhynia major*, *Horneophyton*), плауновидных (*Asteroxylon*), хвощей и папоротников, представителей современных споровых и цветковых сосудистых растений. В апикальной части диагравитропного корневища функционируют два физиологических механизма – поддержание подземного диагравитропного роста и формирование отрицательно гравитропного побега (Маркаров, 1996). Гетерогравитропность подземных почек является уникальным биологическим свойством, которое сформировалось и закрепились на этапах филогенетической трансформации жизненных форм растений.

Долгое время науке ничего не было известно о физиологических механизмах ростовых ориентаций корневищ и столонов (Уоринг, Филлипс, 1984; Cline, 1991). Впервые получены результаты по влиянию света на морфогенез корневищ и столонов, доказано, что ориентация роста подземных побегов контролируется фитохромной системой (Маркаров, 1994; Маркаров, Головки, 1995). Установлено, что фитохром в форме красного обуславливает поддержание горизонтального роста корневищ и столонов под поверхностью почвы, а фитохром в форме дальнего красного препятствует выходу верхушки

побегов на поверхность почвы. Регуляторные функции фитохрома реализуются в зависимости от процессов органобразования конуса нарастания подземного побега. Фотофобный период развития подземного побега характеризуется образованием метамеров с чешуевидными листьями, диагравитропизмом, отрицательным фототропизмом. В фотофильный период происходит образование зеленых развитых листьев, побеги проявляют положительный фототропизм. Доказано, что процессы перестройки механизма диагравитропизма в отрицательный гравитропизм в верхушках корневищ осенью осуществляются на фоне изменения гормонального и углеводного баланса (Маслова и др., 2007; Маслова и др., 2013). Выявлено возрастание соотношений гиббереллины/АБК и цитокинины/АБК, растворимых углеводов (олигосахаридов), что способствует росту и дифференциации клеток и тканей в подземных почках в период перестройки механизма диагравитропизма в отрицательный гравитропизм в результате чего на будущий год формируются надземные ассимилирующие побеги.

Полагаем, что дальнейшего углубленного исследования требуют вопросы по механизмам регуляции морфогенеза и ростовых ориентаций (фото- и диагравитропизма) подземных побегов, выявлению гормонально-трофической и фитохромной регуляции роста и развития столонов и корневищ. Практически ничего не известно об экспрессии генов и белков, участвующих в регуляции деятельности подземных меристем, контролирующей фотофобный и фотофильный этап органогенеза верхушечной почки подземного побега. Единичны сведения о молекулярных механизмах регуляции морфогенеза диагравитропных побегов. Молекулярно-генетические исследования латеральных подземных меристем многолетних злаков свидетельствуют о полиморфизме экспрессии генов, вовлеченных в гравитропический ответ подземных почек в зависимости от направления их роста, проявляющих отрицательный гравитропизм (дерновинные травы) и диагравитропизм (корневищные травы) (Kaur et al., 2008). Исследована экспрессия генов и белков, участвующих в регуляции деятельности подземных меристем (Ruifeng et al., 2012). Доказано присутствие в верхушке гетеротрофных тканей корневища фотосинтетических генов (белков фотосистемы I и II, хлорофилла *a*, апопротеина A1 и фототропина-2), экспрессия которых может происходить на фотофильном этапе морфогенеза подземных почек под действием света. Полагаем, что дальнейшие исследования связаны с изучением структурно-функциональной организации апикальных меристем подземных побегов в период фотофобного и фотофильного этапа органогенеза, исследованием экспрессии генов и белков фитохромной системы, контролирующей фотоморфогенез подземных побегов. Полученные результаты могут быть новым вкладом в физиологию тропизмов органов побеговой природы и, в целом, в изучение регуляции роста и развития диатропных побегов – корневищ и столонов.

Специфика действия селена и кофейной кислоты на гормональный статус *Solanum tuberosum* в зависимости от структурного состояния микротрубочек

Specifics of the action of selenium and caffeic acid on the hormonal status of *Solanum tuberosum* depending on the structural condition of microtubules

Пузина Т.И., Макеева И.Ю., Власова Н.С.

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С.Тургенева», ул. Комсомольская, 95, г. Орел, Россия

+7 4862 777818, [tipuzina@gmail.com](mailto:tipuzina@gmail.com)

Изучение взаимосвязи гормональной системы растения и цитоскелета представляет интерес, прежде всего, в связи с регуляцией ростовых процессов. При этом основное внимание исследователи уделяют действию фитогормонов на ориентацию и стабилизацию элементов цитоскелета, экспрессию цитоскелетных генов. Однако не изучено влияние цитоскелета на содержание и активность фитогормонов. Отсутствуют сведения о действии антиоксидантов на гормональный статус в зависимости от целостности цитоскелета. Часто при изучении физиолого-биохимической роли цитоскелета используют фармакологический подход, применяя деструктурирующие агенты или стабилизаторы микротрубочек и микрофиламентов. Целью данной работы было выявление особенностей действия антиоксидантов селена и кофейной кислоты на содержание фитогормонов в условиях деструкции микротрубочек под влиянием колхицина. Объектом исследования служили растения картофеля сорта Удача, выращенные в почвенной культуре в условиях вегетационного домика. Деструкцию микротрубочек проводили 1 мМ раствором колхицина («Fluka», Швейцария). Растения обрабатывали путем опрыскивания растворами колхицина, 0.1 мМ кофейной кислоты («Sigma», США),  $5.8 \cdot 10^{-3}$  мМ  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  и совместными растворами колхицина с кофейной кислотой и с селенитом натрия через 15 суток после появления всходов. Содержание индолиоуксусной кислоты, зеатина, АБК определяли в листьях срединной формации методом твердофазного иммуноферментного анализа, содержание гибберелловой кислоты – методом биотестирования с последующим пересчетом по калибровочной кривой, построенной по  $\text{GA}_3$  («Phylaxia», Венгрия). Показано, что деполимеризация микротрубочек значительно снизила содержание зеатина (в 10 раз), а также индолиоуксусной кислоты, однако не изменила уровень гиббереллинов, тогда как количество абсцизовой кислоты возросло на 45%. Обогащение растений селеном способствовало накоплению в листьях ауксинов, гиббереллинов, в то время как уровень зеатина и гибберелловой кислоты снизился. В условиях деполимеризированных микротрубочек селен снимал негативное действие колхицина на содержание гиббереллинов, ауксинов и зеатина и существенно уменьшил уровень АБК. Обработка колхицином уменьшила соотношение ауксины/АБК, зеатин/АБК и практически не изменила отношение  $\text{GA}_3$  к АБК.

Кофейная кислота в условиях целостных микротрубочек способствовала накоплению ауксинов (увеличение составило 40%). При нарушении их целостности кофейная кислота не только сняла отрицательный эффект колхицина, но и повысила их количество до уровня контрольного варианта. Можно заключить, что структурное состояние тубулинового цитоскелета влияет на гормональный статус растения. Антиоксидант селен, увеличивая количество ауксинов и гиббереллинов, снижал количество зеатина и АБК. Кофейная кислота способствовала накоплению ауксинов, не меняя уровень гиббереллинов. В условиях фармакологического стресса, вызванного колхицином, селен снимал отрицательный эффект деструкции микротрубочек на уровень зеатина, ауксинов и ГА<sub>3</sub>, уменьшил накопление ингибитора роста – абсцизовой кислоты. Кофейная кислота также способствовала подавлению отрицательного действия колхицина на уровень ауксинов.

### Полиморфизм белков DELLA у различающихся по высоте сортов груши (*Pyrus communis* L.)

Polymorphism of DELLA proteins in pear cultivars (*Pyrus communis* L.) with different plant height

Рябова Д.Н.<sup>1</sup>, Билова Т.Е.<sup>2</sup>, Анисимова И.Н.<sup>1</sup>, Бондурко И.А.<sup>1</sup>,  
Бурмистров Л.А.<sup>1</sup>, Радченко Е.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений

имени Н.И. Вавилова; ул. Большая Морская, д. 42, 44, Санкт-Петербург, 190000, Россия

+7 812 476 63 36, [rdash@mail.ru](mailto:rdash@mail.ru)

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет; Университетская наб. д.7-9, 199034 Санкт-Петербург, Россия

+7 812 328-96-95, [bilova.tatiana@gmail.com](mailto:bilova.tatiana@gmail.com)

Белки DELLA — небольшое подсемейство белков, относящихся к семейству GRAS. DELLA-белки являются ключевыми репрессорами гиббереллинового ответа и важнейшими регуляторами роста и развития растений. Деградация этих белков снимает их ингибирующее влияние, благодаря чему происходит запуск экспрессии ГА-регулируемых генов, продукты которых служат сигналами к ГА-индуцированному росту растения и к другим ГА-зависимым ответам, таким как прорастание семян, цветение. Мутации в генах, кодирующих белки DELLA, могут нарушать их взаимодействия с другими компонентами гиббереллинового сигналинга и приводить к изменениям роста растений - карликовости или гигантизму. За связывание с участниками ГА-сигналинга отвечают различные участки белка: высококонсервативные домены DELLA, TVHYNP, pS/T/V на N-концевой части молекулы, а также LR, VHIID, PFYRE и SAW на C-конце. Нарушения структуры в этих сайтах связывания могут приводить к разным по высоте фенотипам растений.

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

Создание карликовых форм относится к числу перспективных направлений селекции плодовых культур. Генетический контроль карликовости у груши изучен слабо. Молекулярные механизмы этого явления не известны. С целью выявления связей между структурой и DELLA белков и фенотипом растений были изучены различающиеся по высоте сорта груши из коллекции ВИР – слаборослые Жак Телье и Обильная Туза, среднерослый Бергамот Эсперена, сорт умеренного роста Барилье Дешам и сильнорослый Бере Арданпон. На основе кДНК, кодирующих DELLA-белки наиболее близкого груше вида *Malus x domestica*, были сконструированы праймеры, амплифицированы фрагменты трех пар гомологичных генов, клонированы и секвенированы. Амплифицированные участки генов имели длину около 1800 п.н., транслированные белковые последовательности – 600 аминокислотных остатков. Транслированные последовательности сравнивались между собой и с гомологичными последовательностями других видов растений. Выявлена существенная гомология между последовательностями генов DELLA груши, яблони и многих других видов растений. Последовательности среднерослого Бергамот Эсперена и сорта умеренного роста Барилье Дешам, отличались от гомологичных последовательностей яблони (только одна из которых является спуром) в большей степени, чем аминокислотная последовательность низкорослого Жака Телье и высокорослого Бере Арданпон. Последовательности генов 1а и 3а сортов умеренного роста отличались от гомологичных последовательностей слаборослого и высокорослого сортов вставками аминокислот. В мотиве VNIID и LHRII гена 1а сорта Бергамот Эсперена выявлены множественные замены, а в районе мотива LXXLL обнаружен сдвиг рамки считывания. У сорта Бере Арданпон идентифицирована делеция глутамина (Q) перед мотивом LHRI. Образец карликового сорта Жак Телье характеризуется заменой валина (V) на глицин (G) в начале SAW мотива. Последовательность этого сорта оказалась наиболее близкой гомологичным последовательностям генов L3а и L3b яблони. Предполагается, что эта замена может влиять на рост растения, поскольку мотив SAW также принимает участие во взаимодействии с рецептором гиббереллина GID1. В мотиве PFYRE гена 3а у сорта Жак Телье обнаружено несколько замен консервативных аминокислот, у Барилье Дешама выявлены замены по периферии этого мотива. На С-концевой части генов 3а, секвенированных у сортов Бергамот Эсперена и Жак Телье, идентифицированы замены А на G внутри высококонсервативного SAW домена.

Полученные данные свидетельствуют о наличии полиморфизма внутри структуры DELLA-белков не только у сортов груши, отличающихся карликовостью и высоким ростом, но и у сортов умеренного роста. Часть мутаций может указывать на различное происхождение сортов и не влиять на рост растений, тогда как отдельные мутации могут приводить к нарушениям в гиббереллиновом сигналинге и различиям в фенотипе растений.



## Влияние регуляторов роста на ранние стадии формирования корневой системы у проростков кукурузы

Influence the regulation growth for early stages formation of the root system of the maize seedlings

Салмин С.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева». г.Орёл, ул. Комсомольская 95, 302026, Россия  
+7 4862 777-332, +7 4862 777-818, gio2-74@mail.ru

Развитие побеговых систем растений, как известно, подчиняется строгим морфологическим законам. В корневых системах растений наличие подобных закономерностей менее очевидно. Выявить чёткие закономерности строения корневых систем взрослых растений обычно уже не удаётся. Однако возможен поиск закономерностей формирования корневых систем при изучении процесса заложения примордиев боковых корней и ранних стадий развития корней у проростков. Формирование боковых корней является сложным многостадийным процессом важную роль в котором, по-видимому, принадлежит фитогормонам. Имеется много литературных данных относительно механизмов ветвления корней и участия регуляторов роста в этом процессе.

Целью данной работы было изучение ветвления корня в нормальных условиях и механизмов изменения ветвления при действии природных и синтетических ауксинов, 6-бензиламинопурина, абсцизовой кислоты. Выяснение этих проблем необходимо для выявления основных механизмов эндогенной регуляции ветвления корня и понимания возможных пределов регуляции ветвления корней с помощью регуляторов роста.

Работу проводили на корнях проростков кукурузы (*Zea mays L.*) сорта Бено 128. Семена кукурузы выкладывали в эмалированные кюветы на стекло, обёрнутое влажной фильтровальной бумагой, смоченной водопроводной водой, накрывали вторым стеклом и выдерживали в тёмном термостате течение двух или трёх суток при 27°C. Для дальнейших экспериментов использовали проростки с длиной главного корня 20-30мм или 50-70мм. Проростки помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой (контроль), или растворами ИУК,  $\alpha$ -НУК, 6-БАП, АБК в дистиллированной воде. На каждую чашку Петри использовали по 10 мл растворов и помещали по 5 проростков. Чашки выдерживались в тёмном термостате при 27° С. Измеряли линейкой длину корней в течение трёх суток. Длину участков главного корня, несущих боковые корни, измеряли через 48 и 72ч после начала опыта. Подсчитывали число боковых корней в 1-сантиметровых отрезках по длине корня. Вычисляли время развития боковых корней внутри материнского, начиная от возникновения примордия до его выхода из материнского корня (Тб.к.). Для характеристики действия ингибиторов на рост главного корня вычисляли степень ингибирования роста (I) в процентах от контроля.

## С-2. Гормон. и генетич. регул-я роста, развития и продуктивности растений

Результаты исследования позволяют сделать следующие выводы:

Изученные вещества не нарушают акропетального порядка заложения боковых корней и примордии развиваются в боковые корни без периода покоя. Время формирования бокового корня внутри материнского не меняется при воздействии всех изученных веществ и не зависит от исходной длины главного корня.

Ветвление корней кукурузы обладает высокой устойчивостью экзогенным воздействиям, что не может быть связано только с действием фитогормонов, но и определяется так же детерминированностью инициальных клеток боковых корней в апикальной меристеме корня.

Клетки перицикла у кукурузы чувствительны к экзогенным воздействиям в ограниченный период времени.

Ауксины влияют на ранние стадии инициации и образования примордиев боковых корней и не влияют на развитие уже сформированных примордиев.

Проведённые исследования показали, что существуют не выясненные в настоящее время эндогенные механизмы регуляции ветвления корней.

### Оценка влияния экстрактов некоторых дикоросов Якутии к получению модельного объекта на основе *Spirodela polyrrhisa* L.

Assessment of influence of some wild Yakutian plant extracts to receiving model object on the basis of *Spirodela polyrrhisa* L.

Сивцева С.В., Охлопкова Ж.М.

Северо-Восточный федеральный университет. 677000, ул. Белинского, д. 58, г. Якутск, РФ

+7 4112 352454, SV.Sivtseva@mail.ru

Одним из приоритетных подходов в исследовании регуляции ростовых процессов растительного организма является разработка и использование для данных целей модельных объектов, характеризующихся, прежде всего, высокими темпами роста и развития.

Целью исследования является изучение влияния различных экстрактов некоторых дикоросов Якутии к получению модельного объекта на основе *Spirodela polyrrhisa* L. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: сбор материалов исследования согласно ГОСТ; фиксация, транспортировка, камеральная обработка объектов исследования; оценка воздействия экстрактов на рост и развитие *Spirodela polyrrhisa* L.

К выполнению работы нами ранее были собраны образцы из диких популяций ряски-многокоренника на водоемах пригородной территории г. Якутска и получены генетически однородные линии на питательной среде Гельригеля. Маточную культуру *Spirodela polyrrhisa* L. поддерживали на данной среде в колбах (200 мл) и стаканах (150 мл) при комнатной температуре и интенсивности света 3000 люкс со световым периодом 10 ч/сут.

К проведению тестовых работ нами использованы ряски из одной генетически однородной линии. В эксперименте использованы 2 популяции: нативная

популяция ряски-многокоренника, и популяция ряски-многокоренника после воздействия УФ-лучами в течение 18 часов, поддерживаемые на 1/4 питательной среды Гельригеля при определенном режиме температуры и освещенности. Каждый из вариантов опытных образцов, а также контрольные образцы готовили в 3-х повторностях. Для биотестирования использовали культуру ряски, пересаженную на свежеприготовленную среду за двое суток до постановки эксперимента. В каждую пробу помещали по одному растению с ярко-зелеными 1-4 листецами. Каждые 3 суток производили учет растений и смену питательной среды. Для характеристики ростовых процессов *Spirodela polyrrhisa* L. использовали показатель количества листецов (листовых пластинок). Продолжительность культивирования ряски в эксперименте составила 30 суток.

Для оценки влияния на рост и развитие популяций рясок были использованы водные экстракты из фитомассы *Artemisia yacutica* Drob., *Thymus serpyllum* L. и *Pinus pumila* (Pall.) Regel., произрастающих на территории Якутии. Экстракты были получены с помощью перемешивающего устройства LOIP LS 120. Скрининг роста и развития *Spirodela polyrrhisa* L. при воздействии водными экстрактами показал положительную динамику в обеих популяциях. В первом опыте контрольная и экспериментальная группа находились при 10ч /14ч сочетании светового и темнового периода. Во втором (с воздействием УФ-лучей) и третьем опыте (нативные) экспериментальные и контрольные группы находились при 24ч световом периоде, при этом наблюдались высокие показатели по росту и развитию рясок, чем в первом опыте. Популяция *Spirodela polyrrhisa* L. (второй опыт) под воздействием экстрактов из *Thymus serpyllum* L., произрастающей на территории Южной Якутии (коэффициент роста – 4,51), показала наивысшие ростовые характеристики по сравнению с контрольным вариантом (коэффициент роста – 0,08). Также повышение роста и развития показала популяция *Spirodela polyrrhisa* L. при воздействии экстрактом из *Artemisia yacutica* Drob., произрастающей на территории Центральной Якутии (коэффициент роста - 3,02), по сравнению с контрольным вариантом (коэффициент роста – 0,14). При воздействии экстрактом из хвои *Pinus pumila* (Pall.) Regel., произрастающей на территории Северо-Восточной Якутии, популяция ряски имеет коэффициент роста - 1,07 по сравнению с контрольным вариантом (0,14).

Таким образом, использованные водные экстракты, полученные из надземной фитомассы дикоросов Якутии, могут быть применены как регуляторы роста и развития к получению модельного объекта на основе *Spirodela polyrrhisa* L., как показавшего мобильную реакцию по изменению динамики и качественно-количественных характеристик рассмотренных популяций, в лабораторных контролируемых условиях.

## Ростовые характеристики растений абрикоса, обработанных биорегулятором линарозид в комплексе с марганцем

Apricot plant growth characteristics by treatment bioregulator linarozid in complex with manganese

Титова Н.В.

Институт генетики, физиологии и защиты растений Академии Наук Молдовы, г.Кишинев, ул.Пэдурий, 20.

+373 22 55 62 81, nvtmd@mail.ru

В последние годы широким фронтом развернулись исследования влияния натуральных биологически активных соединений на рост и развитие плодовых растений как одного из важнейших путей достижения высокой продуктивности и урожая. К таким веществам относится линарозид, природный гликозид фенольного типа, выделенный в нашем Институте из растений *Linaria vulgaris* Mill. Проведенные нами ранее исследования семян и саженцев абрикоса показали их высокую отзывчивость на обработку этим препаратом, стимулирование им метаболизма, роста, фотосинтеза, а также повышение качества посадочного материала.

Ранее было выявлено стимулирующее действие микроэлементов цинк и марганец на качество посадочного материала растений абрикоса в питомнике, а также на рост, фотосинтез и засухоустойчивость растений в саду. Более активное действие оказывал марганец, существенно влияющий на процессы роста клеток как кофактор РНК-полимеразы в ядре и кофактор ауксиноксидазы, а также участвующий в работе ФС II в процессах окисления воды и переноса электронов. Представлял интерес исследования особенностей роста и развития растений абрикоса под влиянием натуральных растактивирующих соединений в сочетании с микроэлементами. Такая работа была проведена со стероидными гликозидами молдстим (капсикозид) и мелонгозид, выделенных из растений семейств *Capsicum* и *Solanum*, в сочетании с микроэлементами цинк и марганец. Было показано, что обработка молодых растений абрикоса такими смесями активизирует рост и развитие надземных органов и корневой системы, в том числе формирование и функционирование фотосинтетического аппарата. На основании полученных результатов обработка растений абрикоса растворами, содержащими биологически активные вещества молдстим и мелонгозид в смеси с микроэлементами цинк и марганец, рекомендованы как эффективный способ увеличения фотосинтетической продуктивности.

Цель работы - исследование совместного действия нового натурального биопрепарата линарозид и марганца на рост и развитие растений абрикоса.

В течение 2014-2015 гг. в лизиметрах вегетационного комплекса изучали вступающие в плодоношение 3-4-летние растения абрикоса сорта Сирена (подвой абрикос MVA). В фазу интенсивного роста (апрель-май) опытные растения были опрыснуты водным раствором, содержащим 0,01% линарозида, а также смесью 0,01% линарозида и 0,05%  $MnSO_4$ , контрольные – водой. В каждом варианте 10 растений. Через 10-15 дней после обработки и далее в

течение вегетации определяли параметры листовой поверхности (длина, ширина, площадь, масса, удельная поверхностная плотность) и однолетних побегов (длина и диаметр). Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стьюдента при 0,05% уровне значимости.

В результате исследований была выявлена высокая отзывчивость исследуемых растений абрикоса на действие природного стероидного биорегулятора линарозид в смеси с  $MnSO_4$ . Это проявилось в стимулировании ростовых процессов в растениях. Обработка растений абрикоса этой смесью оптимизирует формирование и разворачивание листовой поверхности. Так, уже через 10 дней после опрыскивания, длина листа в средней части однолетнего прироста в контроле равнялась 7,90 см, в варианте с линарозидом 8,48 и в опыте со смесью линарозида и марганца – 9,71 см, что соответственно на 7,3 и 22,9% выше контроля. Ширина листа у разных вариантов находилась примерно в таком же соотношении. Соответственно площадь листа, рассчитываемая по длине, равнялась 31,60; 33,92 и 38,84  $см^2$ . В конце вегетации сухая масса листьев на одном растении и общая листовая поверхность в контрольном варианте составляли в среднем 617 г и 674  $дм^2$ , в варианте с линарозидом 650 г и 685  $дм^2$  и в опыте со смесью линарозида и марганца 760 г и 702  $дм^2$ .

Весьма показательной величиной является удельная поверхностная плотность листьев (УППЛ) в исследуемых вариантах. Эти значения в листьях контроля составляли 9,15, варианта с линарозидом – 9,49 и со смесью линарозида с марганцем – 10,82 мг сухой массы в 1  $см^2$  (в отношении к контролю 104 и 118%). В условиях атмосферной засухи 2014г. различия между опытными вариантами и контролем более выражены. Если УППЛ листьев в контроле равнялась в среднем 5,40  $мг \cdot см^{-2}$ , то в вариантах с линарозидом и смесью линарозида с  $MnSO_4$  – 7,00 и 7,45 (соответственно 129,6 и 137,9 % от контроля). Исходя из известной положительной корреляции удельной поверхностной плотности листа с его фотосинтетической способностью, такое действие стероидного препарата в комплексе с марганцем способствует стимуляции продукционных процессов растений абрикоса. Обработка растений абрикоса линарозидом и смесью линарозида с марганцем значительно активизировала рост однолетних побегов. Через 2 недели после обработки длина ростовых побегов в контроле составляла 41 см, в варианте с линарозидом 48,9 и в варианте линарозид + марганец - 51 см (119 и 124% от контроля). Наиболее существенным было увеличение диаметра прироста, равнявшегося соответственно 3,30; 4,05 и 4,90 мм (123 и 148% к контролю).

Было показано, что натуральный стероидный гликозид линарозид в смеси с микроэлементом марганец активизирует рост и развитие молодых растений абрикоса, в том числе формирование и функционирование фотосинтетического аппарата, что способствует более полной реализации фотосинтетического потенциала растений.

## Влияние препарата циркон на засухоустойчивость пшеницы

### Influence of drug Zircon drought resistance of whea

Чмелёва С.И., Кучер Е.Н., Василиженко С.Б.

ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», Таврическая академия, Россия, Республика Крым, г. Симферополь

*chmeleva-s@mail.ru*

Получению стабильно высоких урожаев озимой пшеницы в Республике Крым препятствуют засухи, наблюдаемые как на этапе прорастания семян, так и в период вегетации. Вероятность воздействия дефицита влаги в регионе составляет здесь 25-50%.

Одним из наиболее эффективных путей защиты культурных растений от последствий недостаточного водообеспечения является усиление естественной засухоустойчивости под действием современных полифункциональных регуляторов роста. К перспективным в использовании и экологически безопасным комплексным препаратам относится Циркон, действующим веществом которого является смесь гидроксикоричных кислот. Целью наших исследований явилось изучение влияния Циркона на ростовые процессы, проходящие в растениях на ранних этапах онтогенеза пшеницы в условиях водного дефицита

В качестве объектов исследования использовались семена и растения пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Антоновка). Отобранные по средним размерам и протравленные в слабом растворе перманганата калия, семена замачивали в водных растворах препарата Циркон (0,025%, 0,005%, 0,075%, 0,1% и 0,125%) в течение 6 часов, а затем высаживали в почву. Для сравнения использовались семена, замоченные в водопроводной воде. Растения выращивали в лабораторных условиях в вегетационных сосудах емкостью 2 кг, при естественном освещении, температуре от +22 до +24°C в течение 3 недель при двух уровнях влажности почвы: оптимальном – 65-70% от полной влагоемкости и засушливом – 30%. Соответственно использовано два контрольных варианта: контроль 1 – семена замачивали в отстоянной водопроводной воде и высевали в субстрат с оптимальным увлажнением; контроль 2 – семена замачивали в отстоянной водопроводной воде и высевали в субстрат с низким уровнем влажности. Влажность почвы периодически определяли гравиметрическим методом и поддерживали на заданном уровне до конца. Водный дефицит растений, относительное содержание воды и интенсивность транспирации срезанных листьев определяли по стандартным методикам. Полученные экспериментальные данные обработаны с помощью методов математической статистики.

Проведенные исследования выявили резкое повышение водного дефицита и интенсивности транспирации в листьях растений пшеницы, а также уменьшение относительного содержания в них воды под влиянием недостатка почвенной влаги (контроль 2) по сравнению с растениями, выращиваемыми в условиях оптимального водообеспечения (контроль 1).

Установлено, что предпосевная обработка препаратом Циркон во всех использованных концентрациях повышает засухоустойчивость пшеницы. Наилучшие результаты были получены при обработке семян раствором исследуемого препарата в концентрации 0,075%. В этом варианте опыта водный дефицит в листьях снижается в 2,9-4,5 раз по сравнению с контролем 2, относительное содержание воды повышается в 1,3 раза, а интенсивность транспирации становится слабее выраженной в 1,2-1,3 раза. Отмеченный стимулирующий эффект регулятора роста зависит от концентрации действующего вещества и сохраняется на протяжении всего эксперимента. Таким образом, полученные результаты подтвердили перспективность использования препарата Циркон для предпосевной обработки семян злаковых культур в условиях недостаточной почвенной влажности.

# Симпозиум 3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

## Устные доклады

Изменение экспрессии генов ферментов липоксигеназного каскада растений разных таксонов в различных условиях

Changes in gene expression of enzymes lipoxygenase cascade in plants of different taxa in various conditions

Бессолицына Е.К., Смирнова Е.О., Ермилова В.С., Горина С.С., Петрова О.Е., Топоркова Я.Ю.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской Академии наук. ул. Лобачевского д.2/31 а/я 30, г. Казань, Россия

+7 843 2927347, +7 843 2927347, [bessolicina\\_elena@mail.ru](mailto:bessolicina_elena@mail.ru)

Липоксигеназный каскад – источник сигнальных соединений, оксипипинов, играющих важную роль в регуляции роста и развития растений, клеточной сигнализации и защиты. Защитные механизмы организмов могут быть конститутивными и/или индуцируемыми, и включать в себя физиологические барьеры и продукцию токсичных соединений. Оксипипины играют основную роль в защите растений, функционируя в качестве сигнальных молекул и/или защитных веществ, таких как антибактериальные и заживляющие агенты, или как составной компонент кутина. По этой причине знание процессов, которые регулируют биосинтез, локализацию и действие таких биоактивных производных липидов в растительных клетках, является ключевым для понимания биологии этого семейства метаболитов. Обычно оксипипины, участвующие в защитных механизмах, не синтезируются заранее; их синтез происходит *de novo* в ответ на механические повреждения, инфекции и другие факторы стресса. Главную роль в биосинтезе оксипипинов растений играют цитохромы P450 семейства CYP74: алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС), эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). В данной работе нами изучалось влияние стрессовых факторов (биотических и абиотических) на экспрессию генов ферментов CYP74 следующих видов растений: кукурузы обыкновенной (*Zea mays* L.), сои обыкновенной (*Glycine max* L.), льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) и зеленого мха (*Physcomitrella patens*). Выбор растительных объектов обусловлен интересом к изучению изменения функционирования липоксигеназного каскада у растений, принадлежащих разным таксонам: однодольные (кукуруза), двудольные (лен-долгунец и соя) и мхи (*P. patens*). Липоксигеназный каскад всех трех объектов различается. У льна-долгунца он дополнен дивинилэфирсинтазами, у сои – эпоксиалкогольсинтазой. В то же время, липоксигеназный каскад *P. patens* усложнен тем, что в отличие от



цветковых растений, у которых субстратами липоксигеназ являются линолевая и  $\alpha$ -линоленовая кислоты (C18), у *P. patens* дополнительным субстратом является арахидоновая кислота (C20). Этим объясняется значительное увеличение количества липоксигеназ у *P. patens*. Полученные результаты указывают на то, что при воздействии абиотических стрессовых факторов у растений разных видов разные ветви липоксигеназного каскада зачастую ведут себя по-разному.

Для выявления возможных дополнительных индукторов экспрессии генов ферментов СУР74 проводили анализ промоторных областей этих генов и выявили большое количество последовательностей, характерных для генов, экспрессия которых зависит от света. Поэтому в дальнейшем было использовано изменение светового режима в качестве стрессового фактора. Было показано изменение экспрессии отдельных генов липоксигеназного каскада при изменении светового режима.

Было изучено влияние инфицирования энтеробактериями на изменение экспрессии генов ферментов липоксигеназного каскада. Кроме того, были проанализированы биологические свойства отдельных продуктов реакций. Результаты настоящей работы свидетельствуют, что в полном согласии с данными литературы липоксигеназный каскад принимает участие в формировании ответа на инфицирование клетками фитопатогенных энтеробактерий. При этом дивинилэфирсинтазы имеют первостепенное значение в этом процессе. Показано, что у льна-долгунца при инфицировании происходит индукция экспрессии всех четырех генов дивинилэфирсинтаз; кроме того, показано, что продукт каталитического действия дивинилэфирсинтаз обладает бактериостатическим действием. В то же время алленоксидсинтазный путь, по-видимому, участвует в формировании общего ответа на стрессовый фактор независимо от его природы. В свою очередь, функционирование гидропероксидлиаз различается не только у разных видов растений, но и у разных изоформ. По-видимому, это связано со значением образуемых продуктов, которыми могут быть травматин, различными оксо-кислоты, либо летучие соединения, являющиеся популяционным сигналом об опасности.

Долгое время считалось, что ферменты СУР74 характерны исключительно для цветковых растений. Однако полученные нами данные указывают на гораздо более древнее происхождение данного семейства, что подтверждают пластидная локализация большинства ферментов СУР74, особенности структуры и каталитического действия этих ферментов по сравнению с остальными цитохромами Р450, а также данные филогенетических исследований. Дополнительным доказательством является тот факт, что представители клана СУР74 описаны у широкого ряда организмов, в том числе у животных, растений, грибов, протеобактерий и бурых водорослей. Нами был приблизительно вычислен момент появления данных ферментов в эволюционной истории и собраны доказательства, подтверждающие это предположение. На основании всех полученных данных, в том числе об эволюции ферментов внутри семейства СУР74, нами было сделано общее

предположение об изменении роли отдельных ферментов СУР74 в жизнедеятельности растений в ходе эволюции.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-34-60231-мол\_а\_дк.

## Механизмы АФК-зависимой регуляции транспортных и сигнальных процессов на плазматической мембране растительной клетки

Mechanisms of ROS-dependent regulation of transport and signaling systems at the plant cell plasma membrane

Демидчик В.В.<sup>1,2</sup>, Войцеховская О.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, пр. Независимости 4, 220030, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, ул. Профессора Попова, 2, 197376 Санкт-Петербург, Россия

*dzemidchyk@bsu.by*

Эволюция жизни в условиях водных, O<sub>2</sub>-содержащих растворов привела к тому, что активация триплетного кислорода с формированием супероксида или синглетного кислорода стала играть первостепенную роль в целом комплексе реакций растительного организма, среди которых особо можно отметить рост, развитие, гормональные и стрессовые ответы. Супероксид и синглетный кислород, взаимодействуя с электронами, протонами, переходными металлами и органическими молекулами, дают обширное и разнообразное по реакционной способности семейство так-называемых активных форм кислорода (АФК), насчитывающее несколько десятков веществ. Целью настоящей работы было выявление закономерностей воздействия АФК на ионные потоки и сигнальные процессы на плазматической мембране клеток высших растений. Основной акцент был сделан на модификацию работы катионных каналов – группы транспортных белков, отличающейся высокой общей мембранной проводимостью и обильной по числу генов и их экспрессии. Была также исследована генерация АФК при росте клетки и под действием стресса и охарактеризованы некоторые ключевые физиологические явления, регулируемые системой АФК-активируемых катионных каналов. Первично, была протестирована реакция катионных проводимостей клеток корня *Arabidopsis thaliana* (арабидопсиса) на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и гидроксильный радикал (<sup>•</sup>ОН). В ходе данных тестов было показано, что <sup>•</sup>ОН обладает исключительной способностью активировать две группы катионных каналов: Ca<sup>2+</sup>-проницаемые неселективные катионные каналы, катализирующие рост цитоплазматической активности Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>цит.</sub>) и наружу-выпрямляющие K<sup>+</sup>-каналы, обеспечивающие отток из клеток корня ионов калия. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> действовала слабее, чем <sup>•</sup>ОН. Примечательно, что молодые растущие клетки обладали значительно большей плотностью <sup>•</sup>ОН-активируемых катионных токов и чаще отвечали на менее реакционно-активную H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Электрофизиологический, фармакологический и

генетический анализ АФК-активируемых каналов выявил ряд важнейших аспектов их функционирования. В частности, удалось показать, что  $\text{OH-}$ активируемые токи опосредуются двумя отдельными типами катион-селективных каналов, отличными по проводимости одиночного канала и чувствительности к тетраэтиламмонiu, гадолинию и другим блокаторам. Генетическая природа  $\text{OH-}$ активируемых  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемых каналов не была окончательно определена, хотя гены кандидаты были выявлены среди семейства каналов, активируемых циклическими нуклеотидами. В тоже время  $\text{OH-}$ активируемые  $\text{K}^{+}$ -каналы были идентифицированы как продукты генов *Gork* и *Skor*. На уровне физиологических реакций было установлено, что  $\text{OH-}$ активируемые  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемые каналы напрямую ответственны за вход  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму в интактных клетках при полярном росте растяжением и ответе на засоление, патогенные элиситоры и другие стрессоры. Таким образом, они вовлекаются в контроль роста, развития и формирования стрессоустойчивости. В то же время  $\text{OH-}$ активируемые  $\text{K}^{+}$ -каналы определяют ответ растения, связанный со стресс-индуцируемой утечкой электролитов, индукцией запрограммированной клеточной гибели и автофагии. Замена цистеинового остатка на апопластной стороне канала *GORK* на серин приводит к потере или значительному ослаблению  $\text{OH-}$ активируемого выходящего потока калия из клеток корня. Это указывает на наличие конкретной мишени АФК в структуре катионного канала. Структурно схожая мишень АФК обнаружена также в  $\text{K}^{+}$ -канале *SKOR*, ответственной за загрузку калия в сосуды ксилемы. Другим направлением работы являлся анализ синтеза АФК при росте и стрессовых ответах. В результате было показано, что НАДФН-оксидазы являются ключевыми ферментами, синтезирующими АФК, в обоих типах процессов. Супероксид, генерируемый НАДФН-оксидазой, преобразуется в конечном итоге в  $\text{OH-}$ , обладающий способностью активировать катионные каналы. Таким образом, в ходе работы была выявлена и детально изучена физиологическая система АФК/ $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{K}^{+}$ -опосредуемой регуляции физиологических процессов в организме растения. Исследование поддержано РФФ, проект №15-14-30008.

Роль калиевых каналов и НАДФН-оксидаз в регуляции стресс-индуцируемой запрограммированной клеточной гибели в корне высших растений

The role of potassium channels and NADPH oxidases in regulation of stress-induced programmed cell death in roots of higher plants

Мацкевич В.С.<sup>1</sup>, Самохина В.В.<sup>1</sup>, Чичко А.А.<sup>1</sup>, Звонарев С.Н.<sup>1</sup>, Кирисюк Ю.В.<sup>2</sup>, Соколик А.И.<sup>1</sup>, Тютерева Е.В.<sup>3</sup>, Войцеховская О.В.<sup>3</sup>, Демидчик В.В.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, 220030, пр. Независимости, 4, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Брестский государственный университет, 224016, бульвар Космонавтов 21, Брест, Беларусь

<sup>3</sup>ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, ул. Профессора Попова, 2, 197376 Санкт-Петербург, Россия

Запрограммированная клеточная гибель (ЗКГ) играет основополагающую роль в развитии и выживании многоклеточных организмов. В физиологии растений хорошо развиты представления о ЗКГ в качестве защитного механизма при атаке патогенных организмов, однако данное явление в корне, в особенности при абиотических воздействиях практически не изучено. В настоящей работе были разработаны методы анализа ЗКГ в трихобластах и атрихобластах эпиблемы *Arabidopsis thaliana* L. Heynh.. В качестве индукторов ЗКГ тестировались NaCl, Ni<sup>2+</sup> и смеси, генерирующие гидроксильные радикалы (1 mM CuCl<sub>2</sub>, L-аскорбиновая кислота и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Исследования проводились на растениях дикого типа (WS), а также нокаутах *gork1-1* (GORK1) и *rhd2-1* (RВОНС), лишенных наружу-выпрямляющего K<sup>+</sup>-канала и функциональных НАДФН-оксидазы С, соответственно. K<sup>+</sup>-канал GORK1 является основной системой, катализирующей выход K<sup>+</sup> из клеток корня в различных физиологических состояниях, включая стрессовые. НАДФН-оксидазы ответственны за Ca<sup>2+</sup>-зависимую генерацию супероксидного радикала и других АФК при стрессе и росте клетки удлинением. Среди адаптированных тестов ЗКГ ризодермы наибольшую чувствительность продемонстрировали морфологические тесты (конденсация протоплазмы, образование темных телец, повреждение плазматической мембраны и т.д.), а также оценка активности каспазоподобных протеаз (CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker; Promega). Оценка жизнеспособности с использованием Evans Blue и флуоресцеиндиацетата показала высокую чувствительность в случае оксидативного стресса и NaCl (150–400 mM), но не давала достоверных отличий по сравнению с контролем в случае Ni<sup>2+</sup> (0,1–5 mM). Оксидативный стресс индуцировал морфологические симптомы ЗКГ и активацию протеаз в ризодерме, прогрессирующие в течение 2 сут и приводящие к практически полному отмиранию данной ткани. Доля клеток с симптомами ЗКГ была выше у растений дикого типа, чем у растений *gork1-1* и *rhd2-1*. Это указывает на вовлечение белковых продуктов генов

*Gork1-1* и *Rhd2-1* в развитие ЗКГ в корне. Стресс, вызываемый летальной концентрацией  $\text{Ni}^{2+}$ , приводил к прогрессирующим морфологическим изменениям внутри клетки, характерным для ЗКГ, и индукции протеаз. Эти процессы развивались медленнее у *gork1-1*, однако не показывали достоверного отличия у растений *rhd2-1*. Засоление (400 мМ NaCl) приводило к быстрому развитию морфологических и биохимических признаков ЗКГ, которые проявлялись слабее у растений *rhd2-1*. Ионы гадолиния (блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов) подавляли развитие симптомов ЗКГ в ответ на оксидативный стресс и  $\text{Ni}^{2+}$ . Это свидетельствует об участии  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемых катионных каналов в развитии ЗКГ в эпиблеме. Ионы тетраэтиламмония (блокатор  $\text{K}^+$ -каналов) в значительной степени снижали скорость развития симптомов ЗКГ при оксидативном стрессе и в меньшей степени при засолении, однако они проявляли незначительное действие по отношению к избытку  $\text{Ni}^{2+}$ . Тиомочевина, представляющая собой агент, устраняющий гидроксильные радикалы, резко снижала скорость появления симптомов ЗКГ при оксидативном стрессе и воздействии избытка  $\text{Ni}^{2+}$ . Корневые волоски демонстрировали большую скорость развития симптомов ЗКГ при абиотических стрессовых воздействиях, чем зрелые атрихобласты. Развитие симптомов ЗКГ коррелировало с синтезом АФК (анализ по накоплению флуоресценции дигирозидиума). В настоящей работе было установлено, что в большинстве случаев у растений дикого типа развитие симптомов ЗКГ происходит быстрее, чем у растений *gork1-1* и *rhd2*, лишенных функционального наружу-проводящего  $\text{K}^+$ -канала и основной системы синтеза экзогенных АФК (НАДФН-оксидазы типа С) в корне, соответственно. Кроме того, блокаторы катионных каналов снижали долю клеток, имеющих симптомы ЗКГ, в особенности, в случае влияния оксидативного стресса. Таким образом, можно предложить следующую последовательность ранних стадий ЗКГ, вовлекающих системы плазматической мембраны клеток ризодермы: 1) рецепция на уровне ионных каналов или деполяризация (при засолении) вызывает вход  $\text{Ca}^{2+}$ , приводящий к активации НАДФН-оксидаз, генерирующих АФК; 2)  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемые каналы дополнительно активируются АФК; 3) наружу-проводящие  $\text{K}^+$ -каналы активируются деполяризацией и АФК; 4)  $\text{K}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые каспазоподобные протеазы начинают разрушение структурных белков и ферментов. Данные, приведенные в настоящей работе показывают, что регуляция и контроль развития ЗКГ может также осуществляться на уровне биосинтеза гидроксильного радикала (эффект тиомочевины).

Исследование поддержано РНФ, проект №15-14-30008.

## Металл-содержащие наночастицы подавляют рост и активируют сигнальные процессы у высших растений

### Metal-containing nanoparticles inhibit plant growth and activate signaling in higher plants

Демидчик В.В.<sup>1,3,4</sup>, Кирисюк Ю.В.<sup>2</sup>, Сосан А.<sup>3</sup>, Колбек И.<sup>3</sup>, Лоусон Т.<sup>3</sup>, Свистуненко Д.<sup>3</sup>, Стрельцова Д.Е.<sup>1</sup>, Смолич И.И.<sup>1</sup>, Войцеховская О.В.<sup>4</sup>, Соколик А.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, 220030, пр. Независимости, 4, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Брестский государственный университет, 224016, бульвар Космонавтов 21, Брест, Беларусь

<sup>3</sup>Университет Эссекса, Парк Вивенху, СО4 3SQ, Колчестер, Великобритания

<sup>4</sup>ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, ул. Профессора Попова, 2, 197376 Санкт-Петербург, Россия

Наночастицы (НЧ) – твердотельные объекты, один из размеров которых не превышает 100 нм. Благодаря столь малым размерами они обладают уникальными физическими и химическими свойствами. К настоящему времени в мире официально зарегистрировано около 1700 коммерческих продуктов на основе НЧ. Наибольшее количество НЧ изготавливается на основе металлов. Самым массовым наноматериалом является «наносеребро». В промышленности также активно используются НЧ меди, цинка, золота, оксидов титана и железа. Несмотря на многие позитивные аспекты для инженерии, имеются риски, связанные с токсичностью НЧ для живых систем, в том числе и растений. В последние годы показано, что НЧ металлов накапливаются в биосфере. Пагубное воздействие НЧ отмечено для животных, микроорганизмов и грибов. Растения менее изучены в плане влияния НЧ. Так, до сих не понятны клеточные детерминанты воздействия НЧ на растительный организм, отсутствуют работы с использованием модельных растительных систем. Остается непонятным как осуществляется первичная рецепция НЧ растительной клеткой. Целью настоящей работы являлось выявление закономерностей воздействия важнейших металл-содержащих НЧ на растительный организм на уровне целого растения и отдельной клетки. Особый акцент был сделан на установление первичных актов распознавания НЧ клеткой. Использовались растения *Arabidopsis thaliana* L.. Были протестированы сферические наночастицы Ag, Cu, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и TiO<sub>2</sub> одинаковых размеров (40-50 нм в диаметре). Они добавлялись в гелевые среды, что способствовало их равномерному распределению в субстрате, либо вводились в виде взвесей, полученных при помощи обработки растворов ультразвуком. В ходе проведенных опытов было продемонстрировано, что НЧ Ag и Cu ингибируют удлинение корней. Для наночастиц Ag эффект на рост основного корня проявлялся, начиная с 300 мг/л, достигая максимума при 3000-5000 мг/л. Для НЧ Cu порог концентраций, оказывающих ингибирующее действие был ниже: при 5 мг/л происходило снижение скорости роста корня на 25-30%, а при 15 мг/л в три раза. Изменение площади поверхности листа регистрировалось при помощи системы FluorImager-CCD (Technologica, UK)

в реальном времени в течение 9 сут параллельно с измерением параметра  $F_v/F_m$  (максимального квантового выхода фотосистемы II). В результате было показано, что НЧ Ag и Cu оказывают ингибирующее влияние на рост листа при несколько более высоких уровнях, чем для корня. Параметр  $F_v/F_m$ , отражающий эффективность работы фотосинтетического аппарата, значительно снижался под действием НЧ металлов (в среднем на 70%). НЧ  $Fe_3O_4$  и  $TiO_2$  не ингибировали рост растений и фотосинтез до уровня 10 г/л. Низкие концентрации НЧ вызывали небольшую стимуляцию роста корней. Введение НЧ Ag и Cu в окружающий раствор активировало рост цитоплазматической активности  $Ca^{2+}$  в клетках корня. Данный эффект ингибировался блокаторами катионных каналов. При добавлении данных НЧ также наблюдалась генерация активных форм кислорода (АФК) клетками корня. Опыты с использованием техники пэтч-кламп показали, что НЧ Ag способны активировать особую группу катионных каналов, которая по биофизическим и фармакологическим свойствам схожа с механочувствительными каналами. Также были проведены тесты с использованием спектроскопии электронно-парамагнитного резонанса. Они показали, что НЧ Ag не способны катализировать реакции Хабера-Вейса и генерацию гидроксильных радикалов в корне, но могут вызывать окисление аскорбиновой кислоты в интактных тканях. НЧ Cu были способны как к катализу синтеза гидроксила, так и разложению аскорбиновой кислоты. НЧ  $Fe_3O_4$  и  $TiO_2$  были редокс-инертны. Специфической реакцией НЧ Cu была индукция запрограммированной клеточной гибели, что не было характерно для других протестированных НЧ. Таким образом, проведенные опыты показали, что НЧ металлов могут вызывать ингибирующее влияние на рост растений и фотосинтез. Они распознаются растительной клеткой при помощи классических сигнальных путей, вовлекающих  $Ca^{2+}$  и АФК. Наночастицы металлов, вероятно, активируют механочувствительные каналы, а также разрушают важнейший антиоксидант – аскорбиновую кислоту. НЧ меди способны генерировать гидроксильные радикалы непосредственно в тканях растения.

Исследование поддержано РНФ, проект №15-14-30008.

## Modification of plant plasma membrane ion currents by exogenous brassinosteroids

Straltsova D.<sup>1</sup>, Chykun P.<sup>1</sup>, Kolbanov D.<sup>1</sup>, Sosan A.<sup>2</sup>, Subramaniam S.<sup>2</sup>, Sokolik A.<sup>1</sup>, Zhabinskii V.<sup>3</sup>, Demidchik V.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Belarusian State University, 220030, 4 Independence Ave, Minsk, Belarus

<sup>2</sup>University of Essex, Wivenhoe Park, CO4 3SQ, Colchester, United Kingdom

<sup>3</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, NASB, 220141, 5/2 Kuprevich Street, Minsk, Belarus

<sup>4</sup>Komarov Botanical Institute, RAS, Professora Popova Str. 2, 197376, Saint-Petersburg, Russia

Brassinosteroids have been intensively studied for their structure, biosynthesis and general physiological roles. They have recently been shown to be perceived at the cell surface by BRI1, leucine-rich repeat receptor-like kinases (RLKs). The cytoplasmic domain of BRI1 probably interacts with calmodulin in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner, suggesting a cross-talk between brassinosteroid and calcium signalling pathways. Moreover, recent data indicate that brassinosteroids can also be sensed by the plasma membrane system catalysing increase in the cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  (in leaves of *Arabidopsis thaliana*). The aim of this study was to examine possible effects of brassinosteroids on the plasma membrane cation conductances in plant cells and related  $\text{Ca}^{2+}$  driven signalling events. Here, we found that brassinosteroids activate  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^{+}$ -permeable ion channels in the plasma membrane of higher plants. Wheat root protoplasts (tested by patch-clamping) and whole arabidopsis plants expressing  $\text{Ca}^{2+}$ -reporting protein, aequorin (analysed by chemiluminometry), were used in this study. In the whole-cell patches (wheat root protoplasts), epibrassonolide, homobrassionolide or 24-epicastosterone ( $10^{-7}$  –  $10^{-4}$  M) were applied exogenously. Only 24-epicastosterone modified transmembrane cation currents while epibrassonolide and homobrassionolide did not cause any reaction. Addition of 24-epicastosterone at cytosolic side through the patch-clamp pipette led to increase of  $\text{Ca}^{2+}$  influx conductance, which demonstrated characteristics of depolarisation-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. It also activated  $\text{K}^{+}$  efflux conductance which resembled previously reported GORK channels. The pharmacological analyses have shown that brassinosteroid-activated  $\text{Ca}^{2+}$  influx conductance was sensitive to antagonists of nonselective  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channels. Blockers of  $\text{K}^{+}$  channels did not inhibit this conductance while they decreased brassinosteroid-induced  $\text{K}^{+}$  efflux conductance. The plasma membrane conductance, which was activated by an endogenous or exogenous 24-epicastosterone, showed bell-like shape with maximal activation at depolarisation voltages (bath: 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ). It was not observed at lower extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . This demonstrates that the observed conductance was mediated by  $\text{Ca}^{2+}$  entry through cation channels from extracellular space. Labelling 24-epicastosterone with BODIPY (using 24-epicastosterone-BODIPY conjugates which were synthesised chemically) showed that 24-epicastosterone can be transferred to the cytosol both in intact roots and protoplasts. This confirms that the effect of 24-epicastosterone at the cytosolic face can potentially be observed in real plants. The depolarisation-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels have rarely been observed in the plasma membrane of higher plants. They are



usually masked by large outwardly rectified currents or hyperpolarisation activated currents. The genetics of these channels and their regulation remain unclear. It is known that they are stimulated by microtubule-depolymerizing drugs and inhibited by gadolinium ions. Zhao *et al.* have recently observed that brassinosteroid-induced elevation of cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  was significantly lower in the *brl1-5* plants having reduced sensitivity to brassinosteroids. Thus, the brassinosteroid-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signal is probably located downstream of brassinosteroid binding to BRI1 receptor. Surprisingly, the activation of  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^{+}$ -permeable channels was not observed after application of epibrassinolide and homobrassinolide to wheat root protoplasts. Hypothetically, this can be related to the absence of the biosynthetic path from 24-epicastosterone to epibrassinolide in graminaceous species. Here we also tested the brassinosteroid effect on cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$ , using *Arabidopsis thaliana* plants constitutively expressing aequorin. All three brassinosteroids induced elevation of the cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  in arabidopsis root cells with 24-epicastosterone being more potent than epibrassinolide and homobrassinolide. Minimal concentration of 24-epicastosterone, which induced statistically significant changes of cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$ , was  $3 \cdot 10^{-6}$  M.

This study was partially supported by RSF Grant to Vadim Demidchik (#15-14-30008).

Альтернативная оксидаза 1 *Chlamydomonas reinhardtii*:  
регуляция в стрессовых условиях

Alternative oxidase 1 of *Chlamydomonas reinhardtii*: regulation under  
stress conditions

Залуцкая Ж.М., Лапина Т.В., Остроухова М.В., Ермилова Е.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, биологический  
факультет. Университетская наб. 7/9, 199034 Санкт-Петербург, Россия

+7 812 450-67-40, z.zalutskaya@spbu.ru

У растений и грибов кроме чувствительного к действию цианида дыхательного пути, включающего цитохромы, есть также нечувствительный к действию цианида альтернативный путь. Альтернативный путь состоит из единственного компонента: локализованной во внутренней мембране митохондрий альтернативной оксидазы (АОХ), которая у зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* Dang представлена двумя белками CrАОХ1 и CrАОХ2.

Ранее было показано, что транскрипция гена *АОХ1*, локализованного в хромосоме 9 *C. reinhardtii*, индуцируется нитратом и репрессируется аммонием, и АОХ1-белок вовлечен в контроль наиболее важных путей метаболизма данного микроорганизма. Подобная регуляция альтернативной оксидазы нитратом и аммонием уникальна для *Chlamydomonas*, а для высших растений характерна противоположная зависимость: активация аммонием и репрессия нитратом. Вместе с тем, роль АОХ1-белка в стрессовых условиях совершенно не ясна.

Методами количественной ПЦР, Вестерн-блоттинга и измерения дыхания клеток проведен анализ регуляции альтернативной оксидазы 1 *C. reinhardtii* на уровне транскрипции, трансляции и активности при действии на клетки водоросли двух стрессоров различной природы: высокой температуры и кадмия. Нами впервые показана индукция АОХ1 и возрастание доли альтернативного дыхания как в условиях теплового стресса, так и при действии кадмия. Кроме того, полученные данные предполагают включение протеиновых(ой) киназ(ы) и кальция в регуляторную сеть, контролирующую экспрессию *АОХ1 C. reinhardtii* в стрессовых условиях. Работа проводилась при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-04-00233).

## Роль низкомолекулярных протекторов в процессе повышения устойчивости растений пшеницы к низкотемпературным воздействиям разной интенсивности

The role of low-molecular protective compounds in the process of resistance increase of wheat plants to low temperature effects of different intensity

Игнатенко А.А., Таланова В.В., Титов А.Ф., Репкина Н.С.,  
Венжик Ю.В.

ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Россия

+7 8142 76-27-12, [angelina911@ya.ru](mailto:angelina911@ya.ru)

Увеличение содержания в клетках активных форм кислорода, приводящее к усилению перекисного окисления липидов (ПОЛ), денатурации белков и нуклеиновых кислот, является одним из последствий воздействия на растения различных стресс-факторов. Усиление ПОЛ, в свою очередь, вызывает активацию антиоксидантной системы (АОС), которая играет важную роль в устойчивости растений, включая их холодостойкость. Однако изменение активности АОС и устойчивости растений в зависимости от интенсивности низкотемпературного воздействия изучено пока недостаточно. В связи с этим, цель данной работы заключалась в исследовании влияния низких положительных температур (4, 8 и 12°C) на содержание низкомолекулярных соединений, обладающих протекторной функцией (пролина, глутатиона и каротиноидов), и уровень транскриптов генов, кодирующих ферменты синтеза пролина (*WP5CS*) и глутатиона (*GS3*), в листьях пшеницы.

Исследования проводили на 7-дневных проростках пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с. Московская 39, которые выращивали в течение недели в камере искусственного климата при стандартных условиях. Затем проростки подвергали воздействию низких температур 4, 8 или 12°C в течение 7 сут. О холодоустойчивости судили по температуре, вызывающей гибель 50% палисадных клеток листа (ЛТ50) после тестирующего промораживания в термоэлектрическом микрохолодильнике. Уровень ПОЛ оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА). Содержание каротиноидов определяли спектрофотометрически, свободного пролина – методом Бейтса с соавт., глутатиона – методом ВЭЖХ. Накопление транскриптов генов *WP5CS* и *GS3* анализировали методом ПЦР в режиме реального времени.

Проведенное исследование показало, что устойчивость растений пшеницы при действии всех изученных температур (4, 8 и 12°C) возрастает. Но если при 12°C устойчивость увеличивалась только после суточной экспозиции, а затем практически не изменялась, то при действии температуры 4 и 8°C устойчивость повышалась уже в первые часы закаливания и в дальнейшем продолжала монотонно возрастать, достигая максимума на 6–7-е сут. При этом наибольший прирост устойчивости был отмечен при 4°C, а наименьший при 12°C.

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

В листьях пшеницы при действии низких закаливающих температур (4, 8 и 12°C) в течение 2–3 сут происходило постепенное накопление МДА, однако к 6–7 сут низкотемпературного воздействия его уровень начинал снижаться.

Наряду с повышением устойчивости в листьях пшеницы под влиянием закаливания происходила аккумуляция свободного пролина. Причем повышение уровня пролина коррелировало с накоплением транскриптов гена *WP5CS*, ответственного за синтез пролин-5-карбоксилатсинтетазы. Содержание транскриптов этого гена увеличивалось уже в первые часы действия низких температур и превышало исходный уровень к концу закаливания (7 сут). Важно отметить, что уровень транскриптов гена *WP5CS* был значительно выше на 6–7-е сут при 4°C, чем при температурах 8 и 12°C. Также в начальный период (1 ч) действия температуры 4°C в листьях пшеницы наблюдалось увеличение содержания восстановленного глутатиона и накопление транскриптов гена *GS3*, кодирующего глутатионсинтетазу. При этом при 12°C содержание транскриптов этого гена повышалось в течении всего процесса закаливания, а при действии температуры 4 и 8°C начинало снижаться после суточной экспозиции, но даже на 7-е сут было выше исходного уровня. Наряду с этим в листьях пшеницы в начальный период (5 ч) действия низких температур (4, 8 и 12°C) наблюдалось увеличение содержания каротиноидов, которое в дальнейшем при 12°C практически не изменялось в течение всего эксперимента, а при 4 и 8°C после суточной экспозиции оно начинало снижаться.

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет заключить, что наряду с другими структурно-функциональными изменениями важное место в процессе адаптации пшеницы к действию низких температур занимает активизация образования низкомолекулярных протекторов (пролина, глутатиона и каротиноидов) и транскриптов генов ферментов, участвующих в их синтезе, что в конечном итоге способствует защите клеток растений от ПОЛ. При этом, чем активнее происходит накопление низкомолекулярных протекторов, тем большую устойчивость к действию холода способны развивать растения.

## Оценка изоферментного полиморфизма и антиоксидантного статуса хронически облучаемых популяций сосны обыкновенной

An assessment of the isozyme polymorphism and the antioxidant status of chronically irradiated Scots pine populations

Казакова Е.А., Волкова П.Ю., Гераськин С.А.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии», Киевское ш., 109 км, Обнинск, Россия

+7 48439 6-48-02, [alvaly@mail.ru](mailto:alvaly@mail.ru)

В настоящее время огромные территории лесных массивов, в частности сосновые леса России и Беларуси, затронутые радиоактивным следом аварии на Чернобыльской АЭС, подвергаются хроническому облучению. Известно, что хроническое радиационное воздействие может изменять генетическую структуру природных популяций. Поэтому важно оценить последствия такого облучения для популяции сосны обыкновенной и выяснить, с помощью каких механизмов происходит адаптация изучаемых популяций к изменяющимся условиям среды.

Для оценки генетической структуры популяций сосны, произрастающих в Брянской области, загрязнённой радионуклидами в результате Чернобыльской аварии, с помощью электрофоретических методов анализа исследован полиморфизм трех ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и лейцинаминопептидазы. Была оценена частота мутационных событий в локусах изучаемых ферментов и основные показатели, характеризующие генетическую структуру популяций. Установлено, что общая частота мутаций статистически значимо возрастает с ростом мощности дозы хронического облучения (от 10 до 40 мГр/год). На участке с мощностью дозы 40 мГр/год хроническое радиационное воздействие приводит к увеличению эффективного числа аллелей по сравнению с контрольными участками (0,02 и 0,23 мГр/год), а доля редких аллелей не зависит от уровня радиоактивного загрязнения. При этом внутрипопуляционное разнообразие на всех экспериментальных участках характеризуется высоким и средним уровнем изменчивости.

Анализ активности изучаемых ферментов показал, что с ростом уровня радиоактивного загрязнения она не изменяется.

Таким образом, наблюдаемые мощности дозы (от 10 до 40 мГр/год) могут рассматриваться как фактор, способный модифицировать генетическую структуру популяций, но так как мутационные события в семенах сосны обыкновенной относительно редки, они не вносят значительного вклада в наблюдаемую активность ферментов.

Для сопоставления показателей мутационного процесса и антиоксидантного статуса в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной (от 10 до 67 мГр/год) был проведен хроматографический анализ концентраций антиоксидантов (восстановленного и окисленного глутатиона, аскорбиновой кислоты) и малонового диальдегида. Показано, что для наиболее

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

загрязненных участков, находящихся в Республике Беларусь (51 и 67 мГр/год), концентрации восстановленного глутатиона повышаются по сравнению с контрольными участками (0,02 и 0,23 мГр/год). Соотношение концентраций восстановленного и окисленного глутатиона оказалось существенно выше на участках с наибольшими мощностями дозы (51 и 67 мГр/год), в то время как существенных изменений концентрации аскорбиновой кислоты от уровня радиоактивного загрязнения не выявлено. Оценка концентраций малонового диальдегида показала, что его содержание зависит от величины радиационного воздействия и имеет тенденцию к увеличению с ростом мощности дозы хронического облучения. Так на участке с мощностью дозы 67 мГр/год концентрации малонового диальдегида статистически значимо выше, чем его концентрации в контрольных популяциях.

Таким образом, в наиболее загрязненных экспериментальных популяциях (51 и 67 мГр/год) наблюдается изменение антиоксидантного статуса изучаемых организмов по сравнению с контрольными популяциями. Это говорит о том, что даже низкие мощности дозы хронического облучения вызывают окислительный стресс в популяциях сосны обыкновенной. А хронический окислительный стресс, в свою очередь, может обуславливать изменения в генетической структуре экспериментальных популяций.

Работа выполнена при поддержке Гранта Российского научного фонда (соглашение № 14-14-00666) «Анализ механизмов адаптации популяций растений к техногенному воздействию».

## Изменение нормы реакции физиолого-биохимических параметров при исследовании устойчивости сосны обыкновенной к техногенному стрессу

Norm reaction variability of physiologic-biochemical parameters in the investigation of Scots pine resistance to technogenic stress

Клушевская Е.С., Кузнецова Н.Ф.

ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» (Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии), 394087, ул. Ломоносова, 105, г. Воронеж, Россия

+7 473 253-71-89, +7 473 253-94-36, [ekogenlab@gmail.com](mailto:ekogenlab@gmail.com)

Одной из актуальных проблем современности является глобальное изменение климата. В европейской части России иссушению подвергается уникальный ландшафт лесостепи, огромный сельскохозяйственный и экономически важный регион страны. Цель работы - изучение нормы реакции и ее сдвигов у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в зависимости от генотипа дерева и техногенного прессинга на насаждение в условиях *ex situ* и при имитации сильного и умеренного стресса в лабораторных условиях. Объектом исследования являлось насаждение вдоль крупной автомагистрали «Дон» (г. Воронеж, объект «Московский проспект», уровень эмиссионной нагрузки 6,02 т/год на км<sup>2</sup>). Контролем служил Ступинский тест-объект (Воронежская область, Рамонской район, прилегает к Воронежскому биосферному заповеднику), типичное для ЦЧР по вегетативной семенной продуктивности насаждение. Анализировались устойчивые и чувствительные к засухе формы. В мае с модельных деревьев были отобраны побеги второго года жизни и проведен анализ хвои в трех вариантах опыта: 1) свежесобранные пробы; 2) воздействие гидротермического стресса «засуха + температура» (7 суток при 45°C); 3) воздействие умеренного стресса «засуха» (10 суток при комнатной температуре). Для имитации засухи использовали 0,6М раствор маннита. Исследования водного режима растений (дефицит влаги, общее количество влаги, количество коллоидно-связанной воды) проводили по общепринятой методике Х.Н. Починка (1976). Содержание свободного пролина определяли в воздушно-сухих пробах методом Бейтса (1973).

В нативном состоянии уровень влаги деревьев Московского проспекта составлял 60,5%, в Ступино – 55,3%. При стрессе (гидротермическом и умеренном) уровень влаги снизился в Ступино в 1,9 и в 1,8 раз, соответственно (до 29,5 и 30,7%), в Московском насаждении - в 4,38 и 5,41 раза (до 13,8 и 11,2%). Статистический анализ полученных данных свидетельствует в пользу того, что уровень влаги в растениях до и после воздействия достоверно отличается, но не зависит от силы и времени действия стресса. Деревья Московского проспекта очень разнородны по содержанию влаги. Амплитуда изменения признака составляет 31,3%, что в 2,7 раза больше, чем в контроле (11,6%). При действии гидротермического стресса границы изменения признака близки у деревьев двух насаждений, что, по-видимому, указывает на сходные механизмы выживания растений в экстремальных условиях. При

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

умеренном стрессе, когда появляется возможность адаптации к неблагоприятным условиям, у деревьев Ступинского тест-объекта амплитуда повышается в 3,9 раз (45,6%), а Московского проспекта данный показатель, наоборот, понижается в 1,7 раз (13,8%). В контроле содержание коллоидно-связанной воды в стрессовых ситуациях возрастает от 19,1 до 28,0 и 56,7%. У деревьев Московского проспекта мы наблюдаем иной механизм ответа. Исходно высокие значения признака (75,3%) понижаются до средних сопоставимых значений растений двух мест обитания: 30,5% при гидротермическом стрессе и несколько повышаются при умеренном – 33,3%. Для оценки стрессового воздействия определяли дефицит влаги. У деревьев Московского проспекта его величина составила 16,2%, в Ступино – 8,7%. В первом варианте опыта его уровень увеличивается до 30,0% (Московский проспект) и 24,7% (Ступино), во втором – до 29,2 и 15,3%, соответственно. Среди исследованных образцов Ступинского тест-объекта только 20% полученных максимальных значений дефицита влаги находятся в пределах литературных данных (12-14%). Величина дефицита влаги деревьев Московского проспекта выше контрольных в 1,9 раз. Значений, которые совпадали бы с литературными данными, обнаружено не было. В непосредственной взаимосвязи с изменениями параметров водного режима растений находится концентрация свободного пролина – стрессового метаболита. В контрольном насаждении его содержание по вариантам опыта возрастает: от 3,0 до 4,2 и 11,4 ммМ/г. У деревьев Московского проспекта, изначально более высокий уровень содержания аминокислоты 7,4 ммМ/г при экстремальном стрессе понижается до 2,3 ммМ/г и несколько повышается до 5,1 ммМ/г при умеренном. Как и при анализе водного режима, изначально высокие значения признака в нативном состоянии резко понижаются при действии сильного стресса, и в некоторой степени восстанавливаются до исходных величин при действии умеренного. При сопоставлении полученных данных, видно, что сильный гидротермический стресс «уравнивает» возможности растений к адаптации вне зависимости от генотипа и места произрастания объекта. С другой стороны, умеренный стресс расширяет границы изменения признака, позволяя растениям приспособиться к его действию. Полученные данные не выявили существенных отличий между группами устойчивых и чувствительных форм, но прослеживается прямая зависимость от уровня техногенной нагрузки на насаждения. По-видимому, сосна обыкновенная, произрастающая на экологически благоприятной территории и в условиях отвечающих биологии вида обладает достаточной жизнеспособностью и защитными механизмами, чтобы выжить даже в сильную засуху (2010 г.). Деревьям на техногенно загрязненной территории справиться с такой ситуацией значительно сложнее, что отражается на их морфологии и состоянии.



## Участие кислорода в ответной реакции на механический стресс клеток *Chara corallina*

### Evidence for the involvement of oxygen in mechanical stress response of *Chara corallina* cells

Комарова А.В.<sup>1</sup>, Усманов А.Р.<sup>1</sup>, Горелкин П.В.<sup>1,2</sup>, Ерофеев А.С.<sup>1</sup>, Бибикина Т.Н.<sup>1</sup>, Булычев А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Ленинские горы, д. 1, 119991, г. Москва, Россия

<sup>2</sup> Общество с ограниченной ответственностью “Медицинские нанотехнологии”

+7 495 939-35-03, [ava1945@mail.ru](mailto:ava1945@mail.ru)

Молекулярный кислород играет крайне важную роль в растительном метаболизме и адаптации к изменениям окружающей среды.  $O_2$  является источником активных форм кислорода и окислительного стресса. Генерация избыточного количества АФК может играть как сигнальную, так и защитную функцию при механическом стрессе растений. Предполагается, что в генерации активных форм кислорода при микроповреждениях может участвовать NADPH-оксидаза плазматической мембраны, которая осуществляет перенос электрона с NADPH в цитоплазме на кислород снаружи клетки с образованием АФК (в частности  $H_2O_2$ ). В связи с этим представляется вероятным, что концентрация кислорода в апопласте может меняться при развитии реакций, сопряженных с генерацией АФК. Ранее было показано, что при стимуляции корней *Arabidopsis thaliana* стеклянной микропипеткой первичные стадии механорецепторного ответа заключаются в увеличении концентрации цитоплазматического  $Ca^{2+}$ , генерации активных форм кислорода, закислении цитоплазмы и защелачивании апопласта. Нами был установлен схожий механизм и для фотосинтезирующих клеток зеленой водоросли *Chara corallina*. Основными участниками первичных реакций в ответ на механический стресс являются растяжение плазматической мембраны, потоки  $Ca^{2+}$  и  $H^+(OH^-)$  через плазматическую мембрану. Вместе с тем полная картина происходящих в клетке изменений в ответ на механический стресс отсутствует. Не известна взаимосвязь между развитием реакции на микроповреждение клеточной стенки и уровнем кислорода, транспортом  $O_2$  и метаболизмом. Целью данной работы являлось изучить роли кислорода в рецепторных и ответных реакциях растительных клеток, подвергшихся механическому стрессу. На данный момент отсутствуют работы, в которых проводили измерения уровня кислорода у поверхности клетки при микроповреждении клеточной стенки. Во многом это объясняется отсутствием подходящих способов измерения уровня кислорода на клеточном и субклеточном уровне. За последние десятилетия был достигнут значительный прогресс в области разработки технологий миниатюрных сенсоров, в том числе чувствительных к уровню кислорода. Для измерения содержания  $O_2$  у поверхности клетки мы применили новейшую методику

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

наноразмерных амперометрических сенсоров. Измерения проводили с помощью углеродных нанoeлектродов, функционализированных платиной. Результаты наших исследований показали значительное падение концентрации кислорода у поверхности клетки в ответ на микроперфорацию клеточной стенки *Chara corallina*. Наблюдаемый спад  $O_2$  может быть вызван рядом причин, включая подавление фотосинтеза, активацию дыхания, стимуляцию NADPH-оксидазы плазмалеммы и изменение активности антиоксидантных систем. С помощью ингибиторного анализа было показано, что подавление переноса электрона в электрон-транспортных цепях хлоропластов (под действием 4  $\mu$ M диурона) и митохондрий (под действием 1 mM NaCN) не оказывало эффект на снижение уровня кислорода в апопласте при механической стимуляции клеточной стенки. Инкубация клеток с ингибитором NADPH-оксидазы плазматической мембраны (10  $\mu$ M дифенилениодониум) приводила к устранению значительного падения  $O_2$  снаружи клетки при микроповреждении. Известно, что NADPH-оксидаза плазмалеммы активируется при возрастании уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . Было показано, что при увеличении концентрации  $Ca^{2+}$  в омывающем клетку растворе наблюдалась стимуляция механоиндуцированного спад  $O_2$ , а ингибиторы кальциевых каналов (ионы  $La^{3+}$  и  $Zn^{2+}$ ) вызывали устранение изменений кислорода в апопласте. Полученные данные свидетельствуют о том, что впервые обнаруженное понижение концентрации кислорода при микроперфорации клеточной стенки водоросли *Chara corallina* происходит за счет активации работы NADPH-оксидазы плазматической мембраны.

## Роль фитохромной системы в регуляции фотосинтетических процессов

### Role of phytochrome system in control of photosynthetic processes

<sup>1,2</sup>Креславский В.Д., <sup>1</sup>Ширшикова Г.Н., <sup>1</sup>Шмарев А.Н., <sup>1</sup>Любимов В.Ю.

<sup>1</sup>Институт Фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино, ул. Институтская, 2, 142290, Россия

<sup>2</sup>Институт физиологии растений РАН, г. Москва, Ботаническая ул., 35, 127726, Россия

+7 4967 732988, +7 4967 330532, vkreslav@rambler.ru

Одним из ключевых для физиологии растений вопросов является роль фоторецепторов фитохромов в регуляции активности фотосинтетического аппарата (ФА) в различных световых условиях. Между тем молекулярно-генетические механизмы влияния фитохромной системы на первичные процессы фотосинтеза в разных световых условиях мало изучены, в частности при действии стрессовых факторов. Для того, чтобы восполнить этот пробел было изучено влияние дефицита фитохромов и изменения содержания физиологически активной формы фитохрома на активность фотосистемы 2, содержание фотосинтетических и УФ-поглощающих пигментов, а также уровень транскрипции ряда хлоропластных и ядерных генов. В частности, генов кодирующих фотосинтетические белки (D1 и CAB1), НАДФН-протохлорофиллидоксиоредуктазу (ПОР), хлоропластные антиоксидантные ферменты (sAPX и tAPX), некоторые факторы транскрипции фитохромного сигналинга (HUN, HY5, PIF3 и др.), а также апобелок фитохрома В.

Для исследований были использованы хорошо изученные генетически растения *Arabidopsis thaliana* как дикого типа (ДТ), так и мутантов дефицитных по всем типам фитохрома (Фх) (мутант *hy2*) и только по фитохрому В (мутант *hy3*). Для трансформации фитохрома в физиологически активную форму 23-25-дневные растения кратковременно освещали красным светом (КС) низкой интенсивности (10 - 60 мин, максимум 660 нм, 1-2 Вт м<sup>-2</sup>). Затем исследовали влияние облучения на уровни транскрипции вышеуказанных генов.

Освещение растений дикого типа КС в течение 10 мин не приводило к изменениям уровней транскрипции исследованных нами генов. В тоже время освещение в течение 60 мин приводило к увеличению транскрипционной активности генов антиоксидантных ферментов цитозольной APX1 и тилакоидной tAPX, ПОР, факторов транскрипции HUN, HY5, PIF3, и апобелка фитохрома В. Те же тенденции обнаружены и после 10 мин освещения растений КС, затем их выдерживания в течение 60 мин в темновых условиях. Более того, для генов *HUN* и *APX1* обнаружено, что кратковременное освещение дальним красным светом (ДКС) частично снимает индуцированное КС увеличение уровня транскрипции. Такая КС/ДКС обратимость свидетельствует о вовлечении в индукцию транскрипции ФхВ. В противоположность ДТ, освещение красным светом растений мутанта *hy2* со сниженным синтезом фитохромобилина – хромофора всех типов фитохрома -

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

при тех же условиях приводило к снижению уровня транскрипции генов тилакоидной (tAPX) и стромальной (sAPX) аскорбатпероксидаз, *НУН* и *НУ5*, а также гена халконсинтазы, активность остальных генов, в том числе *psbA* (D1) и *SAB1*, мало изменялась. Отличия по уровню экспрессии вышеперечисленных генов между диким типом и мутантом *hy3* были менее значительны.

Таким образом, облучение КС растений дефицитных по фитохромам приводит не к повышению как у ДТ, а к снижению уровней транскрипции ряда антиоксидантных генов. Это согласуется с заметным увеличением в листьях растений ДТ, кратковременно (10-20 мин) облученных КС, активностей аскорбатпероксидазы (максимальное повышение в 2 раза) и фенилаланин-аммоний-лиазы. Влияние КС на те же активности у мутанта *hy2* было мало.

Не обнаружено заметной разницы по параметрам, характеризующим активность ФС2 (максимальный квантовый выход  $F_v/F_m$  и эффективный квантовый выход  $Y(II)$ ) у ДТ и мутантов в обычных условиях (белый свет, интенсивность  $25 \text{ Вт м}^{-2}$ ). Однако эта разница проявлялась после действия УФ-радиации (максимум 365 нм, 2 ч,  $I = 10 \text{ Вт м}^{-2}$ ). Обнаружено заметно большее снижение активности ФС2 и содержания пигментов у *hy2*, чем у ДТ. При этом предоблучение растений КС, индуцирующее увеличение активной формы фитохрома В, приводило к заметному снятию ингибирующего эффекта УФ-радиации на активность ФА только у ДТ, но не у мутантов, что согласуется с их низкой чувствительностью к КС вследствие дефицита фитохромов.

Из наших данных следует, что дефицит фитохромов, включая фитохром В, который наиболее критичен, приводит к снижению содержания УФ-поглощающих пигментов и каротиноидов, а также к уменьшению активности ряда ключевых ферментов антиоксидантной защиты и снижению устойчивости ФА арабидопсиса к УФ-радиации. Это сдвигает баланс оксидантов и антиоксидантов в сторону оксидантов, что является причиной снижения устойчивости ФС2 и ФА в целом к УФ-радиации и согласуется с обнаруженным нами ранее повышенным содержанием  $\text{H}_2\text{O}_2$  в листьях мутантов по сравнению с ДТ после их облучения УФ. Кроме того, мы предполагаем, что фитохромная система может влиять на устойчивость ФС2 к УФ-радиации путем быстрой регуляции уровня транскрипции некоторых генов антиоксидантной защиты и фитохромного сигналинга.

Работа была поддержана грантом РФФИ №15-04-01199а.

## Вирусы растений: идентификация нового блока генов транспортных белков

Plant virus: identification of novel movement gene block

Лазарева Е.А.<sup>1</sup>, Лезжов А.А.<sup>1</sup>, Морозов С.Ю.<sup>1,2</sup>, Хейнлейн М.<sup>3</sup>, Соловьев А.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра вирусологии, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP), Centre National de la Recherche Scientifique Strasbourg, France

*lazareva-katrina@mail.ru*

Успех вирусной инфекции определяется в значительной мере способностью вируса к межклеточному транспорту. Для своего распространения вирус эксплуатирует транспортные системы растения, а именно плазмодесмы, по которым осуществляется межклеточный транспорт небольших метаболитов и макромолекул. Транспорт вируса через плазмодесмы требует участия специализированных транспортных белков (ТБ), кодируемых вирусом. Эти белки обеспечивают доставку вирусного генома к плазмодесме, их транслокацию в соседние клетки и дальнейший дальний транспорт по флоэме. У различных вирусов ТБ характеризуются удивительным разнообразием генной организации, а также структуры и биохимических свойств. В настоящий момент описано и идентифицировано несколько типов вирусных транспортных систем, где функцию транспорта может выполнять один ТБ или же функции распределены между несколькими ТБ.

В настоящей работе был изучен блок генов, ответственных за транспорт, у недавно открытого и в связи с этим плохо охарактеризованного вируса зеленой пятнистости гибискуса (*Hibiscus green spot virus* (HGSV), род *Higrevirus*). HGSV представляет собой РНК-содержащий вирус с сегментированным геномом положительной полярности. В его геноме ранее были описаны кодирующие последовательности трех белков, которые имеют отдаленное родство с транспортными белками, кодируемыми тройным блоком генов, консервативным генным модулем ответственным за транспорт многих вирусов из семейств *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae* и *Virgaviridae*, а также из рода *Benyvirus*.

Для того, чтобы изучить функциональную роль ТБ HGSV в межклеточном транспорте вируса, их кодирующие последовательности были клонированы в бинарный вектор под контроль 35S промотера вируса мозаики цветной капусты и изучены методом комплементации транспорта, в котором был использован гетерологичный вирусный геном X-вируса картофеля, дефицитный по транспорту. Оказалось, что в отличие от PVX, для которого все три кодируемых ТБ необходимы для транспорта, для HGSV необходимыми и достаточными для обеспечения межклеточного транспорта оказались только два белка, кодируемых РНК2 вируса.

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

Для изучения внутриклеточной локализации ТБ HGSV, их гены были слиты в одной рамке трансляции с флуоресцентными белками GFP и/или mRFP. Полученные конструкции индивидуально или в разных комбинациях друг с другом временно экспрессировали в растениях *Nicotiana benthamiana* и анализировали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Кроме того, GFP/mRFP фьюжены ТБ HGSV были ко-экспрессированы с флуоресцентными маркерами различных клеточных структур. Нами была показана возможность ко-транспорта ТБ к периферии клетки, их транслокация в центральную полость плазмодесмы и далее в соседние клетки даже отсутствие вирусной инфекции.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что транспортная система HGSV представляет собой новый тип транспортного модуля, расширяющего представления о разнообразии вирусных транспортных систем. Наши экспериментальные данные согласуются с проведенным нами ранее анализом последовательностей вирус-подобных РНК, обнаруженных в транскриптах *Lathyrus sativus* и *Litchi chinesis*, которые кодируют два белка крайне сходных с ТБ HGSV. Дальнейшее изучение транспортной системы HGSV может способствовать пониманию основополагающих принципов функционирования вирусных транспортных систем и их эволюции.

## Фитохром-В-зависимое переключение энергетики клетки с темного дыхания на фотосинтетическое восстановление углерода

The phytochromB-dependent switching of cell energetic from dark respiration to photosynthetic carbon reduction

Любимов В.Ю., Креславский В.Д.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Институтская 2, Пушкино, Россия

+7 4967 73-29-88, [lvyyu99@mail.ru](mailto:lvyyu99@mail.ru), [vkreslav@rambler.ru](mailto:vkreslav@rambler.ru)

Реакции и процессы высших растений, управляемые фитохромами, изучаются давно и интенсивно. Главным образом, исследованиями были охвачены морфогенетические реакции, дальний транспорт и устойчивость фотосинтетического аппарата в стрессовых условиях. Последнее время интенсивно исследуется влияние активных форм фитохромов на окислительно-восстановительный гомеостаз растительной клетки. И совсем мало уделялось до сих пор внимания возможному фитохром-опосредованному регулированию активности ферментов углеродного метаболизма, как на транскрипционно/трансляционном, так и на пост-трансляционном уровне.

Эксперименты проводили на 10-дневных проростках пшеницы (*Triticum aestivum* L), вывращенной на белом свете (16 часов, 60 мкмоль квантов  $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ ), на песке с питательным раствором Кноопа (100 мл на 450 г песка) при температуре 20-22°C и относительной влажности воздуха 50-60%. Красный и дальний красный свет получали от светодиодов ( $\lambda=656 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{1/2}=26 \text{ нм}$ , 80 мкмоль квантов  $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$  и  $\lambda=737 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{1/2}=30 \text{ нм}$ , 15 мкмоль квантов  $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ , соответственно). Дозирование КС осуществляли с помощью варьирования времени облучения: 5 мин (4,38 кДж  $\text{м}^{-2}$ ), 10 мин (8,76 кДж  $\text{м}^{-2}$ ) и 20 мин (17,50 кДж  $\text{м}^{-2}$ ), а ДКС облучали в течение 20 мин (3,00 кДж  $\text{м}^{-2}$ ). Активность ФГА-дегидрогеназного комплекса (3-ФГК-киназа и ФГА-ДГГ) в суммарном белковом экстракте из листьев пшеницы измеряли в присутствии 3-ФГК по окислению никотинамидадениндинуклеотидов: хлоропластную – НАДФ\*Н, цитоплазматическую – НАД\*Н.

В конце темного периода (8 часов) активность хлоропластного фермента составляла 1,5-2,0 мкмоль  $\text{мин}^{-1} \text{г}^{-1}$  (свежего веса листа – СВЛ), а цитоплазматического – 7,0-10,0 мкмоль  $\text{мин}^{-1} \text{г}^{-1}$  (СВЛ). Сразу после максимальной дозы КС-облучения (17,50 кДж  $\text{м}^{-2}$ ) активность (НАДФ\*Н)-ДГГ возрастала на 100-120%, а (НАД\*Н)-ДГГ снижалась на 25-30%. Хотя относительные величины эффектов значительно различались, в абсолютном выражении величины были близки: хлоропластный фермент наращивал 1,50-2,40 мкмоль  $\text{мин}^{-1} \text{г}^{-1}$  (СВЛ), а цитоплазматический терял 1,75-3,00 мкмоль  $\text{мин}^{-1} \text{г}^{-1}$  (СВЛ). Надо отметить, что у растений, экспонированных после темного периода на белом свете в течение 2-3 часов, активность хлоропластного фермента всегда была больше «темного» урожая на 10-15%. При тестировании различных доз КС было показано, что с их увеличением от 4,38 кДж  $\text{м}^{-2}$  до 17,50 кДж  $\text{м}^{-2}$  активность (НАДФ\*Н)-ДГГ почти линейно

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

нарастает: 100% (без КС), 125% (5 мин КС), 150% (10 мин КС) и 200-220% (20 мин КС). Являются ли изменения активности ферментов результатом активации фитохромаВ ( $\text{ФхВ}_K \rightarrow \text{ФхВ}_{\text{ДК}}$ ) было проверено в эксперименте, в котором сразу после КС- следовало ДКС-облучение листьев ( $\text{ФхВ}_{\text{ДК}} \rightarrow \text{ФхВ}_K$ ). Было показано, что при такой последовательности световой обработки листьев активность обоих ферментов оставалась на контрольном (темновом) уровне, что может свидетельствовать об участии в этих процессах фитохромаВ. Для выяснения природы активации хлоропластного фермента были проведены эксперименты по динамике последствия КС-облучения. Для этого измеряли активность ферментов сразу после КС-облучения и после выдерживания растений в темноте в течение 30, 60, 120 и 180 минут. Было обнаружено, что активность (НАДФ\*Н)-ДГГ уменьшается уже после первых 30 минут и полностью приходит к контрольной величине к 120 минуте выдерживания в темноте. Аналогичная (обратная) динамика наблюдалась и для цитоплазматического фермента. Эти данные могут свидетельствовать о том, что активация/ингибирование дегидрогеназ вряд ли связаны с транскрипционно/трансляционными процессами. Для этого слишком малы характерные времена, полученные в наших экспериментах. Нельзя говорить и о заметном изменении окислительно-восстановительного гомеостаза фототропадных клеток. Параллельные измерения в тех же условиях активности ДАБ-пероксидазы и фотохимических параметров фотосистемы 2 ( $Y_{II}$  и  $F_v/F_m$ ) показали отсутствие таких изменений.

Для чего же фотоавтотрофной клетке такая взаимообратная регуляция ключевых оксидоредуктазных комплексов? Ещё в 70-х годах прошлого века было экспериментально доказано, что на свету в фотоавтотрофной клетке уровень метаболизма темнового дыхания значительно снижается. В дискуссиях того времени превалировало мнение, что происходит это по причине оттока неорганического фосфата из митохондрий в освещённые хлоропласты, вслед за чем дыхательный контроль тормозит митохондриальный транспорт электронов и потребление, таким образом, субстратов темнового дыхания. Представленные нами данные могут свидетельствовать о том, что регуляция соотношения потоков углерода по дыхательному и фотосинтетическому пути может осуществляться через соотношение активности хлоропластного и цитоплазматического ФГА-дегидрогеназного комплексов, опосредованное реакцией  $\text{ФхВ}_K \rightleftharpoons \text{ФхВ}_{\text{ДК}}$ . В совокупности с данными Попова В.Н. с соавторами, показавшими фитохром-зависимое ингибирование сукцинатдегидрогеназы, складывается достаточно полная картина регуляции переключения углеродного метаболизма с дыхательного на фотосинтетический при переходе темнота  $\rightarrow$  свет. Хотя не следует исключать возможность фитохромной регуляции и других ферментов углеродного метаболизма (рубиско, фосфорибулокиназа и т.д.)

Исследования поддержаны грантом РФФИ №15-04-01199а



## Роль растительных пероксидаз в метаболизме и сигналинге активных форм азота

The roles of plant peroxidases in the metabolism and signaling of reactive nitrogen species

Минибаева Ф.В.,<sup>1,2</sup> Beckett R.P.,<sup>3</sup> Гурьянов О.П.,<sup>1</sup> Викторова Л.В.,<sup>1</sup> Трифонова Т.В.,<sup>1</sup> Часов А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111, ул. Лобачевского, 2/31, Казань, Россия

+7 843 2319045, +7 843 2927347, [minibayeva@kibb.knc.ru](mailto:minibayeva@kibb.knc.ru)

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420000 ул. Кремлевская, 18, Казань, Россия

<sup>3</sup>School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, South Africa

Роль пероксидаз в детоксикации и образовании активных форм кислорода (АФК) в растениях хорошо изучена. Напротив, о роли пероксидаз в метаболизме активных форм азота (АФА) известно крайне мало. Активные формы азота являются сигнальными молекулами, вовлеченными в ответы растений на действие биотических и абиотических стрессовых факторов, а также в процессы роста и развития растений. Вследствие постоянных взаимных трансформаций АФА и АФК, а также ввиду версатильной природы пероксидаз, механизмы взаимодействия между этими оксидоредуктазами и азот-содержащими соединениями сложны и разнообразны и имеют важное регуляторное значение. Эти взаимодействия могут быть частью сигнальных каскадов, поскольку сопровождаются образованием или связыванием АФА, что влияет на активность компонентов путей трансдукции сигналов, особенно при стрессе. Образование АФА пероксидазами было продемонстрировано для некоторых пероксидаз животных, например, лактропероксидазы, и растений, например, при окислении гидроксимочевины пероксидазой хрена в присутствии перекиси водорода. Более типичной реакцией является связывание NO пероксидазами, что регулирует содержание NO в клетке. Способность связывать NO является общим свойством всех гем-содержащих белков. Особенно убедительно это показано для гемоглобинов, которые, как известно, могут проявлять пероксидазную активность. Взаимодействие АФА с пероксидазами обеспечивает ключевые механизмы посттрансляционных модификаций вследствие катализируемого пероксидазами нитрования производных тирозина и триптофана в белках в присутствии нитрита и перекиси водорода, а также S-нитрозилирования белков. В растениях нитрование тирозина вовлечено в метаболические процессы, например, организацию микротрубочек, а также стрессовые ответы. Кроме того, взаимодействие пероксидаз с АФА и другими азот-содержащими соединениями может привести к формированию нитрофенолов, обладающих защитными и токсичными свойствами. Так, нами было показано, что образование нитропроизводного соединения *para*-кумаровой кислоты

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

пероксидазами из корней проростков пшеницы проходит через образование первичных и вторичных феноксильных радикалов, детектированных с помощью ЭПР. Образование нитрофенолов как результат со-окисления фенолов и азот-содержащих соединений пероксидазами может играть важную защитную роль в предотвращении токсичного нитрования белков. Еще одним свойством некоторых грибных и бактериальных пероксидаз является способность метаболизировать синтетические производные нитрофенолов и обеспечивать, таким образом, эффективный механизм удаления токсичных соединений, в том числе ксенобиотиков. Таким образом, взаимодействие АФА и пероксидаз может обеспечивать тонкую регуляцию повреждающих и сигнальных эффектов АФА и АФК.

Функциональная роль белка CLCE *Arabidopsis thaliana* (L.)  
Heynh в светозависимом закислении люмена тилакоидов

The functional role of the CLCE protein of *Arabidopsis thaliana* (L.)  
Heynh in light-dependent acidification of thylakoid lumen

Неделяева О.И.<sup>2</sup>, Харитонашвили Е.В.<sup>1</sup>, Жигалова Т.В.<sup>1</sup>,  
Аверчева О.В.<sup>1</sup>, Беляев Д.В.<sup>2,3</sup>, Мясоедов Н.А.<sup>2</sup>, Балнокин Ю.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное образовательное учреждение высшего  
профессионального образования Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова, г. Москва

+7 916 882-60-55, [olga.nedelyaeva@yandex.ru](mailto:olga.nedelyaeva@yandex.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
физиологии растений им. К.А.Тимирязева Российской академии наук, г.  
Москва

+7 499 977-92-18, +7 499 231-83-93, [balnokin@mail.ru](mailto:balnokin@mail.ru)

<sup>3</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования Московский физико-технический  
институт (государственный университет), г. Долгопрудный

+7 499 231-83-02, [bdv@ippras.ru](mailto:bdv@ippras.ru)

Семейство CLC-белков включает Cl<sup>-</sup>-каналы и анион/протонные антипортеры. Гены *CLC* и их продукты идентифицированы в организмах всех царств и вовлечены во многие физиологические функции. В клетках *Arabidopsis thaliana* обнаружено семь генов этого семейства, *CLCa-e*, продукты которых локализованы в разных внутриклеточных мембранах. Одним из белков семейства CLC, функции и физиологическая роль которых наименее изучена, является белок тилакоидной мембраны AtCLCe. Ранее была предпринята попытка оценить функциональную роль AtCLCe в фотосинтезе путем изучения индукционных кривых флуоресценции хлорофилла (кривые Каутского) у мутантов *A. thaliana clce* и растений дикого типа (WT) (Marmagne et al., 2007). Полученные данные (более низкий уровень флуоресценции у мутантов, чем у WT в быстрой фазе индукции флуоресценции) привели авторов к предположению, что у мутантов снижена анионная проницаемость тилакоидной мембраны и по этой причине изменен ионный состав люмена тилакоидов.

В настоящей работе оценивали функциональную роль анионного канала/транспортера AtCLCe тилакоидной мембраны хлоропластов путем изучения влияния мутации по гену этого белка, *clce-2*, на активность фотосинтетического аппарата *A. thaliana*. С этой целью у мутантных растений, гомозиготных по *clce-2*, и растений ДТ экотипа Col-0 исследовали фотосинтез по параметрам флуоресценции хлорофилла, окислительно-восстановительных превращений P<sub>700</sub> и электрохромного эффекта (длинноволнового сдвига поглощения каротиноидов). Измерения проводили с помощью импульсного флуориметра Dual-PAM-100. Отбор семян гомозиготной линии был

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

осуществлен методом ПЦР. Растения выращивали в почве в факторостатной камере при температуре 22°C, фотопериоде 12 час и интенсивности света 100 моль фотонов/(м<sup>2</sup>·с). Перед измерениями растения в течение 3 час выдерживали в темноте.

У мутанта и дикого типа мало различались значения максимального квантового выхода флуоресценции хлорофилла (Fv/Fm), коэффициента фотохимического тушения флуоресценции (qP), эффективного квантового выхода разделения зарядов во второй фотосистеме Y(II) и скорости транспорта электронов через ФСII, ETR(II). Нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ) и квантовый выход регулируемого нефотохимического тушения флуоресценции, Y(NPQ), отражающие энергозависимую тепловую диссипацию энергии возбужденного хлорофилла, у мутанта увеличивались. Коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции (qN) также был выше, а квантовый выход нерегулируемого нефотохимического тушения флуоресценции Y(NO) – ниже, чем у ДТ. С помощью модуля флуориметра (P515/535) оценили обе составляющие градиента электрохимического потенциала протона –  $\Delta\psi$  и  $\Delta pH$ . У мутантных растений доля  $\Delta\psi$  в градиенте электрохимического потенциала H<sup>+</sup> была больше, а доля  $\Delta pH$  меньше, чем у растений WT. При этом их сумма была такой же, как у WT.

Можно предположить, что увеличение отношения  $\Delta\psi/\Delta pH$  у мутанта является следствием снижения анионной проводимости тилакоидной мембраны. Активирование NPQ, по-видимому, обеспечивает эффективное функционирование ЭТЦ при пониженной проницаемости тилакоидной мембраны. Механизм активирования NPQ, которое обычно происходит в ответ на возрастание  $\Delta pH$ , остается неизвестным.

Работа поддержана грантами РФФИ 15-04-04712а и 16-34-00991мол\_а.

Донорно-акцепторные отношения листового аппарата и тканей ствола у разных форм березы повислой (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* и var. *carelica* (Mercklin)

The donor-acceptor interactions of leaves and trunk tissues in different forms of silver birch (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* and var. *carelica* (Mercklin)

Никерова К.М., Галибина Н.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт леса Карельского научного центра Российской академии наук. ул.  
Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910  
+7 8142 76-81-60, knikerova@yandex.ru, galibina@krc.karelia.ru

Карельская береза является известным объектом для изучения структурных аномалий ствола древесных растений. Она обладает одним из наиболее ярко выраженных отклонений от нормального развития – наличием узорчатой древесины. Показано, что формирование структурных аномалий древесины у карельской березы связано с повышением уровня сахарозы во флоэме в период активной камбиальной деятельности. Для утилизации сахарозы необходимы ферменты ее метаболизации – инвертазы и сахарозинтазы.

В период активного камбиального роста в тканях ствола у растений с узорчатой древесиной (*B. pendula* var. *carelica*) пероксидазная активность выше, чем у растений без признаков узорчатости (*B. pendula* var. *pendula*). Высокая активность пероксидазы у *B. pendula* var. *carelica* коррелирует с высокой активностью апопластной инвертазы. Это связано с тем, что гидролиз сахарозы у березы происходит преимущественно по инвертазному пути, в результате которого дисахарид расщепляется на глюкозу и фруктозу. Избыток гексоз утилизируется за счет работы цикла Кребса и пентозофосфатного пути. При этом образуются АФК за счет деятельности ферментов дегидрогеназ и оксигеназ и синтезируются вещества фенольной природы. Фенолы могут стать субстратами пероксидазного окисления и привести к возрастанию пероксидазной активности во флоэме, в результате чего организм избавляется от вредного воздействия АФК.

Следует отметить, что биохимические отличия выявлены не только при изучении тканей ствола, но также и в листовом аппарате. Пероксидазная активность в листьях var. *pendula* выше, чем в листьях у var. *carelica*, кроме того у карельской березы на разных этапах онтогенеза содержание пигментов и значения ССК выше по сравнению с обычной березой повислой.

Получается, что при усилении акцепторных свойств камбиальной зоны, увеличивается запрос в сторону листьев, которые становятся донорами ассимилятов для тканей ствола. Камбий, как гетеротрофная ткань, зависимая от притока ассимилятов, таким образом, инициирует фотосинтетическую активность листа.

Высокие значения ССК у карельской березы говорят о лучшем улавливании света, следовательно, о более активном фотосинтезе и интенсивном потоке образующихся в ходе него углеводов. Более того, ранее было показано

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

наличие в кроне карельской березы большого количества брахибластов и большего количества на них листьев, которые также могут увеличить количество поступающих в ствол ассимилятов углеводной природы. Сахароза, как главная транспортная форма углеводов, в свою очередь, обеспечивает дифференциацию клеток запасующей паренхимы, лежащей в основе нарушения камбиальной деятельности и развития аномалий.

Таким образом, при интенсивном оттоке ассимилятов из листа в нем замедляются метаболические процессы, не образуются субстраты пероксидазного окисления, что становится причиной снижения активности пероксидазы. Напротив, в тканях ствола активно идут процессы дыхания и синтеза запасных метаболитов, что приводит к образованию АФК и, тем самым, повышает пероксидазную активность, особенно во флоэме. Закономерно, что высокая активность пероксидазы коррелирует с расщеплением сахарозы по инвертазному пути.

У обычной березы повислой пониженный отток ассимилятов в ткани ствола сопровождается более высокой по сравнению с карельской березой активностью пероксидазы в листе за счет наличия метаболитов. Нарушения камбиальной деятельности не происходит. Активность пероксидазы в ствольных тканях намного ниже, чем у карельской березы.

Изменение донорно-акцепторных отношений происходит на уровне всего растительного организма. Важно, что они наблюдаются тогда, когда еще нет видимых признаков аномалий. Интересно было бы обнаружить выявленные закономерности, начиная с этапа разворачивания листьев у сеянцев, так как лист мог бы стать удобным тест-материалом для ранней идентификации узорчатости.

Для этого, нами впервые было проведено исследование активности ферментов антиоксидантной системы в онтогенезе листа 10-месячных сеянцев обычной березы повислой и карельской березы. Получено, что активность пероксидазы и каталазы значимо выше у сеянцев обычной березой повислой по сравнению с карельской березой на всех изучаемых стадиях. Обнаруженная закономерность повторяет таковую у взрослых деревьев. Таким образом, даже на самых ранних этапах онтогенеза наблюдается выявленное нами нарушение донорно-акцепторных отношений.

## Изменение содержания транскриптов генов *TaHSP70*, *TaHSP90* и *BI-1* в листьях проростков пшеницы при действии высоких температур

Changing the content of transcripts of genes *TaHSP70*, *TaHSP90* and *BI-1* in the leaves of wheat seedlings under the influence of high temperatures

Нилова И.А., Топчиева Л.В., Титов А.Ф.

ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра РАН

ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Россия

+7 8142 76-27-12, [im-ira@mail.ru](mailto:im-ira@mail.ru)

Действие на растения высоких температур может приводить к накоплению в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и цитозоле их клеток большого количества неправильно упакованных белков. Поэтому усиление контроля за качеством белка в клетках растений является важной составляющей формирования их теплоустойчивости. Предполагается, что в начальный момент действия неблагоприятных температур, особую роль в протеолизе нативных белков с нарушенной структурой играют высокомолекулярные белки теплового шока (БТШ). Кроме того, сам ЭР имеет сложную систему контроля качества белка, а одним из главных компонентов этой системы является белок Вах ингибитор (BI-1). Однако, роль БТШ и Вах-1 в повышении теплоустойчивости, особенно при действии на растений разных по интенсивности высоких температур, изучена недостаточно. В связи с этим цель нашей работы состояла в исследовании динамики уровня транскриптов генов *TaHSP70*, *TaHSP90* и *BI-1* в листьях проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), подвергнутых действию температуры 33°, 37° или 43°C. Исследования проводили на недельных проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, выращенных в камерах искусственного климата в стандартных условиях. Затем их подвергали действию температур 33°, 37° или 43°C. Продолжительность данного воздействия составляла от 30 мин. до 3 сут. Устойчивость растений оценивали по температуре, вызывающей гибель 50% палисадных клеток листа ( $JT_{50}$ ) после 5-минутного прогрева листовых высеков в водном термостате. Оводненность растений определяли общепринятым методом. Для изучения уровня транскриптов генов использовали метод ПЦР в режиме реального времени.

Полученные результаты показали, что действие на растения температур 33° и 37°C приводит к существенному росту теплоустойчивости, т.е. к их тепловому закаливанию. При этом прирост теплоустойчивости растений под влиянием температуры 37°C был значительно выше, чем при действии температуры 33°C и он сопровождался в обоих случаях небольшим увеличением оводненности. В отличие от этого температура 43°C вызывала некоторое повышение теплоустойчивости растений только в первые часы её действия, а затем начиная со 2 часа эксперимента происходило её резкое снижение и в дальнейшем наблюдалась гибель растений. Оводненность при температуре 43°C существенно снижалась на протяжении всех трех суток эксперимента. Помимо этого, установлено, что в начальный период действия всех

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

исследуемых температур в листьях проростков происходило накопление транскриптов генов *TaHSP70*, *TaHSP90*. Но, содержание мРНК этих генов зависело от интенсивности действующей температуры: чем выше была действующая на растения температура, тем выше был уровень транскриптов каждого гена. Однако, через час от начала эксперимента содержание мРНК этих генов начинало снижаться. При действии на проростки температуры 33° и 37°С в клетках их листьев уже через 15 мин зафиксировано повышение уровня транскриптов гена *BI-1*, который в дальнейшем сохранялся практически без изменений. Отметим, что содержание мРНК данного гена было значительно выше при действии на растения температуры 37°С, чем при 33°С. Под влияние температуры 43°С происходило многократное повышение содержания транскриптов гена *BI-1* в листьях, которое затем сменялось резким его падением.

Таким образом, из полученных данных следует, что реакция растений пшеницы на тепловой стресс, наряду со многими другими структурно-функциональными преобразованиями, связана с изменением экспрессии генов, являющихся компонентами система контроля за качеством белка в растительных клетках: *TaHSP70*, *TaHSP90*, *BI-1*. Однако в условиях пролонгированного действия субповреждающих температур (33° и 37°С) защитные функции клетки выполняет только ген *BI-1*, и эти функции утрачиваются при длительном (более 4-х часов) нахождении проростков в условиях действия повреждающей температуры (43°С).



## Изменение уровня метилирования ДНК и экспрессии генов метилтрансфераз и деметилаз при старении растений *Arabidopsis thaliana*

Age-associated alterations in DNA methylation levels and expression of methyltransferase and demethylase genes in *Arabidopsis thaliana*

Огнева З.В.<sup>1,2</sup>, Дубровина А.С.<sup>2</sup>, Киселев К.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет, Школа естественных наук, г. Владивосток, ул. Октябрьская 27, 690090, Российская Федерация.

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, пр. Столетия Владивостоку, 159, 690022, Российская Федерация

*zlata.v.ogneva@gmail.com*

Цитозиновое метилирование ДНК – это важная эпигенетическая модификация молекулы ДНК без изменения нуклеотидной последовательности, которая осуществляется путем присоединения метильной группы к цитозину в позиции С5 цитозинового кольца. Данный механизм является очень важным для поддержания стабильности генома и регуляции экспрессии генов у высших растений и других организмов. Изменения уровня метилирования ДНК у млекопитающих, как известно, играет важную роль в старении и может вносить свой вклад в патогенез различных ассоциированных со старением заболеваний, но по-прежнему остается неясно, будет ли изменяться уровень метилцитозина во время старения растений и является ли метилирование/деметилование ДНК процессом, способствующим старению растений. Поэтому целью данной работы было выяснить, влияет ли хронологический возраст растения *Arabidopsis thaliana* на уровень метилирования ядерной ДНК и на экспрессию генов метилтрансфераз и деметилаз. Выбор объекта исследований объясняется тем, что *A. thaliana* хорошо изучен на молекулярно-биологическом уровне и то, что весь его жизненный цикл проходит в течении 3-4 месяцев.

Уровень и распределение метилированного цитозина определяется с помощью двух механизмов: метилирования ДНК, с участием ферментов метилтрансфераз, и деметилирования ДНК, с участием деметилаз. Основными метилтрансферазами ДНК у *A. thaliana* являются ферменты MET1, CMT3, DRM1 и DRM2, которые на уровне аминокислотной последовательности подобны метилтрансферазам ДНК у млекопитающих. DRM1 и DRM2 предположительно участвуют в *de novo* метилировании ДНК. Более того DRM2 участвует еще и в поддержании метилирования на более поздних стадиях развития. CMT3 и MET1 главным образом выполняют функцию поддерживающего метилирования ДНК. Наиболее изученными деметилазами у *A. thaliana* являются ROS1 – репрессор сайленсинга, DME – фермент, инициирующий удаление 5-метилцитозина через процесс базовой эксцизионной репарации и ферменты DML2, DML3 необходимые для удаления неправильного 5-метилцитозина.

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

Для сравнения уровня метилирования ДНК на разных стадиях жизненного цикла *A. thaliana* были отобраны по 2 растения после 1, 4, 8 и 12 недель культивирования. С помощью бисульфитного секвенирования и метил-чувствительной рестрикции ДНК показано, что выбранные ядерные участки ДНК (*Actin2* 3'UTR и *ITS1-5.8SrRNA-ITS2* (*ITS*)), как и выделенная тотальная ДНК, гиперметилованы в проростках арабидопсиса и степень метилирования ДНК значительно снижается при развитии и старении растений арабидопсиса *A. thaliana*. Более того, с помощью ПЦР с детекцией результатов в реальном времени показано, что экспрессия генов метилирования ДНК (*CMT* и *MET*) значительно уменьшается, а экспрессия генов деметилаз (*ROS*, *DME*, *DML2*, *DML3*), наоборот, увеличивается с течением времени у растений арабидопсиса, что коррелирует с уменьшением степени метилирования ДНК у растений *A. thaliana*. Это подтверждает данные, полученные с помощью бисульфитного секвенирования и метил-чувствительной рестрикции ДНК. Так же это говорит о том, что наблюдаемое деметилирование ДНК идет за счет уменьшения активности метил трансфераз и за счет увеличения активности деметилаз.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании некой корреляции между старением растений и деметилированием ДНК арабидопсиса. Пока нам не понятны механизмы регулирующие данные процессы и, самое главное, физиологическое значение наблюдаемых изменений, поэтому мы в дальнейшей работе хотим сконцентрировать свое внимание именно на физиологическом значении метилирования ДНК при старении растений.

## Na<sup>+</sup>-транспортирующие АТФазы водорослей

### Na<sup>+</sup>-transporting ATPases in algae

Попова Л.Г., Балнокин Ю.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. 127276 Москва,  
Ботаническая ул., 35. Россия

+7 499 977-92-18, +7 499 977-80-18, lora\_gp@mail.ru

Поддержание низких концентраций Na<sup>+</sup> в цитоплазме является фундаментальной стратегией всех эукариот, обитающих в засоленных средах. Эта стратегия обеспечивается следующими механизмами: (1) ограничением потока ионов Na<sup>+</sup> из наружной среды в цитоплазму, что достигается высокой избирательностью транспортных систем плазматической мембраны к транспортируемому ионам; (2) функционированием специализированных Na<sup>+</sup>-транспортирующих белков в плазматической мембране, выводящих Na<sup>+</sup> из клетки в наружную среду. У эукариотических организмов основную роль в поддержании Na<sup>+</sup>-гомеостаза в цитоплазме играют Na<sup>+</sup>-транспортирующие АТФазы Р-типа, которые способны переносить Na<sup>+</sup> через мембраны против градиента электрохимического потенциала этого иона. Первой открытой и хорошо в настоящее время изученной АТФазой этого класса является Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФаза животных клеток. В последнее время Na<sup>+</sup>-АТФазы найдены у представителей других эукариотических царств: у морских водорослей, дрожжевых грибов, простейших, а также и у примитивных наземных растений. Свойства Na<sup>+</sup>-АТФаз из различных организмов могут существенно различаться. Так, например, для некоторых морских водорослей (*Heterosigma akashiwo*, *Porphyra yezoensis*) было показано наличие Na<sup>+</sup>-АТФаз, схожих с Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазами животных клеток. Na<sup>+</sup>-АТФазы, найденные у дрожжей, формируют особую группу АТФаз дрожжевого типа (т.н. ENA АТФазы). В исследованиях, проводимых нами в течение ряда лет, Na<sup>+</sup>-АТФазы Р-типа были обнаружены у двух видов морских зеленых микроводорослей: *Tetraselmis viridis* и *Dunaliella maritima*. Ферменты были идентифицированы на функциональном уровне, в опытах на выделенных везикулах плазматической мембраны. В этих опытах было продемонстрировано, что везикулы плазматических мембран способны к АТФ-зависимому накоплению ионов Na<sup>+</sup>. Исследования показали, что Na<sup>+</sup>-АТФазы этих микроводорослей обладают чертами как сходства, так и различия. Так, оба фермента являются электрогенными помпами со щелочным оптимумом функционирования (рН 7.5 – 8.0). Выявлена роль различных факторов цитоплазматического окружения (рН, концентрации ионов Na<sup>+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, концентрация АТФ) в регуляции активности этих ферментов. Показано, что Na<sup>+</sup>-АТФаза *T.viridis* функционирует в мембране в виде гомоолигомерного (тетрамерного) комплекса. Однако Na<sup>+</sup>-АТФазы *T.viridis* и *D.maritima* различаются механизмами функционирования: АТФаза *D.maritima* является электрогенным унипортером, тогда как АТФаза *T.viridis* обменивает ионы Na<sup>+</sup> на H<sup>+</sup> со стехиометрией mNa<sup>+</sup>/nH<sup>+</sup> (m>n). Na<sup>+</sup>-АТФаза *T.viridis* клонирована и ее последовательность секвенирована (GenBank: FN 691482.1).

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

Филогенетический анализ показал, что  $\text{Na}^+$ -АТФаза *T. viridis* входит в одну филогенетическую группу с дрожжевыми  $\text{Na}^+$ -АТФазами. В настоящее время продолжается работа по идентификации гена  $\text{Na}^+$ -АТФазы *D. maritima*.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований, гранты № 13-04-01098, № 16-04-01544.

Семейство антимикробных гевеино-подобных пептидов WAMP представляет собой новый структурный тип ингибиторов секретируемых протеаз мицеллиальных грибов

Hevein-type antimicrobial peptides from WAMP family are represented a novel structural type of inhibitors effected against secreted metalloproteases from filamentous fungi

Рогожин Е.А.<sup>1</sup>, Славохотова А.А.<sup>1,2</sup>, Андреев Я.А.<sup>1</sup>, Одинцова Т.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова Российской академии наук, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, Россия

+7 495 336-40-22, [rea21@list.ru](mailto:rea21@list.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.А. Вавилова Российской академии наук, ул. Губкина, 3, Москва, Россия

+7 499 135-11-51, [ann.slav@gmail.com](mailto:ann.slav@gmail.com)

С целью защиты от негативного действия стрессовых факторов окружающей среды (насекомые-вредители, микроорганизмы - возбудители болезней) растений используют многокомпонентную иммунную систему, которая на молекулярном уровне активирует различные пути противодействия, начиная от запуска сигнальных систем, конститутивной и индуцированной экспрессии генов, кодирующих защитные полипептиды и ферменты участвующие в биосинтезе других органических соединений, и заканчивая реализацией комплексных механизмов их действия на фитопатогены. Один из таких комплексных механизмов, или способов, действия был показан для четырех высокомолекулярных гевеино-подобных пептидов с хитин-связывающим доменом - представителей семейства WAMP ("wheat antimicrobial peptides"), выделенных из зерна пшеницы (*Triticum kiharae*), различающихся между собой единственной заменой в 34 положении полипептидной цепи (Ala, Lys, Glu или Asn). Данные молекулы (за исключением первой, содержащей аланин-34), были обнаружены путем трансляции их нуклеотидных последовательностей, амплифицированных с кДНК; в дальнейшем была разработана система получения их рекомбинантных аналогов путем гетерологической экспрессии их синтетических генов в клетках прокариот (*E. coli*), что позволило их функционально охарактеризовать. В конечном итоге были детально изучены два альтернативных способа антимикробного

действия данных пептидов, один из которых - "традиционный" - заключается в ингибирования роста и дифференцировки грибного мицелия (предположительно за счет связывания с хитином клеточной стенки), а второй - в специфичном ингибировании активности цинковой металлопротеиназы (фунгализина), которая, в свою очередь, является фактором вирулентности фитопатогена (*Fusarium verticillioides*), селективно расщепляющим растительные хитиназы класса IV. В рамках настоящего исследования показано влияние вышеуказанной аминокислотной замены на способность гомологичных пептидов WAMP количественно подавлять рост гриба и ингибировать фунгализин. Полученный результат дает возможность рассматривать семейство гевеино-подобных пептидов с хитин-связывающим доменом WAMP как бифункциональные защитные молекулы врожденного иммунитета растений.

Данная работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант № 12-04-00190а) и Стипендией Президента Российской Федерации для молодых ученых (регистрационный номер СП-2093.2015.4).

## Антиоксидантная система растений арабидопсиса при закаливании к холоду

### Antioxidant system of Arabidopsis plants during cold hardening

Синькевич М.С.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия,  
Москва, ул. Ботаническая 35

+7 499 2318326, +7 499 9778018, [sinkevich\\_m@mail.ru](mailto:sinkevich_m@mail.ru)

Изучение механизмов устойчивости растений к низким температурам является важной и актуальной темой в свете того, что огромные территории, в том числе занятые сельскохозяйственными культурами, подвержены действию гипотермии. С фундаментальных позиций представляет интерес изучение молекулярных механизмов устойчивости, что в настоящее время возможно, главным образом, на модельных объектах. С этой точки зрения в качестве объекта исследования хорошо подходят растения *Arabidopsis thaliana*, которые также являются типичными холодостойкими (слабо морозостойкими) растениями.

Способность растений к закаливанию связана с включением присущих им механизмов устойчивости в период действия адаптирующих температур с целью противодействия эффектом более жесткого последующего охлаждения. На сегодняшний день выявлено несколько различных повреждающих факторов, возникающих в связи с пониженной температурой, среди которых важное место занимает окислительный стресс. Успешное противодействие окислительному стрессу отличает холодостойкие виды от теплолюбивых, при этом и те, и те обладают принципиально сходной системой защиты от данного стресса. Важнейшими показателями защиты от окислительного стресса являются скорость образования активных форм кислорода (АФК) и активность ключевых ферментов антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидаз. Целью данной работы было изучить изменения этих параметров в процессе закаливания растений арабидопсиса.

Объектом исследования служили растения *Arabidopsis thaliana* Heinh (L.) экотипа Columbia (Col-0) в возрасте 7-8 недель. Для закаливания растения помещали в климатический шкаф «KBW-240» (Binder GmbH, Германия) на 5 суток при температуре 2°C при освещенности 50 мкмоль фотонов/(м<sup>2</sup> \* с) с 16 часовым фотопериодом. Контролем служили незакаленные растения. Ранее в нашей лаборатории было показано, что растения *Arabidopsis thaliana* после закаливания при 2°C в течение 5 суток повышали свою устойчивость с  $LT_{50} = -3^\circ\text{C}$  до  $LT_{50} = -6^\circ\text{C}$ .

Фракцию растворимых белков выделяли из листьев со всеми принятыми в данной сфере предосторожностями и очищали на колонках PD-10 midiTrap G-25 (GE Healthcare, США), затем использовали для дальнейших определений активностей ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидаз. Скорость генерации оценивали через изменение интенсивности окраски

реакционной смеси с добавлением адреналина на длине волны 480 нм против смеси без адреналина и выражали в долях оптической плотности в минуту. Согласно полученным данным, активность супероксиддисмутазы временно возрастает на 2-3 сутки охлаждения, однако затем снижается до исходных значений. Активность каталазы также временно повышалась на 2-3 сутки закаливания, и также как и активность супероксиддисмутазы постепенно снижалась к концу периода действия низкой температуры. В данной работе мы также оценивали скорость генерации АФК в динамике закаливания и обнаружили, что у растений арабидопсиса, в отличие от изучавшихся в нашей лаборатории ранее растений картофеля, при околонулевых положительных температурах не происходит заметного ускорения генерации АФК: наоборот она сокращается и держится немного ниже исходной в течение всего периода охлаждения. При этом активность супероксиддисмутазы подвергалась изменениям и, таким образом, не повторяла динамику скорости генерации АФК. Предполагается, что это связано с перераспределением вклада различных изоформ супероксиддисмутазы в суммарную активность, что приводит к повышению устойчивости к индуцированному холоду окислительному стрессу за счет увеличения вклада более устойчивых к избытку АФК Mn- и Fe-содержащих супероксиддисмутаз.

В результате работы супероксиддисмутазы более активный супероксидный анион-радикал дисмутирует с образованием менее опасной перекиси водорода, которую, в свою очередь, расщепляют ферменты каталаза и пероксидазы. Активность каталазы была практически неизменна в течение всего периода закаливания в отличие от активности пероксидаз, которая возрастала. Учитывая изначальное различие в уровне активности, данные изменения позволяют сделать заключение о более важной для закаливания роли пероксидаз среди расщепляющих перекись ферментов.

Работа поддержана РФФИ (проект №16-34-01378)

## Структура и экспрессия генов стильбен синтаз у ели аянской *Picea jezoensis* (Sieb. et Zucc.)

Structure and expression of stilbene synthase genes in *Picea jezoensis*

Супрун А.Р.<sup>1,2</sup>, Огнева З.В.<sup>1,2</sup>, Киселев К.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет, Школа естественных наук, г. Владивосток, 690090, ул. Суханова, 8, Российская Федерация

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, 690022, ул. пр-т 100-лет Владивостоку 159

89146508570@yandex.ru

Стильбены растений – это фенольные соединения, которые являются вторичными метаболитами с сильными биологически активными свойствами. К стильбенам относят несколько веществ, но *транс*-резвератрол является ключевым, так как он чаще всего встречается в природе и его дальнейшие модификации приводят к получению ряда других стильбенов. В природе стильбены встречаются у неродственных семейств растений, таких как *Vitaceae*, *Fabaceae*, *Polygonaceae*, *Pinaceae* и др. В растениях стильбены играют важную роль в устойчивости к некоторым биотическим и абиотическим стрессам.

Биосинтез стильбенов подробно описан для экономически важных растений, например для винограда. Тем не менее, на настоящий момент в литературе наблюдается недостаток данных о биосинтезе и экологической роли стильбенов у еловых (род *Picea*). У представителей семейств *Vitaceae*, *Fabaceae* и *Polygonaceae* основными стильбенами являются *m*-резвератрол и его производные. У представителей семейства *Pinaceae* основными стильбенами являются **пиносильвин** и **метил-пиносильвин** (у рода *Pinus*) или **астрингин** и **изорапонтин** (у рода *Picea*).

Возможно несколько путей биосинтеза **астрингина** и **изорапонтина** в клетках представителей рода *Picea*, но на сегодняшний день экспериментально доказан только путь биосинтеза у *Picea abies* с участием белков PaSTS1 и PaSTS2 через биосинтез *m*-резвератрола с использованием кумаровой кислоты. Но этот путь не объясняет наличия в корнях растений рода *Picea* **пицеатаннола** – близкого стильбена к *m*-резвератролу, путь биосинтеза которого использует кофейную кислоту. Поэтому перед нами была поставлена задача – найти все экспрессирующиеся гены *STS* у представителя рода *Picea* (на примере *Picea jezoensis* Sieb. et Zucc.) и изучить их профиль экспрессии в хвое в разные сезоны года.

Образцы хвои, условно разделенные на 3 возрастные группы: молодая (1-2 года), средняя (3-4 года) и старая (более 5 лет), были собраны осенью, зимой, весной и летом в Ботаническом саду-институте ДВО РАН (г. Владивосток). На основе уже имеющихся в GenBank последовательностей *STS* близких видов *P. abies*, *Picea glauca* и *Picea sitchensis* были подобраны вырожденные праймеры под начало и конец белок кодирующей части гена стильбен синтаз.



Интересующие нас фрагменты были амплифицированы, клонированы и секвенированы.

В результате клонирования ПЦР продуктов показано наличие 4-х полноразмерных транскриптов белок кодирующей части генов *STS* у ели *P. jezoensis*: *PjSTS1a*, *PjSTS1b*, *PjSTS2* и *PjSTS3*. По нуклеотидной и выведенной белковой последовательности полученные гены были близки к ранее описанным генам *STS* представителей рода *Picea*, это подтверждает то, что мы секвенировали именно гены *STS*.

В результате проделанной работы, на основе анализа встречаемости ПЦР продуктов, было показано, что уровень экспрессии 4-х исследуемых генов значительно отличался в зависимости от времени года и возраста исследуемой ткани. С помощью ПЦР с детекцией результатов в реальном времени был подтвержден профиль экспрессии, полученный с помощью анализа частоты встречаемости клонированных ПЦР продуктов.

Таким образом, мы показали наличие 4-х экспрессируемых генов *STS* в геноме представителя рода *Picea* на примере *P. jezoensis*, хотя ранее было известно всего о 2-х представителях у видов этого рода. Поэтому, возможно, какие-то из описанных генов кодируют *STS*, способные использовать в качестве субстрата кофейную кислоту и синтезировать в один шаг **пицетаннол**, но это требует дополнительных исследований.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (14-14-00366).

Изменение уровня цитозинового метилирования в составе генов биосинтеза стильбенов в клетках винограда *Vitis amurensis* Rupr. под действием ультрафиолета

Alternations in cytosine methylation within stilbene biosynthesis genes in response to ultraviolet irradiation in *Vitis amurensis* Rupr. cells

Тюнин А.П., Киселев К.В.

Федеральное государственное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия, 690022

+7 423 231-07-18, tyunin@biosoil.ru

Ультрафиолет (УФ), излучаемый солнцем, играет важную роль в онтогенезе растений, выступая в качестве одного из главных стресс-факторов окружающей среды. Достоверно известно, что длительное воздействие ультрафиолета на растительную клетку ведет к множественным повреждениям молекул нуклеиновых кислот и белков, приводя к деградации надмолекулярные структуры растительной клетки. Обладая ярко выраженным разрушающим действием на клетки растений, УФ является хорошо изученным индуктором вторичного метаболизма растений. Множество научных исследований, проведенных на клетках винограда, свидетельствуют о повышении уровня содержания вторичных метаболитов, относящихся к группе стильбенов, в ответ на действие УФ. Установлено, что, обладая уникальными биологическими свойствами, стильбены способны предотвращать множество деструктивных эффектов действия УФ, при этом механизм индукции биосинтеза стильбенов до сих пор детально не изучен.

Данное исследование посвящено изучению влияния УФ на транскрипционную регуляцию генов биосинтеза стильбенов (*VaPAL*, *VaSTS*) в клетках амурского винограда *Vitis amurensis* Rupr. Известно, что биосинтез стильбенов идет фенилпропаноидным путем вторичного метаболизма. Фенилаланин-аммиак-лиаза (PAL) является первым ферментом данного биосинтетического пути, а стильбенсинтаза непосредственно катализирует реакцию образования резвератрола – основоположника всех стильбенов винограда. В геноме растений, продуцирующих стильбены, ферменты PAL и STS представлены семействами близкородственных генов. Благодаря последним работам, большое количество генов PAL и STS можно объяснить особенностями процессов, в которых участвуют белковые продукты их экспрессии, и разнообразием стимулов, в ответ на которые эти гены экспрессируются. В ходе проведенной работы нам удалось установить, что длительное воздействие ультрафиолета на клетки *V. amurensis* приводит к статистически значимому увеличению продукции резвератрола за счет активации экспрессии отдельных генов *VaPAL* и *VaSTS*. При этом нам удалось установить, что увеличение экспрессии упомянутых генов сопровождается значительным уменьшением уровня цитозинового метилирования в составе их нуклеотидной последовательности, что позволяет предположить прямое

участие данного эпигенетического фактора в процессе ответа клеток *V. amurensis* на данный тип стресса.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (Грант №14-14-00366).

## Пути приспособления растений к недостатку кислорода и последующему окислительному стрессу

### Pathways of plant adaptation to oxygen deficiency and subsequent oxidative stress

Чиркова Т.В., Емельянов В.В., Ласточкин В.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб.

7/9, 199034, Санкт-Петербург, Россия

+7 812 3289695, [bootika@mail.ru](mailto:bootika@mail.ru)

Стратегия приспособления растений к стрессовым факторам внешней среды состоит, прежде всего, в попытках организма избежать неблагоприятного воздействия. При недостатке кислорода в корнях (корневая гипоксия) этому способствует поглощение листьями большего, чем требуется им самим, количества кислорода, транспорт его в корни и образование необходимых для этого анатомо-морфологических приспособлений (аэренхима). При увеличении силы эффекта, еще при определенном уровне гипоксии, доминирующими становятся метаболические перестройки. Они состоят либо в снижении интенсивности обмена веществ, либо в приспособлении к функционированию при недостатке или отсутствии кислорода, т.е. при аноксии.

В связи со спецификой воздействия перестройки затрагивают, прежде всего, процесс дыхания. Они представляют собой компенсаторные изменения, включающие в той или иной мере и начальные, и промежуточные, и конечные его этапы. Более того, поскольку дыхание является центральным процессом обмена веществ, приспособления его у устойчивых растений влекут за собой сдвиги в белковом, липидном и гормональном метаболизме, составе и функциональных особенностях мембран, в своеобразии работы систем регуляции. У приспособленных к недостатку кислорода растений длительное поддержание анаэробных механизмов дыхательного обмена способствует сохранению роста органов, необходимых для выживания в указанных условиях, и соответствующим изменениям в балансе гормонов. Для них характерно торможение распада белков и способность синтезировать белки, в основном, ферменты гликолиза и брожения, а также адаптивные изменения в липидном обмене. Устойчивые к гипо- и аноксии растения отличаются большей стабильностью клеточных мембран. Целостность и функциональная активность плазмалеммы, тонопласта, мембран митохондрий и хлоропластов дольше сохраняется неповрежденными при кислородной недостаточности. Благодаря указанным трансформациям обмена и большей стойкости мембран у приспособленных растений обеспечивается длительное поддержание

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

гомеостаза: уровня внутриклеточного рН, окислительно-восстановительного потенциала, энергетического статуса.

Поскольку в естественной среде обитания вслед за периодом кислородной недостаточности обычно следует восстановление аэробных условий, растения оказываются в условиях другого стрессорного воздействия – пост-аноксического окисления. Накопившиеся во время кислородного голодания восстановленные и недоокисленные субстраты окисляются кислородом воздуха, что приводит к генерации активных форм кислорода (АФК) и развитию пост-аноксических повреждений, которые могут способствовать гибели растения даже в том случае, если оно пережило условия аноксии. Именно АФК, а также ионы кальция участвуют в работе системы сигналинга при аноксии, которая наиболее эффективно функционирует у устойчивого объекта. Большая продукция активных форм кислорода (супероксид-аниона и пероксида водорода) и развитие окислительных повреждений липидов (перекисное окисление липидов – ПОЛ) и белков (карбонилирование) обнаружено у менее приспособленного объекта под действием аноксии и пост-аноксического окислительного стресса. Вместе с тем, относительно постоянное содержание АФК в клетках устойчивого объекта позволяет сохранить довольно низкий уровень ПОЛ и воспрепятствовать окислительной модификации белков клетки, что может быть связано с работой антиоксидантной системы (АОС). Действительно, на биохимическом и транскрипционном уровне показана интенсивная работа АОС и, в том числе, аскорбат-глутатионового цикла у приспособленного растения при аноксии и окислительном стрессе.

Таким образом, растение, устойчивое к кислородной недостаточности, способно лучше противостоять также и окислительному стрессу, возникающему при выходе растения из анаэробной среды в условия аэрации. Исследования поддержаны грантами РФФИ 12-04-01029 и 15-04-03090.

## Стендовые доклады

Исследование линий риса с различной устойчивостью к полному затоплению

Study of rice lines with different tolerance to complete flooding

Азарин К.В.<sup>1</sup>, Усатов А.В.<sup>1</sup>, Макаренко М.С.<sup>1</sup>, Костылев П.И.<sup>2</sup>, Федоренко А.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Южный федеральный университет, 344090, Россия, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

<sup>2</sup>ВНИИ зерновых культур им. И.Г. Калининко, 347740, Россия, г. Зерноград, Науч. городок, 3

azkir@rambler.ru

Безгербицидная технология выращивания риса подразумевает повышение слоя воды в чеках более 30 см на этапе прорастания семян. При этом из-за недостатка кислорода часто наблюдается массовая гибель не только сорных растений, но и проростков самой культуры. В недавних работах было показано, что устойчивость к гипоксии (затоплению) у риса связана с генами первичного ответа на этилен, такими как *Sub1A* и *Sk*. При этом растения, несущие локус *Sub1A*, под действием водного стресса демонстрируют остановку в росте, что помогает им избегать энергетических потерь и переносить нехватку кислорода более трех недель, возобновляя нормальный рост после снижения уровня воды. В противоположность этому, экспрессия генов *Sk* в условиях затопления инициирует энергичный рост, за счет чего сокращается время преодоления водяной толщи и период нахождения растения в условиях дефицита кислорода.

Целью работы является сравнительный анализ линий риса с различной устойчивостью к полному затоплению. Материалом исследования служили селекционные образцы *Oryza sativa ssp. japonica* (20 отечественные линии) и *ssp. indica* (4 иностранные линии) из коллекции ВНИИ зерновых культур. Растения выращивали из под слоя воды (50 см) в течение 21 суток. Для молекулярно-генетического анализа были подобраны праймеры к последовательностям генов *Sub1A*, *Sk1* и *Sk2*, кодирующих этилен зависимый фактор транскрипции и активирующихся в условиях затопления.

В результате лабораторных испытаний по показателю выживаемости исследуемые генотипы риса были разделены на устойчивые (> 80 % от контроля) и неустойчивые (< 65 % от контроля). По скорости роста устойчивые формы разделились на две группы. Первая была представлена иностранными формами подвида *indica* и отличалась снижением ростовых процессов в 4 раза. Показатели эффективности фотохимического преобразования энергии в ФС II у этих растений были снижены в среднем на 15 % по сравнению с контролем. Содержание АТФ в листьях не отличалось от контрольных значений. На ультраструктуре листовой паренхимы, как в опыте, так и в контроле хлоропласты были равномерно распределены вдоль всей клеточной поверхности, имели округлую форму, однако в самих хлоропластах

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

у подвергшихся стрессу растений наблюдалось небольшое число тилакоидов гран и их хаотическая ориентация. У второй группы, представленной отечественными формами, затопление инициировало усиленный рост (в 1,7 раз). При этом под действием затопления эффективность работы ФС II у таких растений снижается не так сильно (3-8 %), как у чувствительных линий (> 20 %). У растений подвергшихся стрессовому воздействию клетки мезофилла сильно вакуолизированы (сравнительно с контролем), у устойчивых образцов преобладают хлоропласты удлинённой овальной формы, в хлоропластах более развита мембранно-тилакоидная система, в листьях выявлено повышенное содержание АТФ. В результате молекулярно-генетического анализа было показано присутствие локусов *Sub1A* у всех четырех иностранных форм. Кроме того одна из линий несла также последовательности генов *Sk1* и *Sk2*, что свидетельствует о доминантном характере *Sub1A*. В генотипе отечественных линий, проявивших устойчивость и увеличение скорости роста при затоплении, этилен-зависимые факторы *Sk1*, *Sk2*, а также *Sub1A* обнаружены не были. Тем не менее, обработка метаболитическим ингибитором этилена ( $\text{CoCl}_2$ ) вызывала у таких растений достоверное уменьшение скорости роста в условиях стрессового воздействия. Таким образом, были охарактеризованы отечественные устойчивые формы риса с усиленным ростом при затоплении. Триггером ответной реакции у данных форм является также этилен, однако гены первичного ответа, определяющие устойчивость, отличны от ранее описанных и подлежат установлению.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации № МК-6123.2016.11.

## О возможности использования процессов регенерации для диагностики устойчивости овощных культур к засолению

Алиева З.М.

Дагестанский государственный университет

Опустынивание, нарастание почвенного засоления, засуха, тяжелые металлы и ксенобиотики подавляют продуктивность и развитие дикорастущих и культурных растений. Изучение их стрессоустойчивости становится одной из фундаментальных биоэкологических проблем (Шамсутдинов, 2006; Ковда, 2008; Munns, Tester, 2008). При этом значима лабораторная диагностика устойчивости растений с учетом амплитуды и скорости изменения разных физиологических параметров в стрессовых ситуациях (Удовенко, Гончарова, 1989). Для первичной оценки образцов широко используют методы определения устойчивости по комплексу ростовых параметров или всхожести семян в условиях стресса (Дроздов и др., 1988; Гончарова, 2011). Интегральные показатели – такие как рост и продуктивность растений – заслуженно привлекают внимание при изучении действия стрессов в качестве маркеров. В этом отношении заслуживают внимания показатели активности регенерации, все еще слабо изученные в связи с устойчивостью растений. В связи с этим целью данной работы был анализ влияния NaCl на регенерационную активность черенков ряда различающихся по солеустойчивости овощных культур.

## Влияние наночастиц платины на морфо-физиологические параметры проростков пшеницы

The influence of platinum nanoparticles on morphophysiological parameters of seedlings of wheat

Буренина А.А., Зотикова А.П., Астафурова Т.П.

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

baa888@mail.ru

Рост производства наноматериалов и поступление наночастиц в окружающую среду определяет необходимость изучения возможных последствий их воздействия на элементы биоты и экосистемы. Взаимодействуя с различными структурами растительной клетки, наночастицы могут выступать в роли катализаторов в различных реакциях с образованием не только стимуляторов роста и развития, но и их ингибиторов. Они способны при очень малых дозах изменять физиологические и биохимические процессы, обладая при этом пролонгированным действием. Актуальность изучения концентрационных эффектов наночастиц обусловлена непредсказуемостью их взаимодействия с растительной клеткой и необходимостью определения зависимости доза–эффект для каждого класса наночастиц и различных биообъектов.

Цель данной работы состояла в изучении влияния наночастиц платины ( $\text{НЧ}_{\text{Pt}}$ ) на морфологические и физиолого-биохимические показатели проростков пшеницы при культивации растений на дисперсионных средах, содержащих  $\text{НЧ}_{\text{Pt}}$  различной концентрации. Использовали проростки мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Новосибирская 29. Были протестированы наночастицы металлической платины сферической формы размером  $\Delta_{50}=5$  нм, полученные методом лазерной абляции в дистиллированной воде из брусков платины высокой чистоты. Стабильность наноразмерных частиц сохранялась в течение 40 сут. Проростки пшеницы культивировали в условиях водной культуры в течение 10 сут. при концентрации  $\text{НЧ}_{\text{Pt}}$  в дисперсной системе 0,01, 0,1, 1 и 10 мг/л.

В результате морфометрических измерений обнаружена хорошо выраженная специфичность реакции разных органов проростков на воздействие  $\text{НЧ}_{\text{Pt}}$ . Корневая система в меньшей степени реагировала на действие наночастиц низких концентраций (0,01, 0,1 мг/л), тогда как при концентрации 1 мг/л отмечалось удлинение корней на 30 %, а в условиях максимальной концентрации – более чем в 2 раза, что сопровождалось соразмерным увеличением их массы. Влияние наночастиц низких концентраций на надземную часть проявилось в ингибировании роста стеблей и листьев, снижении прироста их массы. Анализ морфометрических показателей свидетельствует также о том, что десятикратное повышение каждой последующей концентрации  $\text{НЧ}_{\text{Pt}}$  не вызывало у растений линейного ответа доза–эффект.

Установлено, что при воздействии  $\text{НЧ}_{\text{Pt}}$  содержание пигментов в листьях проростков изменялось разнонаправленно.  $\text{НЧ}_{\text{Pt}}$  в концентрации 0,1 мг/л



оказывали ингибирующее влияние на состояние пигментов, что проявлялось в снижении содержания хлорофилла  $\underline{a}$  на 10 % и каротиноидов на 15 %, в то время как количество хлорофилла  $\underline{b}$  не изменялось. При более высоких концентрациях НЧ<sub>рт</sub> (1,0 и 10,0 мг/л) накопление хлорофиллов  $\underline{a}$  и  $\underline{b}$  возрастало на 14–15 % при оптимальном уровне каротиноидов. Соотношение хлорофиллов  $\underline{a/b}$  во всех вариантах концентрационного градиента НЧ<sub>рт</sub> существенно не отличалось от контрольного уровня. Снижение суммарного содержания зеленых пигментов ( $\underline{a} + \underline{b}$ ) у опытных растений наблюдалось только при концентрации НЧ<sub>рт</sub> 0,1 мг/л. Соотношение содержания суммы хлорофиллов и каротиноидов –  $(\underline{a} + \underline{b})/k$  – у растений всех опытных групп повышалось, причем прирост, выраженный в процентах (14–22 %), почти прямо пропорционально зависел от дозы. Соотношение к/хл  $\underline{a}$ , наоборот, уменьшалось при всех концентрациях НЧ<sub>рт</sub>, а в его изменении (88–82 %) проявлялась обратная зависимость от дозы НЧ<sub>рт</sub>.

Отмечено влияние НЧ<sub>рт</sub> на интенсивность фотосинтеза и транспирации в листьях пшеницы. НЧ<sub>рт</sub> низких концентраций (0,01 и 0,1 мг/л) незначительно повышали данные показатели, а высоких (1 и 10 мг/л) в 2–3 раза и более увеличивали их. Не наблюдалось корреляционной зависимости между концентрацией НЧ<sub>рт</sub> в дисперсной системе и уровнями таких тест-параметров, как флавоноиды и пролин. Наибольшее понижение уровня флавоноидов (в 4 раза) отмечено при концентрациях НЧ<sub>рт</sub> 10 и 0,1 мг/л, а при концентрациях 1,0 и 0,01 мг/л отмечено незначительное их увеличение. Отмечено увеличение содержания пролина при концентрации НЧ<sub>рт</sub> 0,1 мг/л до 118 % и уменьшение при концентрации 1 мг/л до 88 % по отношению к контролю. Содержание аскорбиновой кислоты было максимальным при концентрации НЧ<sub>рт</sub> 10 мг/л и понижалось до концентрации 0,1 мг/л, затем наблюдалось незначительное повышение (до 73 %) при концентрации 0,01 мг.

Таким образом, проведенные данные свидетельствуют об особенностях концентрационного влияния НЧ<sub>рт</sub> на морфологические и физиолого-биохимические параметры проростков пшеницы. Влияние НЧ<sub>рт</sub> в диапазоне концентраций 0,01–10,0 мг/л на изучаемые показатели неоднозначно и нелинейно, однако НЧ<sub>рт</sub> в концентрациях 1 и 10,0 мг/л оказывают, в основном, стимулирующее воздействие на ростовые и фотосинтетические параметры растений.

Устойчивость микроклонов *Lychnis chalconica* L. к меди в условиях гипероксии на синем свете

Resistance of microclones *Lychnis chalconica* L. to copper in conditions of hyperoxia under blue light

<sup>1</sup> Головацкая И.Ф., <sup>1</sup> Никиткина Э.Г., <sup>1</sup> Никиткин В.А., <sup>1</sup> Бойко Е.В.,  
<sup>2</sup> Кабил Ф.Ф.

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050 пр. Ленина, 36, г. Томск, Россия

<sup>2</sup> Каирский университет, факультет сельского хозяйства, Гиза, Египет  
+7 3822 529765, [golovatskaya.irina@mail.ru](mailto:golovatskaya.irina@mail.ru)

Одной из глобальных проблем обеспечения продовольствием и фармакологически значимыми растениями растущего населения является загрязнение агроэкосистем токсичными тяжелыми металлами. Вследствие широкого употребления меди в промышленности и сельском хозяйстве, этот металл может служить причиной загрязнения. Медь является важным микроэлементом, который входит в состав многих ферментов. Дефицит меди нарушает синтез первичных метаболитов, водный обмен и размножение растений. Однако, высокие его концентрации оказывают вредное воздействие на растения. Среди главных симптомов отравления медью выделяют медь-индуцированный хлороз и дефекты развития корневой системы. Несмотря на имеющуюся большую информацию о физиологической роли меди, отсутствуют данные об изменении устойчивости растений к меди в разных условиях освещения и кислородного обмена. Не выяснены механизмы регуляции медью жизнедеятельности растений в процессе их микроклонирования *in vitro*. В связи с этим целью наших исследований было изучение устойчивости микроклонов *Lychnis chalconica* L. к меди на синем свете в условиях гипероксии.

Объектом исследований служили микроклоны лихниса хальцедонского – ценного лекарственного растения семейства *Caryophyllaceae*, содержащего фитостероиды. 47-дневные микроклоны *L. chalconica* были получены клонированием растений, выросших из стерильных семян в асептических условиях, и культивированы на питательной среде Мурасиге-Скуга (контроль) и с добавлением  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в двух-, трех- и десятикратной дозе относительно МС (опыт) на синем свете (плотность потока фотонов ФАР 120  $\text{кмоль}/(\text{м}^2 \text{ с})$ ). Культивирование микроклонов растений в ограниченном объеме пробирок на свету без сахаров и дополнительного доступа  $\text{CO}_2$  создавало избыточное содержание  $\text{O}_2$ . Состояние растений оценивали по изменению ростовых параметров, содержанию фотосинтетических пигментов и экдистерона.

В ходе исследований было установлено, что двукратное увеличение  $\text{Cu}$  в питательном растворе стимулировало растяжение корневой системы (оценка по суммарной длине корней), тогда как высокие концентрации  $\text{Cu}$  ингибировали этот процесс по сравнению с эффектом контрольного содержания  $\text{Cu}$ . Закладка новых примордиев корней увеличивалась при

действии как двойной, так и высокой концентрации. Однако, если в первом случае заложение зачатков корней сопровождалось удлинением как ранее заложённых корней, так и вновь заложённых, то во втором случае – интенсивное торможение роста первых корней способствовало включению закладки новых элементов корневой системы, как компенсаторной реакции с целью поддержания поверхности поглощения при торможении медью процессов их растяжения. Cu, как и другие тяжелые металлы, при токсических уровнях обуславливает увеличение активных форм кислорода, которые могут служить причиной торможения роста.

При контрольном содержании экзогенной Cu в среде происходило активное растяжение междоузлий побега микроклонов. Двукратный уровень Cu увеличивал растяжение на более поздних этапах развития микроклонов, тогда как трехкратный – на ранних этапах. Эта динамика роста, вероятно, была обусловлена уровнем эндогенной меди, который был выше во втором случае и в связи с этим наблюдалось более раннее торможение ростовых процессов. Десятикратный уровень экзогенной Cu однозначно тормозил продольный рост побега. Торможение растяжения уже заложённых междоузлий приводило к активации закладки следующих. В результате десятикратное увеличение концентрации меди приводило к увеличению ярусности побега, не смотря на компактность побега.

Поскольку при разных линейных размерах органов в среднем их масса сохранялась на одном уровне, то следовало ожидать разную обводненность побега и корня лихниса при разной концентрации Cu.

Двукратное увеличение концентрации не оказывало негативного влияния на уровень фотосинтетических пигментов, тогда как высокие концентрации Cu существенно снижали их синтез в листьях микроклонов. Ингибирование синтеза пигментов, как и фотосинтеза, могло служить для уменьшения производства кислорода и увеличения эмиссии флуоресценции. Следует отметить, что одновременно с этим изменялся уровень эндогенного экидистерона, опосредуя сохранение ростовых реакций. Высказаны предположения об участии фитоэкидистероидов в метаболизме стероидов, в регуляции роста и развития растений. За счет стимуляции синтеза белка они могли повышать синтез некоторых ферментов, участвующих в углеводном и липидном обмене, обуславливая механизмы устойчивости растений к Cu.

Таким образом, показаны реакции растений лихниса на повышение уровня Cu в условиях гипероксии. Подобная ситуация обычно складывается в тепличных условиях, когда вслед за интенсификацией процессов фотосинтеза, сопровождающегося повышением поглощения CO<sub>2</sub>, следует его снижение в результате активации O<sub>2</sub>-зависимых процессов. В соответствии с нашими данными в этих условиях Cu может выступать при невысоких дозах корректирующим фактором, а при высоких – ингибирующим рост и фотосинтез фактором. Синий свет служит важным условием оптимизации фотосинтеза, в котором реализуются соответствующие функции Cu. Устойчивость растений к Cu определяется уровнем экидистерона.

## Влияние ионов кадмия на физиолого-биохимические характеристики проростков льна *in vitro*

### Influence of cadmium on physiological and biochemical characteristics of seedlings flax *in vitro*

Гончарук Е.А., Горчакова Ю.А., Воронков А.С.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул.

Ботаническая, 35, Москва, Россия

+7 499 977-94-33, +7 499 977-80-18, [goncharuk.ewgenia@yandex.ru](mailto:goncharuk.ewgenia@yandex.ru)

В настоящее время значительно возросло значение льна как масличной, прядильной и лекарственной культуры. Широкий ареал ее возделывания определяет большую влияния воздействия негативных экологических факторов данных территорий, к числу которых относятся техногенные поллютанты, в частности кадмий (Cd). И в этом случае важна адаптация растений к местным природно-климатическим ареалам, в том числе, к его накоплению в почвах. Следует подчеркнуть, что у льна культурного практически не изучена взаимосвязь «состояния» растений, произрастающих в нормальных и стрессовых условиях (присутствие Cd), с возрастными периодами и фазами его развития, в течение которых происходит формирование клеток элементарных волокон и образование лубяных пучков. Все это послужило основанием для изучения влияние ионов Cd на проростки льна долгунца, находящиеся в фазе «быстрого роста», которая наиболее интересна для изучения структуры стебля и образования в этот период фенольных соединений, как важных компонентов защиты растений от стресса.

Объектом исследования являлись стерильные проростки, полученные из семян льна долгунца (*Linum usitatissimum*) сорта «Ленок» и культивируемые в условиях *in vitro* на питательной среде Мурасиге-Скуга при 16-час. фотопериоде в течение 30 дней. В опытных вариантах в питательную среду вносили Cd в концентрациях 50 мкм (пороговая) и 70мкм (токсичная).

Определяли содержание суммы фенольных соединений, фенилпропаноидов и флавоноидов, извлекаемых 96%-ным этанолом из растительного материала. Оценивали уровень ПОЛ по количеству малонового диальдегида (МДА). Мезоструктурный анализ осуществляли на полутонких срезах с использованием фазового контраста на световом микроскопе Olympus (США). Для изучения аккумуляции Cd в растительных тканях использовали гистохимическую реакцию с дитизином.

В присутствии Cd суммарное содержание фенольных соединений в проростках льна повышалось, особенно при более высокой его концентрации (на 20% относительно контрольного варианта). Накопление наиболее разнообразно представленных в составе фенольного комплекса льна соединений фенольной природы – фенилпропаноидов - значительно возрастало при высокой концентрации металла (70 мкм), в отличие от действия низкой его концентрации (50 мкм), когда значительных изменений не отмечалось. Относительно накопления флавонолов, преобладающих в

фенольном комплексе листьев проростков льна и представленных, преимущественно, флавоноидными гликозидами, то их содержание не изменялось в присутствии 50 мкм Cd и снижалось в 1,5 раза по сравнению с контролем при действии 70 мкм Cd. Все это позволяет предположить, что в прегенеративный период, на более поздних этапах онтогенеза льна, соответствующих фазе «быстрого роста», действие высокой концентрации металла (70 мкм) приводило к выраженным изменениям в биосинтезе фенольных соединений. Эти изменения носили тот же характер, что и при действии исследованной ранее пороговой концентрации (50 мкм) на более раннюю онтогенетическую фазу развития растений льна. По всей видимости, влияние высокой концентрации Cd на проростки льна в онтогенетической фазе «быстрого роста» приводило к активации пути биосинтеза более простых соединений фенольной природы и подавлению биосинтеза более сложных - флавоноидов. Следует также отметить двукратное снижение уровня содержания малонового диальдегида в опытных вариантах по сравнению с контролем, что может быть обусловлено протекторным (инактивирующим) действием фенольных соединений как хелаторов тяжелых металлов.

Поллютанты вызывают как физиолого-биохимические, так и различные микроструктурные изменения в растениях. Так, в присутствии металла клетки стебля проростков льна были более дифференцированы относительно контрольного варианта. При высокой концентрации Cd формировались лубяные пучки полиморфной формы, тогда как пороговая концентрация (50 мкм) инициировала только «закладку» клеток элементарных волокон в периферической части стебля. Следует также отметить, что в обоих опытных вариантах на поперечном срезе в области коровой паренхимы возникали полости, образованные группами клеток, сформированных в горизонтально ориентированные тяжи. Согласно литературным данным, такие структуры могут являться резервуарами кислорода, недостаток которого растение может испытывать при действии металла и таким образом вырабатывать приспособительную реакцию на действие веществ высокой токсичности. Являясь аккумулятором Cd, лен способен концентрировать металл в стебле в большей степени, чем растения-исключатели, концентрирующие токсичные ионы преимущественно в корне. Окрашивание дитизоном позволило установить, что наиболее активно накапливали ионы Cd такие ткани стебля как эпидермис, коровая паренхима и ксилема. Вероятно, ткани стебля опытных вариантов, отличаясь высоким уровнем возрастной дифференциацией, обладают более высокой способностью поглощать ионы металла.

Таким образом, присутствие Cd в питательной среде приводило к физиолого-биохимическим изменениям, включая и возникновение структурных особенностей строения стебля у *in vitro* проростков льна-долгунца.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-01742).

## Метаболизм пролина в проростках рапса при засолении в темноте и на белом свете

### Proline metabolism in rape seedlings under salt stress in darkness and white light

Коломейчук Л.В., Данилова Е.Д., Ефимова М.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет,  
634050 г. Томск, Россия

+7 3822 529765, kolomeychuklv@mail.ru

Изучение стрессоустойчивости является одним из приоритетных направлений физиологии растений и затрагивает все иерархические уровни научного исследования. Стратегии выживания растений при действии абиотических стрессоров разнообразны. Одной из них является аккумуляция низкомолекулярных органических соединений, обладающих протекторными и осморегуляторными свойствами. К таким соединениям относится иминокислота пролин. Оценка уровня эндогенного пролина является наглядной характеристикой состояния растения, так как пролин является универсальным индикатором уровня стресса. Важно выяснить за счет каких изменений достигается определенный эндогенный уровень осмолита, за счет усиления его синтеза или деградации. Наиболее полную картину можно получить, изучая экспрессию генов синтеза (пирролин-5-карбоксилат синтазы, *p5cs*) и деградации пролина (пролиндегидрогеназы, *pdh*). Актуальным является также вопрос о влиянии внешних факторов на накопление пролина в различных органах растения.

Основываясь на результатах, проведенных ранее экспериментов по изучению влияния NaCl на рост и развитие проростков рапса, нами была выбрана концентрация NaCl 175 мМ. Исследовали действие данной концентрации на метаболизм пролина в семядолях, гипокотильях и корнях 7-суточных проростков *Brassica napus* в темноте и на белом свете. В качестве контроля использовали 7-суточные проростки, выращенные на дистиллированной воде. Экстракцию и определение свободного пролина осуществляли по методу Bates. Праймеры для изучаемых генов подбирали в базе данных NCBI, условия проведения ПЦР-реакций - в программе «Vector NTI 10. Экспрессию генов определяли ОТ-ПЦР.

Нами было показано, что наибольшее содержание пролина отмечалось в семядолях этиолированных и дэтиолированных растений. Эндогенный уровень пролина в гипокотильях зависел от наличия или отсутствия света; на белом свете его концентрация была в 2 раза выше. Наименьшая концентрация осмолита отмечена в корнях дэтиолированных проростков. Хлоридное засоление способствовало накоплению пролина во всех частях растений, как на свету, так и в темноте. Максимальное увеличение концентрации пролина показано для корней проростков, подвергнутых засолению, минимальное – для семядолей.

Анализ экспрессии генов метаболизма показал, что накопление пролина в семядолях проростков, подвергнутых засолению в темноте и на свету

происходило за счет многократного увеличения транскрипции гена синтеза *p5cs*, наибольший эффект показан на белом свете. Экспрессия гена деградации пролина *pdh* в ответ на засоление не изменялась.

Полученные данные демонстрируют органоспецифичность накопления пролина при действии солевого стресса. Значительное увеличение количества пролина в корнях можно объяснить тем, что именно они первыми подвергаются негативному действию засолению, а также содержат меньше воды, чем семядоли и гипокотиль. Таким образом, можно предположить, что изменение содержания пролина в корнях лучше отражает реакцию растения на действие стрессорного фактора, так как листья подвергаются дополнительным воздействиям окружающей среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 16-04-01071-а).

## Физиологические механизмы повышения солеустойчивости растений рапса 24-эпибрассинолидом на разных этапах адаптации

Physiological mechanisms of increasing salt tolerance of oilseed rape plants with 24-epibrassinolide at different stages of adaptation

Ефимова М.В.<sup>1</sup>, Хасан А.К.<sup>2</sup>, Хрипач В.А.<sup>3</sup>, Кузнецов Вл.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050 г. Томск, Россия

+7 3822 529765, [stevmv555@gmail.com](mailto:stevmv555@gmail.com)

<sup>2</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, Россия, ул. Ботаническая, 35

+7 499 977-80-22, +7 499 977-80-18

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск, Беларусь, ул. Академика Купровича, 5, корп. 2

+375 17 267-87-61

Брассиностероиды являются перспективными фитогормонами, проявляющими стресс-защитное действие в сравнительно низких концентрациях. Они способны реализовывать протекторный эффект на разных этапах адаптации через воздействие на формирование и функционирование тех или иных защитных систем. В физиологии растений обычно протекторный эффект гормона изучают лишь при его совместном действии с повреждающим фактором, хотя имеются 2-3 попытки проверить возможность реализации защитного действия гормона на этапе преадаптации. Нам предстояло выяснить, на каком этапе адаптационного процесса будет наиболее эффективно реализовывать свое протекторное действие один из наиболее активных брассиностероидов – 24-эпибрассинолид (ЭБЛ): до действия стрессора, во время действия стрессора или после действия стрессора, т.е. на этапе восстановления.

Исследования проводили на растениях рапса *Brassica napus* L. сорта Вестар канадской селекции. После недельного культивирования рапса в перлите и 3-недельного выращивания на жидкой питательной среде Хогланда-Снайдер, в питательную среду добавляли 175 мМ NaCl, 10<sup>-10</sup> М 24-эпибрассинолида или NaCl совместно с ЭБЛ. На 49-сутки оценивали ростовые показатели рапса (длину стебля и площадь листьев) и ряд физиологических параметров (содержание фотосинтетических пигментов, пролина, общих растворимых фенолов и флавоноидов, а также осмотический потенциал клеточного экссудата и перекисное окисление липидов).

Засоление примерно в два раза тормозило увеличение площади листовой поверхности и удлинение стебля. Концентрации хлорофилла а, b и каротиноидов снижались в 1.9, 1.7 и 2.3 раза соответственно относительно контроля. Кроме того, на действие NaCl растения реагировали развитием окислительного стресса, падением осмотического потенциала клеточного



содержимого (до  $-2$  МПа), аккумуляцией пролина (в 27 раз) и низкомолекулярных фенольных соединений (в 1.7 раз).

Экзогенный ЭБЛ в отсутствие стрессора не оказывал заметного влияния на интенсивность роста и физиологические показатели растений рапса не зависимо от времени его добавления в питательную среду. В то же самое время предобработка растений ЭБЛ значительно снижала последующее ингибирующее действие NaCl на ростовые показатели и накопление фотосинтетических пигментов. Добавление 24-эпибрассинолида в питательную среду во время солевого воздействия обнаруживало еще более выраженный защитный эффект, чем в предыдущем варианте. И, наконец, обработка растений гормоном после окончания солевого стресса сопровождалась интенсивным восстановлением ростовых процессов и фотосинтетического аппарата растений.

Таким образом, нами показано, что экзогенный 24-эпибрассинолид снижал отрицательное воздействие засоления на ростовые показатели, содержание фотосинтетических пигментов, уровень пролина, общих растворимых фенолов, в том числе, флавоноидов, величину осмотического потенциала и интенсивность перекисного окисления липидов. Наиболее сильный защитный эффект гормон проявлял в том случае, когда действовал во время или после солевого воздействия. Высказано предположение, что в основе протекторного эффекта ЭБЛ в условиях солевого стресса лежит его антиоксидантное действие, которое, тем не менее, не обусловлено гормон-индуцируемой аккумуляцией пролина и низкомолекулярных фенольных соединений.

Окисление ненасыщенных C<sub>18</sub> жирных кислот приводит к выходу цитохрома c из митохондрий проростков гороха

Oxidation of unsaturated C<sub>18</sub> fatty acids leads to release of cytochrome c from pea seedlings mitochondria

Жигачева И.В., Бинюков В.И., Миль Е.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, 119334, г. Москва, ул. Косыгина,4, Россия

+7 495 939-74-09, zhigacheva@mail.ru

Смещение антиоксидантно - прооксидантного равновесия в сторону увеличения продукции АФК происходит под действием стрессовых факторов и приводит к развитию окислительного стресса. Реакция клетки на окислительный стресс включает целый ряд защитных механизмов. Прежде всего, происходит активация и дополнительная экспрессия многочисленных антиоксидантных систем и изменение биоэнергетических характеристик митохондрий.

Исходя из этого целью нашей работы было изучение влияния 2-дневного дефицита воды и последующего 2-дневного восстановительного периода на функциональное состояние митохондрий 6-дневных проростков гороха (*Pisum sativum* L), сорт Альфа. Реабилитацию одной части проростков проводили на увлажняемой водой фильтровальной бумаге, реабилитацию другой части проростков – на фильтровальной бумаге, увлажняемой 10<sup>-12</sup>М фенозаном калия (3,5-дитребутил-4-оксифенил)-пропинатом калия), являющимся антиоксидантом из класса пространственно – затрудненных фенолов.

Дефицит воды имел следствием активацию свободно радикального окисления в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха, о чем свидетельствует 3-кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Активация ПОЛ вызывала значительные изменения в содержании C<sub>18</sub> жирных кислот (ЖК) в мембранах митохондрий. Содержание линолевой кислоты снижалось на 11%, линоленовой - на 19%. Содержание стеариновой кислоты (18:0) возрастало на 41%, что вело к снижению соотношения C<sub>18</sub> ненасыщенных ЖК к стеариновой кислоте в мембранах митохондрий более чем в 1,6 раза.

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий сопровождалось 30% снижением максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и 25% снижением эффективности окислительного фосфорилирования. Нарушение функционирования I комплекса электрон-транспортной цепи митохондрий, по-видимому, обусловлено окислением ненасыщенных ЖК, входящих в состав кардиолипина, главным образом линолевой кислоты, и, следовательно, снижением содержания этого фосфолипида во внутренней мембране митохондрий. Подтверждением этому предположению является 2-кратное снижение скоростей транспорта электронов на конечном цитохромоксидазном участке дыхательной цепи митохондрий. Введение в среду инкубации этих митохондрий, 5×10<sup>-6</sup>М

цитохрома С приводило к восстановлению скоростей окисления пары аскорбат + ТМФД до контрольных значений, что свидетельствует о потере митохондриями части цитохрома С, обусловленной окислением кардиолипина. В пользу данного предположения также свидетельствуют и данные, полученные методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). АСМ-имиджи митохондрий проростков гороха, подвергшихся двухдневному водному дефициту, существенно изменялись и отличались от контрольных образцов. Статистический анализ объема предварительно фиксированных, глутаровым альдегидом митохондрий выявил появление одиночных, не делящихся митохондрий большего объема в группе проростков, подвергшихся стрессовому воздействию, по сравнению с контрольной группой, что свидетельствовало о набухании митохондрий.

Реабилитация проростков с использованием  $10^{-12}$  М фенозана калия приводила к снижению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ почти до контрольных значений. Фенозан калия, защищая от перекисного окисления ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав липидов мембран, предотвращал изменения в жирнокислотном составе мембран митохондрий проростков, выращенных в условиях дефицита воды, что отразилось на биоэнергетических характеристиках этих органелл. Сохранялись высокие скорости окисления НАД-зависимых субстратов в присутствии АДФ или ФКФ и предотвращалось снижение эффективности окислительного фосфорилирования. Более того, восстанавливались скорости транспорта электронов на цитохромоксидазном участке дыхательной цепи.

Можно предположить, что в условиях дефицита воды цитохром С играет ключевую роль в определении функционального состояния митохондрий проростков гороха: с одной стороны, находясь в межмембранном пространстве митохондрий, он может играть роль антиоксиданта, окисляющего супероксидный радикал до молекулярного кислорода. С другой стороны, находясь в контакте с кардиолипином, он может ускорять окисление этого фосфолипида в присутствии  $H_2O_2$ , что облегчает выход цитохрома С из митохондрий. Кроме того, находясь в цитозоле, цитохром С может ингибировать генерацию супероксидного радикала при обратном переносе электронов от  $CoQH_2$  на  $НАД^+$ , либо участвовать в индукции апоптоза.

## Сигма-факторы *Arabidopsis thaliana* участвуют в адаптивной реакции на тепловой шок.

*Arabidopsis* sigma factors participate in the heat-shock response

Забродин Д.А., Данилова М.Н., Дорошенко А.С., Кудрякова Н.В.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН; Россия, Москва  
234518@mail.ru

Растения способны реагировать на повышение температуры изменением активности многих биохимических процессов, что позволяет им выживать в тех случаях, когда температура окружающей среды оказывается выше оптимальной. Эта адаптивная реакция включает изменения экспрессии многих генов и перестройку гормонального баланса. В значительной степени урожайность и выживание растений в неблагоприятных условиях зависят от активного функционирования фотосинтетического аппарата. Однако молекулярные механизмы регуляции экспрессии хлоропластных генов, влияющие на состояние фотосинтетического аппарата, в условиях гипертермии остаются до конца не выясненными.

Известно, что транскрипционная активность пластид определяется ядерными РНК-полимеразами фагового типа, РНК-полимеразами бактериального типа, кодируемыми пластомом (PEP) и  $\sigma$ -факторами, необходимыми PEP для узнавания промоторных областей транскрибируемых генов. У растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heinh семейство  $\sigma$ -факторов включает 6 генов (*SIG1-SIG6*), кодируемых ядром. Эти гены обладают тканеспецифичным характером экспрессии и дифференциальной регуляцией в зависимости от условий среды и стадии развития пластид. Изучение временной динамики экспрессии генов  $\sigma$ -факторов при повышенных температурах может оказаться полезным для анализа состояния аппарата транскрипции пластома в условиях гипертермии. В настоящей работе растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heinh., выращенные *in vitro*, подвергали тепловому шоку при 37-38°C в течение различных по длительности временных периодов (от 1 до 24 ч), после чего из них выделяли РНК и измеряли экспрессию генов методом ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции.

Было обнаружено, что экспрессия гена белка теплового шока HSP90.1 достигает максимума через 3 ч теплового шока, после чего снижается, а белка теплового шока HSP90.5, специфичного для хлоропластов, - через 6 ч. Уровень транскриптов генов всех  $\sigma$ -факторов падал в течение первых 30 мин воздействия гипертермии, а характер их дальнейшего накопления варьировал. Экспрессия генов *SIG1*, *SIG2* и *SIG6* не превышала одной трети от исходных значений в течение последующих 24 ч действия теплового стресса, тогда как для генов *SIG3* и *SIG4* содержание транскриптов возвращалось к исходному уровню через 3 ч после начала теплового шока или превосходило его. Важно отметить, что на тепловой шок реагировал не только *SIG5*, активация экспрессии которого другими стрессами хорошо известна. Можно предположить, что активация экспрессии ряда генов через 3 ч теплового шока происходит в результате работы одного общего сигнального пути, однако

молекулярные причины и физиологический смысл этой динамики ещё предстоит выяснить. Возможно, эта адаптивная реакция связана с протекторным действием абсцизовой кислоты: через 3 ч воздействия повышенных температур резко возростала экспрессия генов ответа на АБК *RD29* и *Kin2*. Результаты проведенного анализа позволяют заключить, что изменение экспрессии генов  $\sigma$ -факторов в значительной степени определяют регуляцию транскрипции пластидного генома в условиях повышенных температур.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00584).

Исследование иммунобиологических механизмов  
взаимоотношений паразитических нематод и растений: роль  
элиситоров и сигнальных молекул

Research of immunobiological mechanisms of relationship of plant and  
parasitic nematodes: the role of elicitors, and signaling molecules

Зиновьева С.В., Удалова Ж.В.

119071, Ленинский пр., 33, Москва, Россия

+7 495 954-50-34, [zinovievas@mail.ru](mailto:zinovievas@mail.ru)

Фитопаразитические нематоды относятся к числу наиболее экономически значимых вредителей сельскохозяйственных культур, ежегодный ущерб от которых мировому сельскохозяйственному производству составляет более 120 млрд. долларов. Эффективных, экологически безопасных методов защиты растений от этих паразитов нет, поэтому приоритетными направлениями исследований являются вопросы, связанные с расшифровкой молекулярных механизмов взаимоотношений паразитических нематод с растением-хозяином и с факторами, определяющими устойчивость растений к этим паразитам.

На модельной системе томаты - галловая нематода была изучена роль элиситоров (на примере хитозана) и сигнальных молекул - салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот в ответе растений на инвазию нематодами. В работе были использованы гибриды томатов с генами устойчивости (Mi+), а также восприимчивые растения, у которых этот ген отсутствует (Mi-). Для оценки роли исследуемых элиситора и сигнальных молекул использовали ряд биохимических маркеров иммунного состояния растений – активность ферментов липоксигеназы (ЛОГ) и фенилаланинаммиклазы (ФАЛ), а также проведен анализ морфофизиологических показателей нематод из растений при действии на них исследуемых препаратов.

Проведенный анализ показал, что при обработке растений хитозаном в инвазированных томатах наблюдалось усиление активности ФАЛ по сравнению с контрольными. В этом случае наблюдали меньшую поражаемость растений нематодами и угнетение паразита. Отмечено достоверное увеличение активности ФАЛ при обработке хитозаном в восприимчивом сорте. Очевидно, иммунизация восприимчивых растений хитозаном приближает их параметры к соответствующим показателям устойчивого, и, тем самым, их иммунное состояние позволяет противостоять патогенному воздействию паразитов.

Поскольку ФАЛ является ферментом, участвующим в синтезе СК, испытывали воздействие хитозана на содержание СК в тканях здоровых и инвазированных томатов восприимчивого сорта. Испытания показали, что обработка семян томата хитозаном индуцировала накопление СК в листьях и корнях здоровых растений. Инвазирование корней томатов галловой нематодой примерно вдвое увеличивало количество СК в корнях, т.е. именно там, где находится патоген, тогда как содержание СК в листьях практически не изменялось. Полученные нами данные показывают, что процесс

формирования индуцированной хитозаном устойчивости томатов к галловой нематоды может быть связан с СК сигнализацией. Однако хитозан может индуцировать не только салицилатный, но и жасмонатный путь передачи сигналов в растении на геном. Использование хитозана способствовало индукции активности ЛОГ, которая варьировала в зависимости от его концентрации.

Синтез ЖК в высших растениях осуществляется с помощью ЛОГ. Исследование активности ЛОГ в тканях томатов показало, что при инвазии активность фермента возрастает более чем на 70% в восприимчивом, тогда как в устойчивом сорте -значительно ниже (~40%). При экзогенной обработке устойчивых растений ЖК, активность ЛОГ достоверно не изменялась. Активность ФАЛ у зараженных Mi+ растений была в 2 раза выше по сравнению с зараженными восприимчивыми.

Таким образом, показаны различия в сигнальных системах участвующих в ответе растений на нематодную инвазию при генетической (Mi-медиированной) и индуцированной устойчивости. При индуцированной устойчивости медиаторами сигнальных систем являются СК и ЖК, в устойчивости, обусловленной присутствием гена Mi, медиатором выступает СК. Обработка растений ЖК не подавляла Mi-медиированную устойчивость, что дает основание говорить об отсутствии конфликта между сигнальными системами. Показано, что сами по себе СК и жасмонаты способны к индуцированию устойчивости, но уровень их защитного действия не превышал 15-20%, иногда до 30%, а в некоторых концентрациях они вообще не проявляли иммуностимулирующей активности. Однако применение СК и ЖК в сочетании с биогенными элиситорами (например, хитозаном) увеличивало устойчивость растений к нематодам и позволяло на 2-3 порядка снизить индуцирующую концентрацию элиситора. Поскольку, эти кислоты вызывают аддитивный защитный ответ, можно считать, что защитное действие хитозана определяется его свойством индуцировать у растений фенотипическую, неспецифическую болезнеустойчивость. Выявлена коррелятивная зависимость популяционных характеристик паразита (дефинитивные размеры, плодовитость и др.) от особенностей реализации защитных реакций растений при действии элиситоров и сигнальных молекул.

Полученные данные свидетельствуют о регуляторной роли элиситоров и сигнальных молекул в системе нематоды – растение и позволяют наметить методические основы применения иммунизации растений для повышения их устойчивости к фитогельминтам.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-04-04625\_a.

## Поиск белков, ответственных за механизм двигательной функции флоэмных волокон льна

Search of proteins responsible for mechanism of motor function of flax phloem fibers

Ибрагимова Н.Н., Агеева М.В., Горшков О.В., Мокшина Н.Е., Горшкова Т.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31

*nibra@yandex.ru*

Флоэмные волокна стебля льна (*Linum usitatissimum* L.), имеющие мощную третичную клеточную стенку, *in situ* проявляют ярко выраженную реакцию на наклон стебля. Это обнаружено с помощью световой и конфокальной микроскопии отдельных волокон и поперечных срезов стеблей, корректирующих свое пространственное положение в ходе гравитропической реакции. Для исследования механизма двигательной функции этих волокон было проведено сравнение транскриптомов волокон, изолированных из участков двух сторон стебля: «тянушей» и противоположной. Данная модель позволяет проводить исследования на уровне индивидуальных клеток, находящихся на стадии формирования третичной клеточной стенки.

Анализ полученных данных по изменению относительного содержания транскриптов показал достоверные отличия в экспрессии 107 генов, продукты которых отвечают за метаболизм клеточно-стеночных полисахаридов (ксилоглюкан-эндотрансгликозилаза, ингибитор пектинметилэстеразы и др.), регуляцию различного типа (регулятор транскрипции AUX/IAA, сенсор этилена, включая факторы транскрипции и др.) и организацию цитоскелета.

Таким образом, впервые получены новые данные относительно изменения транскриптома желатинозных волокон в ходе развития гравитропической реакции, позволяющие принципиально расширить наши представления о функции волокон в растениях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, Грант № 16-14-10256.



## Влияние ионов кадмия на накопление полифенолов в *in vitro* культурах *Camellia sinensis* L., выращиваемых в световых условиях

Influence of cadmium on the accumulation of polyphenols, when *in vitro* culture *Camellia sinensis* L. cultivated in light conditions

Лапшин П.В., Зубова М.Ю., Нечаева Т.Л., Загоскина Н.В.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия

+7 499 977-94-33, +7 499 977-80-18, [mariaz1809@gmail.com](mailto:mariaz1809@gmail.com)

Культивируемые в условиях *in vitro* клетки и ткани высших растений представляют собой удобную систему, позволяющую изучать различные метаболические процессы, в том числе и биосинтез различных вторичных метаболитов. К числу наиболее распространенных их представителей относятся различные полифенолы. Известно, что этим соединениям отводится важная роль в адаптации растений к стрессовым условиям.

К числу широко распространенных и токсичных поллютантов относится кадмий, поступление которого в клетки растений может вызывать значительные изменения в метаболических процессах, в том числе и накоплении полифенолов.

Целью исследования являлось изучение действия ионов кадмия на накопление полифенолов в каллусных культурах чайного растения на начальных этапах роста в световых условиях, что соответствует стадии перехода клеток от гетеротрофного к автотрофному типу роста.

Каллусные культуры, инициированные из стеблей проростков чайного растения (*Camellia sinensis* L., грузинская разновидность), выращивали на питательной среде Хеллера, содержащей 2,4-Д (5 мг/л) и глюкозу (1,5%) В опытном варианте к основной питательной среде добавляли  $Cd(NO_3)_2$  в концентрации 25 мг/л. Культуры выращивали в условиях 16 час фотопериода (5000 люкс) в камере фитотрона ИФР РАН. Продолжительность цикла культивирования составляла 7 недель.

Содержание полифенолов определяли спектрофотометрическим методом с реактивом Фолина-Дениса, используя для этого этанольные экстракты, полученные из замороженного жидким азотом материала.

В каллусных культурах чая, во время первого пассажа на свету, накопление полифенолов было выше в начале цикла культивирования, по сравнению с его завершением. Эта тенденция характерна как для контрольного, так и для опытного (выращивание каллусов на среде с кадмием, 25 мг/л) вариантов. Следует также подчеркнуть, что поступление кадмия в культуры способствовало более высокому накоплению в них полифенолов, что в большей степени проявлялось в начале пассажа (различия в их содержании были двухкратными), и в значительно меньшей степени – в конце (всего на 20%). Последующий рост культур в световых условиях (второй пассаж), когда уже четко прослеживалось формирование окрашенных в зеленый цвет участков в каллусных культурах чая, в контрольном варианте содержание ФС

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

повышалось по сравнению с первым пассажем (на 30%) и сохранялось практически на одном уровне в течение всего пассажа. Эта же тенденция была характерна и для каллусных культур, растущих на среде с кадмием, у которых количество ФС было выше, чем в контрольном варианте. Все это свидетельствует о том, что формирование в каллусных культурах чайного растения хлоропластов, как одних из основных центров биосинтеза ФС в клетках зеленых растений, сопровождалось повышением содержания этих вторичных метаболитов, в том числе и в присутствии кадмия в среде.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-01742).

## Изменения в содержании флавоноидов при деэтиоляции *Fagopyrum esculentum*

### Formation of flavonoids in *Fagopyrum esculentum* under de-etiolation conditions

Казанцева В.В., Гончарук Е.А., Загоскина Н.В.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия,  
127276 Москва, ул. Ботаническая, 35

k.v.-90@mail.ru

Флавоноиды являются наиболее многочисленным классом природных фенольных соединений, представленным флавононами, флавонами, флавонолами, антоцианами и др. В растениях они встречаются преимущественно в виде гликозидов, а также в виде комплексов с другими классами веществ. В настоящее время флавоноидам уделяется большое внимание в связи с их все более широким практическим использованием в медицине в качестве антиоксидантных, противовоспалительных и противоопухолевых препаратов.

Высшие растения значительно отличаются по способности к накоплению полифенолов. И в этом случае большой интерес представляют представители рода *Fagopyrum*, широко культивируемые во многих странах мира. В частности, гречиха обыкновенная (*F. esculentum* L.) является одной из важнейших крупяных и медоносных культур России, которая помимо пищевой ценности, широко применяется в народной медицине и фармакологии. Преобладающим классом в ее фенольном комплексе являются флавоноиды, которые представлены такими соединениями, как рутин, кверцетин, кемпферол, морин и антоцианы. Флавоноиды и рутин, в комплексе с микроэлементами, содержащимися в этом растении, благотворно влияют на сердечнососудистую систему, кровообращение.

Образование флавоноидов, в том числе рутина, характерно для всех органов гречихи, но наибольшее их накопление и более разнообразный состав характерны для надземных органов, что может быть следствием формирования в зеленых клетках растений хлоропластов, являющихся одним из важнейших мест их биосинтеза. В связи с этим изучение накопления флавоноидов при переходе растений от этиоляции к деэтиоляции представляет большой интерес.

В ряде литературных источников отмечалась взаимосвязь между уровнем плоидности растительных тканей и их способностью к образованию различных классов фенольных соединений. Однако до сих пор нет ясности в этом вопросе.

Целью исследования являлось сравнение накопления флавоноидов, как основных компонентов фенольного комплекса листьев, у этиолированных и деэтиолированных проростков гречихи обыкновенной с различным уровнем плоидности (диплоидный и тетраплоидный сорта).

Объектом исследования являлись два сорта гречихи: Девятка (диплоидный) и Большевик 4 (тетраплоидный). Проростки выращивали рулонным способом в

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

камере фитотрона ИФР РАН при 24°C в условиях этиоляции в течение 9 дней. Затем они были перенесены в условия 16-час. фотопериода еще на 3 дня.

Фенольные соединения извлекали из семядольных листьев и гипокотилей проростков 9- и 12-дневного возраста экстракцией 96%-ным этанолом. В экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание флавоноидов (в листьях) и антоцианов (в гипокотилиях) при 415 нм и 550 нм соответственно.

В условиях этиоляции содержание флавоноидов в семядольных листьях диплоидного и тетраплоидного сортов гречихи было одинаковым. При переходе к деэтиоляции оно увеличивалось в равной степени у обоих сортов (на 60%).

На начальных этапах онтогенеза гречихи образование антоцианов характерно только для гипокотилей и только в условиях деэтиоляции. При этом, у тетраплоидного сорта их уровень выше (на 10%) сравнительно с диплоидным сортом.

Все вышеизложенное свидетельствует об активации биосинтеза флавоноидов при деэтиоляции проростков гречихи, а более высокое накопление антоцианов в гипокотилиях тетраплоидного сорта может служить критерием его большей устойчивости к стрессовым факторам, что особенно важно на начальных этапах развития.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-01742).

## Влияние кадмия на уровень транскриптов генов *HvNRAMP3* и *HvIRT1* в корнях и листьях растений ячменя

Effect of cadmium on the content of *HvNRAMP3* and *HvIRT1* transcripts in roots and leaves of barley plants

Казнина Н.М., Титов А.Ф., Топчиева Л.В., Репкина Н.С., Батова Ю.В., Лайдинен Г.Ф.

ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра РАН,  
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, Россия  
+7 8142 76-27-06, kaznina@krc.karelia.ru

Среди белков, осуществляющих транспорт ионов металлов через мембраны растительных клеток, наименее изученными являются белки семейства NRAMP (*natural resistance associated macrophage protein*). К настоящему времени обнаружено участие некоторых из них, в частности белков NRAMP3 и NRAMP4, в переносе ионов железа и цинка через тонопласт из вакуоли в цитоплазму клеток. Однако роль этих белков и соответствующих им генов в гомеостазе ионов металлов в растительной клетке, а также в механизмах металлоустойчивости растений до сих пор не вполне ясна. В отношении кадмия имеются единичные сведения об усилении в его присутствии уровня экспрессии генов *NRAMP3* в корнях и побегах *Arabidopsis thaliana* и риса, а также некоторых видов- гипераккумуляторов. Высказано мнение, что это может способствовать ремобилизации из вакуоли  $Fe^{2+}$ , концентрация которого в таких условиях заметно снижается, однако доказательства этого на сегодняшний день по сути отсутствуют. Вместе с тем известно, что основным транспортером  $Fe^{2+}$  через плазмалемму в цитоплазму эпидермальных клеток корня являются белки IRT1 (*iron regulated transporter*) и IRT2. Ранее считалось, что указанные белки принимают участие в транспорте железа только у растений со стратегией I поглощения этого элемента. Но судя по последним данным, они функционируют и у видов со стратегией II, хотя экспериментальных данных, подтверждающих это, пока недостаточно. В этой связи нами изучено влияние кадмия на уровень транскриптов генов *HvNRAMP3* и *HvIRT1* в корнях и листьях растений ячменя разного возраста. Для этого семена ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Зазерский 85 проращивали в рулонах фильтровальной бумаги на модифицированном питательном растворе Кнопа. По достижении проростками возраста 3-х или 7-и суток, в опытном варианте к питательному раствору добавляли 100 мкМ кадмия в форме сульфата. Спустя 4 сут экспозиции проростков в этих условиях в корнях определяли уровень транскриптов генов *HvNRAMP3* и *HvIRT1*, а в листьях – *HvNRAMP3*.

Проведенное исследование показало, что у 3-дневных проростков не происходит повышения уровня транскриптов изученных генов ни в корнях, ни в листьях. В отличие от этого у 7-дневных проростков количество матриц гена *HvNRAMP3* существенно увеличилось в листьях (более, чем в 3 раза по сравнению с контролем), а гена *HvIRT1* – в корнях (примерно в 2 раза).

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

Ранее нами была обнаружена более высокая устойчивость к кадмию 7-дневных проростков ячменя по сравнению с 3-дневными, несмотря на большее содержание в них данного металла. Как оказалось, устойчивость к кадмию растений этого возраста во многом связана с устойчивостью их фотосинтетического аппарата, в частности, с сохранением на уровне контрольных растений концентрации зеленых пигментов и эффективности работы фотосистемы II.

Поскольку одной из возможных причин снижения фотосинтетической активности растений в присутствии кадмия является дефицит  $Fe^{2+}$ , то можно предположить, что сохранение высокого уровня интенсивности фотосинтеза у 7-дневных проростков ячменя при действии этого металла могло быть связано с усилением активности механизмов, обеспечивающих восстановление необходимой концентрации железа, в частности, с активацией экспрессии гена *HvIRT1* в корнях, способствующей поступлению  $Fe^{2+}$  из внешней среды, и гена *HvNRAMP3* в листьях, вследствие чего обеспечивалась ремобилизация  $Fe^{2+}$  из вакуоли клеток в цитозоль для дальнейшего использования в процессах жизнедеятельности.

Роль свободного гистидина в транспорте и накоплении никеля, цинка и кадмия у гипераккумулятора *Noccaea caerulescens* и исключателя *Thlaspi arvense*

The role of free histidine in transport and accumulation of nickel, zinc and cadmium in hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* and non-accumulator *Thlaspi arvense*

Кожевникова А.Д.<sup>1</sup>, Серегин И.В.<sup>1</sup>, Эрлих Н.Т.<sup>1</sup>, Схат Х.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, 127276, ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия

+7 499 231-83-24, +7 499 977-80-18, [urtica8127@yandex.ru](mailto:urtica8127@yandex.ru)

<sup>2</sup> Свободный Университет, Де Булелаан 1085, 1081, Амстердам, Нидерланды +3120 598-70-52, [h.schat@vu.nl](mailto:h.schat@vu.nl)

Тяжелые металлы являются распространенными стрессорами, влияние которых на растения активно изучается. Способность к накоплению тяжелых металлов и устойчивость к их избытку может существенно различаться у разных видов растений. Физиологические механизмы, определяющие способность растений накапливать тяжелые металлы, до сих пор плохо изучены. Выделяют две контрастные группы растений: исключатели, накапливающие металлы преимущественно в корнях и аккумуляторы, накапливающие металлы главным образом в побегах. Органические хелаторы, в частности гистидин, играют важную роль в передвижении и накоплении тяжелых металлов.

Для анализа участия гистидина в транспорте никеля (Ni), цинка (Zn) и кадмия (Cd) растения исключателя *Thlaspi arvense* L. и нескольких экотипов гипераккумулятора *Noccaea caerulescens* F.K. Mey (ранее *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl) выращивали на ½ среды Хогланда в течение 8 недель в присутствии 2 мкМ Zn и в отсутствие Ni и Cd. Перед сбором пасоки 8-недельные растения инкубировали в течение 4 ч на растворах 1 мМ L-His или L-Ala. В качестве контроля служили также неподобработанные растения. После предобработки корни отмывали, а побеги отрезали. Пасоку собирали в течение ночи, инкубируя корневые системы на ½ среды Хогланда в присутствии 5, 50 или 500 (только для *N. caerulescens*) мкМ Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 25 или 250 (только для *N. caerulescens*) мкМ NiSO<sub>4</sub>, а также 1 мкМ Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (только для *N. caerulescens*). Содержание Ni, Zn и Cd определяли методом пламенной и графитной атомно-абсорбционной спектрофотометрии, а гистидина – с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В корнях гипераккумулятора *N. caerulescens* содержание свободного гистидина было в 10 раз выше по сравнению с исключателем *T. arvense*, в то время как в побегах уровень гистидина у гипераккумулятора лишь незначительно превышал его содержание у исключателя. Содержание гистидина в пасоке увеличилось после предобработки гистидином как у исключателя, так и у гипераккумулятора, что свидетельствует о поглощении

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

гистидина корнями растений обеих групп. Предобработка гистидином стимулировала загрузку Ni и Zn в ксилему только у гипераккумулятора *N. caerulescens*. В наибольшей степени загрузка Ni в сосуды ксилемы стимулировалась гистидином у экотипа Monte Prinzera с серпентиновых почв, богатых Ni, а Zn – у экотипов La Calamine и Saint Félix de Pallières с каламиновых почв, богатых Zn, Cd, Pb. Аланин не влиял на загрузку Ni и Zn в проводящие ткани, что свидетельствует о том, что стимуляция гистидином загрузки этих металлов в ксилему не является общим эффектом аминокислот. Эффект гистидина не наблюдался в случае Cd, возможно из-за относительно низкого сродства этого металла к N-содержащим лигандам. Таким образом, физиологические механизмы, определяющие избирательное накопление тяжелых металлов в надземных органах гипераккумуляторов и подземных органах исключателей, не одинаковы для разных металлов: гистидин принимает участие в транспорте Ni и Zn, но не Cd. Образование комплекса Ni и Zn с гистидином предотвращает их поступление в вакуоли клеток корня *N. caerulescens*, а следовательно, определяет более эффективное, по сравнению с исключателем, поступление металлов в проводящие ткани и в надземные органы *N. caerulescens*, что подтверждается данными гистохимического анализа распределения Ni и Zn на тканевом и клеточном уровнях.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Грантов РФФИ № 11-04-00513, 15-04-02236, а также Международной научной программы LOCOMET.



## Исследование антиоксидантной роли пролина у газонных трав на фоне действия *Bacillus subtilis* в условиях недостаточной освещенности

Research of an antioxidant role of proline at lawn herbs against action of *Bacillus subtilis* in the conditions of insufficient illumination

Маркина В.О., Курамшина З.М.

Стерлитамакский филиал Башкирского государственного университета, проспект Ленина, 37, г. Стерлитамак, Россия

43-38-69, [vichka\\_markina\\_93@mail.ru](mailto:vichka_markina_93@mail.ru)

Газоны являются неотъемлемой частью территории любого города и имеют большое значение при формировании ландшафта. Однако, под действием различных неблагоприятных факторов происходит торможение роста, снижение фотосинтеза, биомассы и декоративности газонных трав. Одним из основных биохимических показателей, по которому судят о процессах, происходящих в растениях с точки зрения их реакции на стресс, считается содержание аминокислоты пролина. Накопление пролина в растениях помогает им адаптироваться к неблагоприятным условиям, защищает от инактивации белки, ДНК, ряд ферментов и другие важнейшие клеточные компоненты.

Известно, что биопрепараты, содержащие микроорганизмы, например, эндофитные бактерии *Bacillus subtilis*, способны оказывать положительное влияние на растения при неблагоприятных факторах среды, т.к. активно синтезируют метаболиты широкого спектра действия, такие как ферменты, антибиотики, различные аминокислоты и сами легко адаптируются в различных условиях окружающей среды. Известен протекторный эффект *B. subtilis* при воздействии на растения различных абиотических и антропогенных факторов.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* на устойчивость газонных трав к недостатку света.

Объектом исследования служила газонная травосмесь сорта «Сибиряк».

Эксперимент проводили в трех биологических повторностях. Газонную траву выращивали в вегетационных сосудах при 25 °С. Часть семян перед посадкой обработали эндофитными бактериями шт. 26Д и 11ВМ. В каждый вегетационный сосуд высаживали по 3 г семян газонной травы. Опытные растения выращивали при недостатке света. На 30 сутки проводили измерение биомассы и концентрации пролина. Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива, приготовленного без нагревания (1,25 г нингидрата + 30 мл ледяной уксусной кислоты + 20 мл 6 М Н<sub>3</sub>РO<sub>4</sub>). Навеску свежей растительной ткани листовой пластины растения (200 мг) заливали 5 мл кипящей дистиллированной воды и выдерживали в течение 10 минут на водяной бане при температуре 100 °С. Затем в чистую пробирку заливали 2 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл нингидринового реактива и добавляли 2 мл приготовленного экстракта. Пробы инкубировали в течение 20 минут на водяной бане при температуре 100 °С, после чего быстро

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

охлаждали до комнатной температуры. После искусственного охлаждения (холодной водой) измеряли оптическую плотность продуктов реакции при длине волны 520 нм на спектрофотометре в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Значения содержания пролина рассчитывали с помощью калибровочной кривой, используя для ее построения химически чистый пролин.

В ходе экспериментов было выявлено, что обработанные бактериями растения росли лучше необработанных как в условиях нормального освещения, так и при недостатке света. Так, биомасса растений, инокулированных бактериями шт. 26Д и 11ВМ, в условиях нормального освещения была больше на 25 и 28%, а при недостатке света на 18 и 20%, соответственно, чем у необработанных растений. Содержание пролина в растениях, необработанных бактериями и выросших при недостатке света, повышалось в 2 раза. У инокулированных бактериями растений содержание пролина было выше на 33%, чем у неинокулированных.

Таким образом, в условиях недостатка света обработка семян растений спорами эндофитных штаммов бактерий *B. subtilis* 26Д и 11ВМ способствовала снижению отрицательного эффекта недостатка света у растений.

## Влияние предобработки нитропруссидом натрия на устойчивость проростков пшеницы к солевому стрессу

Effect of pretreatment with sodium nitroprusside on tolerance of wheat seedlings to salt stress

Масленникова Д.Р., Аллагулова Ч.Р., Федорова К.А., Плотников А.А., Авальбаев А.М., Шакирова Ф.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, 450054, ул. пр. Октября, 71, Уфа, Республика Башкортостан, Россия  
+7 347 235-60-88, shakirova@anrb.ru

Растения в естественных условиях произрастания находятся под прессом постоянно изменяющихся условий внешней среды, к которым они вынуждены приспосабливаться. Засуха, засоление, осмотический стресс, гипотермия, воздействие тяжелых металлов вызывают нарушение водного режима и являются наиболее распространенными в мире стрессами, приводящими к существенному снижению урожая и качества продукции. В связи с этим, применение регуляторов роста, способствующих повышению устойчивости культурных растений, является актуальной задачей. К таким регуляторам роста можно отнести оксид азота (NO), который является внутриклеточной сигнальной молекулой, участвующей в регуляции основных физиологических процессов, протекающих на всех этапах жизненного цикла растений в нормальных условиях произрастания. Кроме того, имеются сведения о способности NO вовлекаться в регуляцию устойчивости растений к широкому спектру стрессовых воздействий абиотической и биотической природы. В связи с этим, интересно было оценить способность нитропруссиды натрия (SNP) как донора оксида азота повышать устойчивость растений пшеницы к засолению. В ходе экспериментов предстояло проанализировать влияние предобработки SNP в оптимальной в стимуляции роста растений пшеницы концентрации, 200 мкМ, на показатели сырой и сухой массы, гормональный статус и уровень МДА в растениях пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Салават Юлаев в условиях натрий хлоридного засоления. Обнаружено, что предобработка SNP полностью предотвратила вызванное 2%-ным NaCl торможение роста проростков, более того после удаления соли из среды инкубирования проростков их рост быстрее восстанавливался и через 24 часа эти растения по массе приближались к контрольному варианту. Полученные результаты свидетельствуют о явном пролонгированном рост-стимулирующем и защитном действии 200 мкМ SNP на проростки пшеницы при стрессе. В регуляции и координации молекулярно-биологических и физиолого-биохимических процессов, лежащих в основе роста растений в норме и при стрессе, в том числе, в условиях засоления среды, ключевую роль отводят гормональной системе, чутко реагирующей на малейшие изменения условий произрастания. В связи с этим, важно было проанализировать характер влияния предобработки 200 мкМ SNP в течение 24 ч на гормональный статус проростков пшеницы, подвергнутых впоследствии

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

натрий-хлоридному засолению. Стресс вызвал существенное накопление АБК с максимумом, приходящимся на 2 ч, стойкое снижение концентрации ИУК и резкое падение уровня цитокининов. Вместе с тем, предобработка SNP предотвратила вызываемые засолением сдвиги в содержании всех исследованных гормонов, способствуя поддержанию их концентрации на уровне контрольных растений. Предотвращение падения содержания цитокининов в SNP-предобработанных проростках в условиях засоления можно рассматривать в качестве важной регуляторной составляющей проявления защитного действия SNP на растения, поскольку хорошо известна роль цитокининов в развитии устойчивости растений к неблагоприятным факторам. В целом, можно отметить, что предобработка проростков SNP оказывала стабилизирующий эффект на растения при стрессе, подтверждением чего служат данные о содержании малонового диальдегида (МДА), одного из конечных продуктов перекисного окисления липидов, являющегося важным индикатором степени повреждающего действия стресса на растения. Выявлено, что воздействие 2%-ного NaCl вызывало резкое двукратное увеличение концентрации МДА в проростках, тогда как предобработка SNP способствовала существенному уменьшению уровня стресс-индуцированного накопления МДА, что свидетельствует о меньшей степени повреждающего действия натрий - хлоридного засоления и эффективности предобработки проростков донором оксида азота с целью повышения устойчивости пшеницы к данному воздействию.

Совокупность полученных результатов демонстрирует явный защитный эффект предобработки SNP на проростки пшеницы к воздействию солевого стресса, что в целом влияет на поддержание их физиолого-биохимических процессов на уровне, близком к контролю. В основе этого эффекта лежит предотвращение оксидом азота резких стресс-индуцированных перестроек в состоянии гормональной системы растений пшеницы.

# Идентификация *in silico* последовательностей, кодирующих АТФазы Р-типа, в транскриптомах морской зеленой микроводоросли *Dunaliella tertiolecta*

*In silico* identification of sequences for P-type ATPases in transcriptomes of green marine alga *Dunaliella tertiolecta*

Попова Л.Г.<sup>1</sup>, Беляев Д.В.<sup>1,2</sup>, Шувалов А.В.<sup>1</sup>, Юрченко А.А.<sup>3</sup>, Маталин Д.А.<sup>1</sup>, Балнокин Ю.В.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН. Москва, Россия  
+7 499 977-92-18, +7 499 977-80-18, lora\_gp@mail.ru

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт. Долгопрудный, Моск.обл., Россия

<sup>3</sup> Центр геномной биоинформатики им. Ф.Г. Добжанского. Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет. Москва, Россия

Были проанализированы транскриптомы морской микроводоросли *Dunaliella tertiolecta* (отд. Chlorophyta), депонированные в базе SRA (DNA and RNA Sequence Read Archive), NCBI. Идентификаторы транскриптомов (код проекта/код архива): SRX047443/ run SRR124254, SRX047444/ run SRR1294427, SRX549041/ run SRR1300297, SRX554105/ run SRR1300297, SRX554106/ run SRR1300298. Целью анализа была идентификация нуклеотидных последовательностей, кодирующих АТФазы Р-типа. Особое внимание уделялось поиску последовательности, кодирующей Na<sup>+</sup>-АТФазу: предполагается, что этот фермент функционирует в плазматической мембране *D.tertiolecta*, подобно тому, как это наблюдается у ряда других морских микроводорослей. Компьютерную сборку транскриптомов de novo осуществляли с помощью пакета программ Trinity. Собранные транскриптомы содержали от 30124 до 42927 контиг. Для поиска в полученных наборах контиг последовательностей, кодирующих АТФазы Р-типа, использовали консенсусные последовательности, полученные при выравнивании аминокислотных последовательностей известных АТФаз Р-типа различных организмов, прежде всего зеленых водорослей. В собранных транскриптомах было найдено от 13 до 25 контиг, являющихся частью последовательностей (или содержащих последовательности) АТФаз Р-типа. Сравнение аминокислотных последовательностей последних с последовательностями, аннотированными в базах данных NCBI, позволило приписать найденные последовательности к подсемействам I-V АТФаз Р-типа с определенной ионной специфичностью. Были обнаружены: (1) АТФазы – переносчики тяжелых металлов (тип IB); (2) Ca<sup>2+</sup>-АТФазы SERCA (тип IIA); (3) H<sup>+</sup>-АТФазы (тип IIIA); (4) фосфолипид-транспортирующие АТФазы (флиппазы) (тип IV); (5) катион-транспортирующие АТФазы с неопределенной специфичностью (тип V). Функционирование Na<sup>+</sup>-АТФаз у морских водорослей не вызывает в настоящее время сомнений, однако, вопреки ожиданиям, ни в одном транскриптоме не было обнаружено

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, который можно было бы однозначно отнести к группе  $\text{Na}^+$ -транспортирующих АТФаз. Вместе с тем, в транскриптомах *D. tertiolecta* обнаружены транскрипты двух различных  $\text{H}^+$ -АТФаз и двух различных  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз типа SERCA.

Транскриптом клетки динамичен, т.е. он отражает гены, которые активно экспрессируются в каждый данный момент времени. Все анализируемые транскриптомы были получены на основе препаратов РНК, выделенных из водорослей, растущих в искусственной морской воде, содержащей 0,5 М NaCl. Поскольку именно  $\text{Na}^+$ -АТФазы обеспечивают ионное гомеостатирование цитоплазмы у морских микроводорослей и, следовательно, выживание этих организмов в соленой среде, то весьма маловероятно, что транскрипты предполагаемой у *D. tertiolecta*  $\text{Na}^+$ -АТФазы являются редкими транскриптами и из-за этого просто были потеряны в процессе инструментального анализа. Исходя из этого, а также на основании сравнительного анализа первичной структуры АТФаз, обсуждается возможность, что один из предсказанных белков, приписываемых  $\text{H}^+$ - или  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазам, является  $\text{Na}^+$ -транспортирующей АТФазой.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований, гранты № 13-04-01098, № 16-04-01544.

Анализ участия  $H^+$ -АТФазы в реализации влияния  
вариабельного потенциала на дыхание листьев гороха

Analysis of  $H^+$ -ATPase participation in realization of variation potential  
influence on respiration in leaves of pea

Плотникова Ю.И., Шерстнева О.Н., Сурова Л.М., Воденев В.А.,  
Сухов В.С.

Нижегородский государственный университет им. Н.И.  
Лобачевского, Гагарина пр-т, 23, 603950, Нижний Новгород,  
Россия

+7 831 462-32-14, +7 831 462-32-02, [yuliya\\_plotnikova\\_92@mail.ru](mailto:yuliya_plotnikova_92@mail.ru)

Электрические сигналы (ЭС), представленные у растений потенциалами действия и вариабельными потенциалами (ВП), играют важную роль в формировании быстрых и системных ответов растения на окружающие стресс-факторы. Известно, что ЭС влияют на множество физиологических процессов растений, что, вероятно, приводит к повышению устойчивости растения к неблагоприятным воздействиям. В частности, ЭС вызывают обратимую инактивацию фотосинтеза и кратковременную активацию дыхания. В случае ВП инактивация фотосинтеза связана, по-видимому, с обратимым снижением активности  $H^+$ -АТФазы, которое является ключевым механизмом генерации вариабельного потенциала и вызывает изменения внутри- и внеклеточного рН. В то же время, механизмы влияния ВП на дыхание остаются совершенно не исследованными экспериментально, что делает эту проблему весьма актуальной. Целью настоящей работы стал анализ роли инактивации  $H^+$ -АТФазы в реализации влияния ВП на дыхание листьев гороха.

Объектами исследования служили 2-3-недельные проростки гороха *Pisum sativum* L. (сорт "Альбумен"), выращенные на гидропонике в климатической камере в условиях 16-часового светового дня. ВП индуцировался ожогом листа открытым пламенем. Электрофизиологические измерения проводились методом экстраклеточного отведения с использованием стандартной установки регистрации электрической активности. Исследование интенсивности дыхания интактных проростков гороха осуществляли у неповрежденного листа с использованием инфракрасного газоанализатора GFS-3000 в условиях отсутствия освещения. При этом поддерживались заданные параметры влажности, температуры и содержания  $CO_2$ .

Анализ участия  $H^+$ -АТФазы в вызванном ВП ответе дыхания на уровне целого растения осуществляли путем модификации ее активности. Для этого листья опытных растений в течении двух часов вымачивали в растворах активатора  $H^+$ -АТФазы фузикокина (ФК) и ее ингибитора ортованадата натрия (ОВ) (конечные концентрации – 1  $\mu M$  и 500  $\mu M$ , соответственно), после чего исследовали влияние ВП на дыхание.

В отдельной серии экспериментов влияние инактивации  $H^+$ -АТФазы на дыхательные процессы было исследовано с помощью модельной системы изолированных протопластов проростков гороха. Интенсивность дыхания

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

суспензии протопластов оценивали по скорости потребления кислорода с использованием оксиграфа Oxygraph Plus System. Инактивация  $H^+$ -АТФазы, которая имитировала снижения активности этого фермента при генерации ВП, осуществляли добавлением ОВ (конечные концентрации 100  $\mu$ M и 250  $\mu$ M) в суспензию протопластов.

Было показано, что локальный ожог первого зрелого листа вызывал распространение ВП во второй зрелый лист. В дальнейшем, во втором листе развивалась обратимая активация дыхания, величина которой коррелировала с амплитудой ВП, что показывает ключевую роль варибельного потенциала в индукции этого ответа.

Далее было показано, что интенсивность дыхания и ее изменения, вызванные ВП, зависели от активности  $H^+$ -АТФазы. Так при обработке ОВ, который ингибировал  $H^+$ -АТФазу, наблюдалось достоверное увеличение уровня дыхания, а при обработке ФК, активирующим этот фермент, была выявлена тенденция к возрастанию интенсивности дыхательного процесса. Дальнейший анализ показал, что предварительная обработка ОВ достоверно уменьшает вызванный ВП ответ дыхания, а при обработке ФК – наблюдается тенденция к увеличению такого ответа.

Исследование модельной системы протопластов показало, что добавление ОВ вызывает активацию поглощения  $O_2$  в условиях затемнения. Ответ развивается в течение нескольких минут. Такие изменения потребления кислорода отражают стимуляцию дыхания и, дополнительно, показывают влияние активности  $H^+$ -АТФазы на дыхательный процесс.

Наши результаты показали, что основным механизмом активации дыхания является, по-видимому, инактивация  $H^+$ -АТФазы, которая, как известно, является основным механизмом генерации ВП. В пользу этого механизма свидетельствует снижение ответа дыхания при уменьшении активности  $H^+$ -АТФазы, тенденция к его увеличению при повышении активности фермента, и активация дыхания при имитации варибельного потенциала путем ингибирования  $H^+$ -АТФазы в модельной системе изолированных протопластов.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №14-26-00098.



Предобработка этиленом растений *Arabidopsis thaliana* и особенности накопления в них полиаминов при УФ-В стрессе  
Effect of ethylene treatment on polyamines levels in *Arabidopsis thaliana* under UV-B radiation stress.

Ракитин В.Ю., Власов П.В., Прудникова О.Н., Ракитина Т.Я.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева Российской академии наук; ул. Ботаническая 35, 127276, Москва

+7 495 9779245, +7 495 9778018, rakit@ippras.ru

Данная работа предпринята для выяснения роли этилена в регуляции УФ-В-индуцированного изменения содержания ПА (полиаминов).

Объектами исследования для выяснения участия СПЭ (сигнального этиленового пути) в регуляции содержания ПА при УФ-В стрессе служили двухнедельные растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа Columbia (Col-0) дикого типа (WT), мутанта *etr1-1* с нарушенной рецепцией этилена, связывающего только 20% этилена по сравнению с WT растениями, и мутанта *ctr1-1*, нечувствительного к этилену с конститутивно активированным СПЭ. Обработку растений этиленом в концентрации 1мкл/л проводили в стеклянных герметичных камерах в течение 24 часов. Затем растения облучали умеренной (9 кДж/м<sup>2</sup>) или высокой (18 кДж/м<sup>2</sup>) дозами УФ-В. Содержание свободных полиаминов (ПА) в побегах определяли в виде бензоильных производных методом ВЭЖХ.

Экзогенный этилен не влиял на содержание ПА (Put, Spd, Spm) в побегах необлученных растений *A. thaliana* WT, *etr1-1* и *ctr1-1*.

УФ-В радиация индуцировала в растениях *A. thaliana* WT, *etr1-1* и *ctr1-1* многократный дозозависимый всплеск синтеза этилена с максимумом через 5 ч после облучения. Следовательно, изменения в содержании Put в облученных УФ-В растениях, не подвергнутых и подвергнутых действию экзогенного этилена, происходили на фоне повышенного уровня эндогенного этилена.

В побегах растений, облученных умеренной и высокой дозами УФ-В, за сутки содержание Put возрастало у *A. thaliana* WT в 6.4 и 3.0 раза, у *etr1-1* в 4.5 и 3.2 раза, у *ctr1-1* в 5.5 и 4.7 раза соответственно.

В экспериментах с предварительной обработкой этиленом содержание Put в розетках за сутки после облучения умеренной и высокой дозами УФ-В возрастало, соответственно, у растений WT в 4.4 и 2.4 раза, у *etr1-1* – в 4.2 и 2.0 раза, у *ctr1-1* – в 5.5 и 4.7 раза.

У облученных УФ-В растений WT и *etr1-1*, но не у *ctr1-1* предварительная обработка этиленом приводила к меньшему накоплению Put, чем у растений, не подвергнутых действию экзогенного этилена.

Также следует отметить, что у растений WT, *etr1-1*, *ctr1-1* после облучения высокой дозой УФ-В происходило меньшее накопление Put и большее расходование Spd и Spm, чем после умеренной дозы. Это могло стать результатом либо менее интенсивного синтеза, либо большего расходования ПА после облучения высокой дозой УФ-В. Второе представляется более

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

вероятным, поскольку Put, являясь предшественником Spd и Spm, расходуется на поддержание уровня этих ПА, необходимого для инактивации УФ-В-индуцированных АФК и свободных радикалов.

#### Влияние кадмия на содержание глутатиона и транскриптов генов глутатионсинтетазы в корнях и листьях пшеницы

The cadmium effect on glutathione and glutathione synthetase gene transcripts content in wheat root and leaves

Репкина Н.С., Таланова В.В.

ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Россия

+7 8142 76-27-12, nrt9@ya.ru

Глутатион является одним из важнейших низкомолекулярных протекторных соединений. Он участвует в поддержании окислительно-восстановительного потенциала, работе ферментативных антиоксидантов, восстановлении других низкомолекулярных антиоксидантов, способен непосредственно ингибировать активные формы кислорода и вовлечен в механизмы детоксикации тяжелых металлов. Синтез глутатиона осуществляется в два этапа. Первый этап катализируется ферментом  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазой, тогда как второй – ферментом глутатионсинтетазой (GS). У пшеницы этот фермент кодируют гены *GS1* и *GS3*, которые являются гомологами. Цель данной работы заключалась в изучении содержания глутатиона и экспрессии генов, кодирующих фермент его синтеза – глутатионсинтетазу (*GS1* и *GS3*) в корнях и листьях пшеницы при действии кадмия.

Исследования проводили на 7-дневных проростках пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, которые в течение недели подвергали действию сульфата кадмия (100 мкМ). Исследование ростовых показателей проводили с использованием общепринятых методов. Содержание кадмия в корнях и листьях проростков определяли методом инверсионной вольтамперометрии. О развитии окислительного стресса судили по накоплению малонового диальдегида (МДА). Для анализа содержания транскриптов генов *GS1* и *GS3* в корнях и листьях пшеницы использовали метод ПЦР в режиме реального времени.

Установлено, что на протяжении 7 сут воздействия наблюдается отрицательное действие кадмия на рост растений, однако полной остановки роста не обнаружено, что свидетельствует о том, что проростки пшеницы способны адаптироваться к действию кадмия в концентрации 100 мкМ.

В ходе проведенных нами исследований существенных изменений в содержании МДА по отношению к контролю в корнях проростков под влиянием кадмия не зафиксировано. Некоторое повышение уровня МДА в листьях проростков пшеницы отмечено при длительном воздействии кадмия (3–7 сут).

Показано, что уже через 1 ч от начала действия кадмия на проростки пшеницы происходит его накопление в корнях, по мере увеличения продолжительности воздействия содержание кадмия возрастает в течение 7 сут эксперимента. Поступление кадмия в листья обнаружено лишь через 1 сут от начала воздействия, максимальное его значение зафиксировано на 7 сут, однако в этом случае оно было заметно ниже, чем в корнях. Меньшее накопление кадмия в листьях может быть связано с тем, что уже в начальный период его действия в корнях происходит активация механизмов защиты, направленных на предотвращение его поступления в надземную часть растений.

В ходе исследований установлено, что уже в начальный период действия ионов кадмия содержание транскриптов гена *GS1* в корнях и листьях проростков пшеницы возрастает, причем повышенный уровень мРНК *GS1* сохраняется на протяжении всего эксперимента. Отметим также, что в корнях проростков содержание мРНК гена *GS1* было заметно выше, чем в листьях. Динамика содержания транскриптов гена *GS3* имела сходный характер, однако их накопление происходило в большей степени в листьях проростков. Наряду с повышением содержания транскриптов генов *GS1* и *GS3*, кодирующих фермент глутатионсинтазу, в корнях проростков пшеницы наблюдалось увеличение содержания глутатиона. Причем содержание глутатиона значительно повышалось уже через 1 ч от начала действия кадмия, несколько снижалось через 1 сут, однако и при более длительных экспозициях (2 – 7 сут) его содержание оставалось высоким и заметно превышало исходные значения. Показано, что в начальный период действия (15 – 30 мин) сульфата кадмия на корни растений наблюдалось небольшое повышение содержания глутатиона в листьях пшеницы, тогда как в дальнейшем, через 1 сут происходило его снижение. Значительное уменьшение (примерно в 2 раза) его содержания отмечено на 7-е сут. Обнаруженное нами снижение содержания глутатиона, может свидетельствовать об его вовлечении в защитные реакции растений уже в начальный период действия кадмия и расходе на связывание ионов металла и последующую нейтрализацию, а также на синтез производных глутатиона – фитохелатинов, ключевых хелатирующих агентов. Таким образом, совокупность полученных результатов позволяет заключить, что глутатион и гены глутатионсинтазы *GS1*, *GS3* участвуют в адаптации растений пшеницы к действию кадмия.

## Специфичность взаимоотношений сигнальных молекул дикорастущих галофитов

### Specificity relationships signaling molecules of wild halophytes

Розенцвет О.А.<sup>1</sup>, Нестеров В.Н.<sup>1</sup>, Богданова Е.С.<sup>1</sup>, Захожий И.Г.<sup>2</sup>,  
Табаленкова Г.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии Волжского бассейна Российской академии наук, ул. Комзина, 10, Тольятти, Россия

+7 8482 48-96-09, [olgarozen55@mail.ru](mailto:olgarozen55@mail.ru), [nesvik1@mail.ru](mailto:nesvik1@mail.ru), [cornales@mail.ru](mailto:cornales@mail.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, ГСП-2, ул. Коммунистическая, 28, Сыктывкар, Россия

+7 8212 24-96-87, [zakhozhiy@ib.komisc.ru](mailto:zakhozhiy@ib.komisc.ru), [tabalenkova@ib.komisc.ru](mailto:tabalenkova@ib.komisc.ru)

Избыточное содержание солей в почве является одним из главных факторов окружающей среды, лимитирующих рост и продуктивность растений. Согласно существующей модели изменения климата в ближайшие годы следует ожидать изменения распределения осадков, увеличения средней температуры и количества засоленных территорий. Галофиты представляют собой экологически специализированную группу растений, способных осуществлять жизненный цикл на почвах с высоким содержанием солей. В отличие от гликофитов, они в процессе эволюции выработали специальные механизмы устойчивости к засолению. Эти растения способны контролировать поступление солей, поддерживать осмотический баланс и транспорт воды в клетках, более эффективно обезвреживать свободные радикалы. Регуляция активности конститутивных и индуцибельных клеточных компонентов основана на координации взаимосвязанных путей в сложной сети сигнальных систем. Число веществ, выполняющих функции медиаторов сигнальных систем, постоянно возрастает. Такую роль могут выполнять фитогормоны, перекись водорода и активные формы кислорода, липиды и их метаболиты, ионные каналы, сахара, свободные аминокислоты, антиоксидантные ферменты.

Цель данной работы состояла в исследовании специфичности взаимоотношений сигнальных молекул в клетках дикорастущих галофитов. Объектами исследования выбраны растения, различающиеся по систематическому положению (сем. *Chenopodiaceae*, *Plumbaginaceae*, *Asteraceae*), типу регуляции солевого обмена (эу-, крино- гликогалофиты), жизненной форме (однолетние травы, полукустарнички), водному режиму (мезоксерофиты, ксеромезофиты). Обнаружено уменьшение содержания ионов К, Na, Са в ряду: эугалофиты однолетние травы > эугалофит + криногалофит полукустарнички > гликогалофит полукустарничек.

Уровень процессов ПОЛ был в 2 и более раз выше у крино- и гликогалофитов. Выход электролитов из клеток листьев эугалофитов был на 35-40% выше, чем у крино- и гликогалофитов. В целом мембранные системы исследуемых

галофитов обладают высокой устойчивостью к повреждающему действию солей – степень повреждения мембран не превышала 15%. Содержание С в листьях галофитов коррелировало с мембранной проницаемостью клеток–для видов *L. gmelinii* и *A. santonica* отмечена низкая проницаемость мембран и более высокое количество С на фоне низкого содержания Na. Содержание липидов снижалось в ряду: *A. santonica* > *L. gmelinii* > *H. strobilaceum* > *S. linifolia* > *S. perennans*. В такой же последовательности менялось суммарное содержание мембранных глико- (ГЛ) и фосфолипидов (ФЛ). Для крино- и гликогалофитов характерно преобладание ГЛ, образующих фотосинтезирующие мембраны, для истинных галофитов установлено большее/либо равное содержание ФЛ – компонентов внехлоропластных мембран. Кроме того, в листьях *A. santonica* и *L. gmelinii*, обнаружено большое количество запасных НЛ.

Растения *A. santonica* в сравнении с остальными видами содержат на порядок больше водорастворимых и мембраносвязанных белков. Мембраны клеток *A. santonica* и *S. perennans* обогащены белками, а *L. gmelinii* – липидами. Данные об активности СОД показали, что большая активность проявляется у глико- и криногалофитов в сравнении с эугалофитами. Увеличение активности СОД коррелировало с увеличенным содержанием МДА, что подтверждает компенсаторную роль водорастворимых белков в ответ на активацию процессов ПОЛ, характерную для крино- и гликогалофитов.

Стрессовые АК, к которым относятся аланин, фенилаланин,  $\gamma$ -аминобутировой кислота и пролин составляли в клетках эугалофитов 54–71%, криногалофита– 71%, гликогалофита – 88% от суммы АК. В составе свободных АК гликогалофита *A. santonica* доминировал пролин (82%), а у эугалофитов и криногалофита значительная часть «стрессовых» АК представлена аланином и  $\gamma$ -аминобутировой кислотой.

Таким образом, общее содержание С увеличивалось в ряду эу → крино- → гликогалофиты и сопровождалось увеличенным содержанием суммарных и мембранных липидов, суммарных и мембранных белков. Такая же закономерность выявлена для компонентов антиоксидантной системы (содержанию эндогенных пролина, растворимого белка, ПОЛ и уровню общей активности СОД). Между некоторыми антиоксидантными реакциями существуют выраженные реципрокные отношения, которые наиболее четко заметны между уровнем пролина и выходом электролитов. Это указывает на то, что вклад сигнальных молекул, участвующих в различных сигнальных путях, не равнозначен и зависит от стратегии солеустойчивости растений.

## Засуха индуцирует повышение экспрессии генов семейства *ATG8 Triticum aestivum*

Drought stress stimulates expression of *ATG8* gene family of *Triticum aestivum*

Рябовол В.В.,<sup>1</sup> Килеева М.С.,<sup>2</sup> Минибаева Ф.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111, ул. Лобачевского 2/31, Казань, Россия

+7 843 2319045, +7 843 292-7347, vicry@yandex.ru

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420000 ул. Кремлевская, 18, Казань, Россия

Аутофагия – это универсальный катаболический процесс внутриклеточной деградации различных макромолекул и органелл. Для растения аутофагия важна для нормального развития в ходе органоморфогенеза и онтогенеза, а также при ответах на действие неблагоприятных факторов среды. Этот процесс выступает в качестве важного регуляторного механизма для ликвидации поврежденных органелл, патогенов, а также долгоживущих, абнормальных или агрегированных белков, удаление которых происходит с помощью специальных двухмембранных компартментов – аутофагосом. Активность убиквитин-подобного белка *ATG8* является необходимым условием формирования аутофагосом. В то время, как у дрожжей и других представителей царства грибов имеется один ген *ATG8*, растения обладают целым мультигенным семейством *ATG8*. Вопрос необходимости наличия большого генного семейства *ATG8* в растениях до сих пор остается открытым. В частности, неизвестно, как изменяется активность различных изоформ *ATG8* при различных видах абиотического стресса, в том числе при засухе. Новая информация о количестве, структуре и экспрессии *ATG* генов позволит выяснить механизмы тонкой регуляции аутофагической активности в клетках растений при стрессе. С использованием баз данных URGI BLAST and Phytozome было обнаружено, что в гексаплоидной пшенице (*Triticum aestivum* L.) семейство *ATG8* представлено, по крайней мере, девятью генами, которые подразделяются на три подсемейства 1) *ATG8 I* кодирует шесть изоформ a-f; 2) *ATG8 II* кодирует белок g; 3) *ATG8 III* кодирует изоформы h, i и j. Каждое подсемейство включает три гомеологичных гена, локализованных на гомеологичных хромосомах 2AS, 2BS и 2DS. Гены *ATG8* имеют схожее строение: состоят из пяти экзонов и четырех интронов. В интронных областях обнаружены сайты альтернативного полиаденилирования, с помощью которых может происходить регуляция альтернативного сплайсинга и контроль экспрессии генов *ATG8*. С помощью молекулярного клонирования нами были обнаружены и секвенированы продукты активности генов каждого из трех подсемейств *ATG8 T. aestivum*. С целью выявления активности генов *ATG8* в растительных тканях нами был проведен ПЦР-анализ в реальном времени. Образование транскриптов генов *TaATG8* наблюдали как в листьях, так и в корнях нестрессированных растений. Обнаружено, что в листьях гены

*ATG8* экспрессируются в несколько раз интенсивнее, чем в корнях (для *ATG8 I* – в 15 раз, для *ATG8 II* и *ATG8 III* – в 9 раз). При действии засухи, которая сопровождалась торможением ростовых процессов, снижением общего содержания воды и повышением уровня АФК в листьях, наблюдали повышение экспрессии генов семейства *ATG8*. Уровень экспрессии генов подсемейств *ATG8 I* и *ATG8 II* увеличивался на 10 день после прекращения полива растений. Количество транскриптов *ATG8 III* повышалось значительно (в 10 раз) только на 12 день обезвоживания. Полученные данные свидетельствует о вовлечении генов семейства *ATG8* в регуляцию аутофагии у растений при засухе. Обсуждается роль аутофагии в защитном ответе растительных клеток в условиях засухи.

## Экспрессия генов ключевых десатураз жирных кислот при адаптации к гипотермии *A.thaliana*

Expression of key fatty acid desaturase genes during *A. thaliana* adaptation to hypothermia

Селиванов А.А., Попов В.Н., Антипина О.В., Алиева Г.П., Мошков И.Е.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Физиологии растений им. А.К. Тимирязева РАН, 127276, ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия

+7 499 231-83-26, [aselivanov123@yandex.ru](mailto:aselivanov123@yandex.ru)

Гипотермия – один из основных повреждающих факторов окружающей среды, вызывающий изменения в жизнедеятельности растительной клетки, приводящие к её повреждению и гибели. Неоднородность температурных режимов явилась причиной выработки у многих видов ряда механизмов для обеспечения жизнедеятельности растений в условиях холодого стресса. В природных условиях понижение температуры обычно происходит постепенно, давая возможность растению перестроить метаболизм для формирования устойчивости к стрессовому воздействию. Этот процесс носит название холодовой адаптации. Адаптационные изменения, происходящие в период действия низких закаливающих температур, затрагивают множество физиологических процессов. Так, одним из основных механизмов, обеспечивающих формирование устойчивости к гипотермии, является поддержание жидкостных свойств мембран. Степень изменения жидкостных свойств мембран в зависимости от температурных колебаний обусловлена соотношением моно-, ди- и полиненасыщенных жирных кислот в составе липидов мембран. За образование двойных связей в молекулах жирных кислот, входящих в состав липидов мембран, ответственны ферменты – десатуразы жирных кислот. Десатуразы достаточно подробно изучены у цианобактерий, данные о работе и регуляции этих ферментов у высших растений при понижении температуры весьма фрагментарны.

Объект исследования – листья *Arabidopsis thaliana* экотипа Col-0. Растения выращивали в течение 7-8 недель (до фазы полностью сформированной розетки) при 22°C и 8-часовом фотопериоде. Растения закаливали 5-суток при 2°C. Тестом на успешное проведение закаливания служило суточное промораживание растений в диапазоне температур от –3°C до –8°C. Визуальные данные о выживаемости подтверждали измерением выхода электролитов из тканей листьев. Незакаленные растения повреждались уже при –4°C (выход электролитов 57%), а при температуре –5°C погибали. Закаленные растения после промораживания при температурах вплоть до –6°C повреждались незначительно (выход электролитов не более 36%), после перемещения в нормальные условия вегетации проходили полный жизненный цикл, включая цветение и формирование семян. Только при температуре –7°C закаленные растения получали значительные повреждения (выход электролитов 70%) и погибали. Эти данные свидетельствуют о том, что



процесс холодовой адаптации, по-видимому, затрагивает мембранные структуры клетки, что делает целесообразным исследование транскрипции генов десатураз.

Для исследования изменений транскрипции генов десатураз образцы листьев растений *A. thaliana* отбирали на третьи и пятые сутки периода закаливания. При помощи метода real-time PCR исследовали транскрипцию следующих генов десатураз: *ADS2* (кодирует  $\Delta 9$ -десатуразу), *FAD2* (кодирует  $\Delta 12$ -десатуразу), *FAD7* (кодирует  $\omega 3$ -десатуразу). В качестве референсного гена использовали ген актина *ACT2* (ген «домашнего хозяйства»).

Уровень содержания транскриптов указанных генов десатураз в контрольных растениях сравним между собой, и имеет лишь незначительные отклонения. Однако в процессе закаливающего воздействия пониженной температуры наблюдалось повышение уровня транскрипции всех указанных генов. Интенсивность транскрипции гена *ADS2* возрастала в 7,5 раз на третьи сутки закаливания, и достигала 17-кратного увеличения по сравнению с контрольными растениями на 5-е сутки закаливания. Уровень транскрипции гена *FAD2* на 3-и сутки оставался на уровне контрольных растений, на 5-е превышал их в 5 раз. Уровень транскрипции гена *FAD7* на 3-и сутки сравним с контрольными растениями, на 5-е возрастает в 4,5 раза. В целом можно отметить, что рост содержания транскриптов гена *ADS2* происходит раньше по времени, а его интенсивность выше приблизительно в три раза, нежели у генов *FAD2* и *FAD7*. Этот факт, по-видимому, объясняется тем, что кодируемая геном *ADS2*  $\Delta 9$ -десатураза катализирует образование первой двойной связи в ацильных радикалах жирных кислот, что является необходимым условием для последующих реакций десатурации, идущих строго последовательно.

Таким образом, обнаруженный рост транскрипции генов десатураз может вести к увеличению количественного содержания белков десатураз и, впоследствии, к росту уровня ненасыщенных жирных кислот в молекулах липидов мембран, обеспечивая закаленным растениям способность сохранять жизнеспособность даже при отрицательной температуре.

Структурные и функциональные особенности фотосинтетического аппарата хлорофилл-содержащих тканей лозы сортов винограда, отличающихся по морозостойкости

Structural and functional features of the photosynthetic apparatus of chlorophyll-containing tissues of grapes differ in cold resistance

Сундырева М.А.<sup>1</sup>, Яныкин Д.В.<sup>2</sup>, Христин М.С.<sup>2</sup>, Тихонов К.Г.<sup>2</sup>, Климов В.В.<sup>2</sup>, Креславский В.Д.<sup>2,3</sup>, Савченко Т.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, 350901, ул. 40-летия Победы, д. 39, г. Краснодар, Россия

+7 861 252-70-74, +7 861 257-57-02, [kubansad@kubannet.ru](mailto:kubansad@kubannet.ru)

<sup>2</sup> Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, 142290, ул. Институтская, д.2, г. Пушкино, Россия

+7 4967 73-36-01, +7 4967 79-05-32, [ifpb@issp.serpukhov.su](mailto:ifpb@issp.serpukhov.su)

<sup>3</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, 127276, ул. Ботаническая, д. 35, Москва, Россия

+7 499 977-80-22, +7 499 977-80-18, [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru)

Список сокращений: ФС - фотосистема

Фотосинтез в тканях под наружной корой стволов и одревесневших побегов многолетних растений протекает в условиях, сильно отличающихся от внутренней среды хлоропластов листа. Помимо того, что эти ткани характеризуются высоким содержанием CO<sub>2</sub>, низкой концентрацией O<sub>2</sub> и сильно закисленной средой, фотосинтетических антенн в этих тканях достигает только свет, прошедший сквозь внешнюю кору. В отличие от листьев листопадных растений хлоренхима зимующих органов подвержена температурным флуктуациям всех сезонов года, а значит, фотосинтетический аппарат в одревесневших стеблях должен быть приспособлен к более широкому диапазону температур внешней среды. Для выявления особенностей, обуславливающих способность фотосинтетического аппарата хлоренхимных клеток одревесневших органов растений осуществлять биологические функции в разных условиях освещенности и температуры окружающей среды, были проведены исследования фотосинтезирующих тканей внутренней коры лозы двух гибридных форм винограда (*Vitis vinifera* L.) ТАНА 42 и ТАНА 33, контрастных по устойчивости к низкотемпературному стрессу, в нормальных условиях и после воздействия субоптимальных температур и света высокой интенсивности. Сравнительный анализ содержания фотосинтетических пигментов и низкотемпературных спектров флуоресценции хлорофилла в хлоренхеме листьев, молодых побегов и одревесневших черенков винограда позволил обнаружить высокое относительное содержание хлорофилла b и каротиноидов в тканях лозы, а также высокое отношение содержания ФС2 к ФС1. Измерения параметров переменной флуоресценции хлорофилла выявили высокую фотохимическую

активность ФС2 в тканях внутренней коры лозы винограда, а также высокую устойчивость фотосинтетического аппарата лозы винограда к замораживанию и пониженную устойчивость к свету высокой интенсивности по сравнению с листом. Фотохимическая активность в кортексе лозы морозостойкой сортоформы ТАНА 42 выше, чем в кортексе лозы менее устойчивой к низким температурам ТАНА 33. Значения максимального квантового выхода и эффективного квантового выхода на постоянном действующем свете значительно выше у морозостойкой формы ТАНА 42, чем у чувствительной формы ТАНА 33 после воздействия субоптимальных температур. Впервые показано, что в ответ на изменяющиеся условия освещенности фотосинтетический аппарат хлоренхимных клеток лозы претерпевает перестройки фотосинтетического аппарата, ведущие к перераспределению энергии между фотосистемами, причем данные процессы более выражены у морозостойкой сортоформы ТАНА 42, чем у менее устойчивой формы ТАНА 33. Полученные результаты позволяют предположить, что морозостойкость ТАНА 42 отчасти связана с активностью кортикального фотосинтеза.

Влияние засоления разной интенсивности на трансгенные растения табака экспрессирующие PIP2;1 аквапорин ячменя  
Effect of salinity of different intensity on transgenic tobacco expressing PIP2;1 barley aquaporin

Кулуев Б.Р.<sup>1</sup>, Шарипова Г.В.<sup>2</sup>, Веселов Д.С.<sup>2</sup>, Кудоярова Г.Р.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и генетики УНЦ РАН

<sup>2</sup> Уфимский институт биологии РАН, Уфа

Проницаемость плазмолеммы для воды играет важную роль в жизни растений, поскольку от нее зависит растяжение клеток, а также поддержание потока воды от клетки к клетке. Открытие водных каналов аквапоринов и их присутствия в плазмолемме позволяет понять, как ее проницаемость может изменяться за счет увеличения количества и активности аквапоринов. Идентификация генов из семейства PIP (Plasma membrane Intrinsic Protein) сделало возможным получение трансгенных растений с повышенной экспрессией генов аквапоринов. Однако, данные о том, как это сказывается на устойчивости растений к дефициту воды, оказались довольно противоречивыми. Необходимо отметить, что в этих работах недостаточно внимания уделялось интенсивности стрессовых воздействий. Для того чтобы восполнить этот пробел нами были получены трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *HvPIP2;1* ячменя, играющего, судя по данным литературы, важную роль в проведении воды у растений этого вида, и изучено влияние на растения дефицита воды, вызванного засолением разной интенсивности. Выбор гена аквапорина *HvPIP2;1* обусловлен тем, что растения ячменя относительно устойчивы к засолению.

Трансгенные растения табака 35S:: *HvPIP2;1* получали методом агробактериальной трансформации. Растения табака выращивали в сосудах с почвой при достаточном увлажнении и освещенности 400 ммоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>. Экспрессию генов аквапоринов определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени, с использованием в качестве референса ген фактора элонгации EF-1α. Высечки из листьев инкубировали в течение 2 суток в 10 % растворе Хогланда-Арнона (контроль) и 100 мМ, 300 мМ и 500 мМ растворах NaCl и освещенности 400 ммоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> и затем определяли их сырой вес и содержание хлорофилла. Осмотический потенциал питательного раствора и сока из высечек листьев, полученного центрифугированием их гомогената, измеряли с помощью осмометра ("Camlab Ltd.", Великобритания).

Оценка осмотического потенциала высечек листьев показала увеличение концентрации осмотически активных веществ при инкубации высечек на растворах хлорида натрия. На фоне 100 мМ NaCl накопление осмотиков (от -0,7 МПа в контроле до -1,1 МПа) обеспечивало поддержание разницы осмотического потенциала между клетками листа и раствором на уровне, близком к таковому в варианте с 10 % раствором Хогланда-Арнона (0,67 и 0,62 МПа в контроле и на фоне 100 мМ NaCl, соответственно). Однако на фоне 300 мМ хлорида натрия накопление осмотиков было недостаточным, и выявлено резкое снижение разницы осмотического потенциала между листом и раствором (на 0,2 МПа по сравнению с контролем). Увеличение концентрации

NaCl до 500 мМ сопровождалось резким падением осмотического потенциала, что свидетельствует о разрушении барьера от проникновения токсичных ионов в лист. На накопление токсичных веществ указывало резкое снижение концентрации хлорофилла в высечках листьев при их инкубации в растворе с 500 мМ NaCl. Различий по осмотическому потенциалу и содержанию хлорофилла между растениями различных генотипов выявлено не было.

Изучение экспрессии собственного аквапорина *NiPIP2;1* у растения табака показало возрастание уровня его транскриптов с возрастом листа. Поэтому мы выбрали для дальнейшей работы молодые листья, в которых вклад трансгена, экспрессия которого контролировалась конститутивным промотором, должен быть выше.

За первый день инкубации высечек листьев на свету их масса при экспозиции на 10 % растворе Хогланда-Арнона увеличивалась на 43-44 %, что свидетельствует об их способности расти, в основном очевидно за счет поглощения воды. При этом прибавка в массе была одинаковой у растений табака различных генотипов. На фоне 100 мМ NaCl у трансгенных растений, экспрессирующих *HvPIP2;1*, скорость увеличения массы высечек оставалась такой же, как и на фоне 10 % Хогланда-Арнона, но снижалась у растений, трансформированных «пустым» вектором, где прибавка составила лишь 28 % по сравнению с исходной массой. Очевидно, большее накопление массы у трансгенных растений экспрессирующих аквапорин ячменя было связано с их лучшей способностью поглощать воду. На фоне 300 мМ NaCl прибавка в массе уменьшалась до 15 % от исходной, а при 500 мМ концентрации – наблюдалась потеря в массе высечек. На второй день на фоне 500 мМ NaCl потеря в массе была достоверно выше у трансгенных растений, экспрессирующих *HvPIP2;1*. Таким образом, сверхэкспрессия гена аквапорина повышала способность клеток листа поглощать воду в том случае, когда осмотическая регуляция поддерживала градиент водного потенциала. Когда осморегуляция не срабатывала, и происходил обратный ток воды из клеток, повышение проницаемости мембран за счет дополнительной экспрессии аквапорина отрицательно сказывалось на оводненности тканей листа, усиливая потери воды. Таким образом, в зависимости от интенсивности стресса повышенная за счет экспрессии аквапоринов проницаемость мембран может играть, как положительную, так и отрицательную роль.

Работа была выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 14-04-97077.

Новый метод создания контролируемого водного стресса, его эффект на рост хлопчатника и сои при нормальной и повышенной концентрации двуокиси углерода

A new method of applying a controlled soil water stress, and it's effect on the growth of cotton and soybean seedlings at ambient and elevated carbon dioxide

Nasirov M.<sup>1</sup>, Bunce J.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Botany and Plant physiology, Samarkand State University, Samarkand, Uzbekistan

<sup>2</sup> Crop Systems and Global Change Laboratory, B-001, Beltsville Agricultural Research Center. 10300 Baltimore Avenue, Beltsville, MD 20705-2350

*muhtorgn@gmail.com*

While numerous studies have shown that elevated CO<sub>2</sub> can delay soil water depletion by causing partial stomatal closure, few studies have compared responses of plant growth to the same soil water deficits imposed at ambient and elevated CO<sub>2</sub>. We applied a vacuum to ceramic cups in pots filled with soil to reduce the soil water matric potential to -0.10 MPa. This system resulted in uniform soil water content throughout the pot, and was used to maintain a constant mild stress for seven days. In cotton, the soil water stress treatment reduced stomatal conductance at both 380 and 560  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  CO<sub>2</sub>, but the reduction was relatively smaller at the higher CO<sub>2</sub>. No reduction of photosynthesis measured under the daytime growth conditions occurred at elevated CO<sub>2</sub> in stressed cotton plants, while photosynthesis was reduced by the stress in the lower CO<sub>2</sub> treatment. The soil water stress treatment reduced the leaf area and biomass of cotton at the lower, but not at the higher CO<sub>2</sub>. In soybean, the soil water stress treatment reduced stomatal conductance, photosynthesis and growth at both CO<sub>2</sub> levels, but the effect of water stress was not less at elevated than ambient CO<sub>2</sub>. In neither species nor CO<sub>2</sub> level did the soil water stress treatment cause a detectable change in daytime leaf water potential. In both species, the stomatal closure with the soil water stress may have resulted from the lower soil to leaf hydraulic conductivity. The failure of high CO<sub>2</sub> to protect soybean growth from the soil water stress might be related to the lower hydraulic conductivity of stressed soybeans grown at elevated compared with ambient CO<sub>2</sub>.

## Влияние электрических сигналов на процесс транспирации в условиях высокотемпературного стресса

Electrical signals influence on transpiration in high-temperature stress conditions

Шерстнева О.Н., Сурова Л.М., Бушуева А.В., Мудрилов М.А., Сухов В.С.

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Гагарина пр-т, 23, 603950, Нижний Новгород, Россия

+7 831 462-32-14, +7 831 462-32-02, [sherstneva-oksana@yandex.ru](mailto:sherstneva-oksana@yandex.ru)

Известно, что изменение транспирации связано с состоянием устьичного аппарата, что является одним из механизмов регуляции водного обмена и температурных реакций в условиях засухи и высокотемпературного стресса. В частности, известно, что такой фитогормон как АБК участвует в стрессовом ответе, уменьшая водную проводимость устьиц и, соответственно, транспирацию. С другой стороны, имеются определённые данные о способности электрических сигналов (ЭС), в частности переменного потенциала (ВП), регулировать водную проводимость листьев. Таким образом, целью данного исследования стал анализ влияния ЭС на процесс транспирации в контрольных условиях и условиях высокотемпературного стресса.

Эксперименты проводились на 2-3-недельных проростках гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Переменный потенциал (ВП) индуцировался ожогом открытым пламенем. Регистрация электрической активности проводилась с помощью стандартной электрофизиологической установки с экстраклеточным отведением. Исследование параметров фотосинтеза осуществлялось с помощью измерительной системы, включающей РАМ-флуориметр Dual-PAM-100, газоанализатор GFS-3000, а также измерительный блок Dual-PAM gas exchange Cuvette 3010-Dual. Исходные значения освещения, температуры, и содержания углекислого газа, а также локальный прогрев листа обеспечивали с помощью этой же системы.

Было показано, что ожог листа вызывал генерацию ВП у гороха, который в большинстве случаев проходил в исследуемый лист. При этом наблюдались многофазные изменения транспирации, в частности, кратковременное (~ 5 мин) снижение транспирации, затем её увеличение и более продолжительный (~ 30 мин) и выраженный по амплитуде спад.

Известно, что генерация ВП у растений связана с изменением активности  $H^+$ -АТФазы, которая в свою очередь определяет открытость устьиц. Логично предположить, что снижение активности  $H^+$ -АТФазы при развитии ВП вызывает закрытие устьиц, которое может приводить к увеличению устойчивости растения к температурному стрессу. Для проверки этого предположения исследовалось влияние ВП на транспирацию и анализ участия  $H^+$ -АТФазы в этом ответе, для чего лист гороха вымачивался в ингибиторе метаболизма - ортованадате натрия (0,5 мМ). Было показано, что амплитуда ВП существенно снижалась после обработки ортованадатом натрия, так как

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

значительный вклад в формирование этого сигнала вносит именно метаболическая компонента. Кроме того, при небольшом снижении исходного уровня транспирации после обработки ортованадом ответ транспирации при генерации ВП подавлялся в 3 раза. Эти данные показывают что изменение активности  $H^+$ -АТФазы является ключевым механизмом в регуляции открытия устьиц.

Можно предположить, что вызванное ВП изменение транспирации влияет на состояние листа при прогреве. Для проверки этого исследовались параметры ответа фотосинтеза при повышении внешней температуры с  $23^{\circ}C$  до  $53^{\circ}C$  в контрольных условиях (без ВП) и после развития ВП, вызванного локальным ожогом. Было показано, что снижение транспирации при ВП приводит к усилению нагрева листа, которое в свою очередь вызывает достоверный рост повреждения фотосистемы II, что можно рассматривать как часть адаптивного ответа. В частности, такое повреждение может быть механизмом защиты фотосистемы I в условиях высокотемпературного стресса. Так показано, что индукция ВП достоверно повышает квантовый выход ФСII после прогрева, причём такое повышение активности ФСII коррелирует с подавлением работы ФСII.

Таким образом, снижение транспирации и усиление подавления активности ФСII при ВП можно рассматривать как один из механизмов повышения устойчивости фотосинтетического аппарата и организма в целом к действию высоких температур, что, в частности, проявляется в увеличении устойчивости ростовых процессов к прогреву у проростков гороха.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00972 мол\_а



## Физиолого-биохимическая оценка устойчивости форм рода *CERASUS MILL.* к *COCCOMICES HIEMALIS HIGG.*

Physiological and biochemical evaluation of resistance of forms *CERASUS MILL.* by *COCCOMYCES HIEMALIS HIGG.*

Шестакова В.В., Кузнецова А.П.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства», Краснодар, Россия

*shestakova-vv@mail.ru*

Устойчивость растений – генетически обусловленный признак, наследуемый и изменяемый как в течение онтогенеза, так и под воздействием условий окружающей среды. При этом особое внимание в изучении устойчивости следует уделять активному иммунитету, к которому относятся физиолого-биохимические реакции клеток и тканей растения в ответ на внедрение патогена.

Целью нашей работы была физиолого-биохимическая оценка устойчивости представителей рода *Cerasus Mill.* к коккомикозу, различающихся по степени и типам поражения болезнью (не поражаемые грибом, в том числе с моногенным типом устойчивости – реакцией сверхчувствительности; средне поражаемые – с полигенным типом устойчивости; поражаемые). Исследования, направленные на изучение физиолого-биохимических механизмов устойчивости форм рода *Cerasus Mill.*, проводились в разные периоды развития инфекции в 2012-2015 гг. Определялось содержание фенольных соединений (хлорогеновой и кофейной кислот), свободных форм катионов калия, натрия, магния, кальция, органических соединений (янтарной, яблочной, лимонной кислот), лигнина, пигментов (хлорофилла а и b) и белка, которым отводится важная роль в иммунитете растений против патогенов.

Выявлено повышенное содержание пигментов в 1,3 раза и белка в 1,2 раза до проявления болезни (в мае) на листьях не поражаемых коккомикозом форм, относительно неустойчивых. Отмечено, что у форм с полигенным типом устойчивости количество белка выше: до проявления болезни в 1,4 раза и в период эпифитотийного развития инфекции в 2,8 раза относительно сильно поражаемых.

Установлено, что количество лигнина в 4,4 раза и хлорогеновой кислоты (предшественника лигнина) в 7 раз больше у форм с моногенным типом устойчивости (с реакцией сверхчувствительности), чем у сильно поражаемых в период максимального развития коккомикоза.

Выявлено, что физиолого-биохимические признаки, включаемые в комплекс оценки устойчивости форм рода *Cerasus Mill.* к коккомикозу, зависят от условий года. Необходимой в этих условиях минимизации изменчивости, связанной с различиями условий года, можно достичь за счет построения специальных линейных комбинаций комплекса признаков – дискриминантных функций. Их значения служат оценкой устойчивости изучаемых сортов и гибридов к коккомикозу.

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

В результате изучения годовой и сезонной динамики содержания химических веществ выявлены закономерности изменения следующих показателей: свободных форм катионов калия и магния, кофейной, янтарной кислот. У не поражаемых коккомикозом форм концентрация данных веществ в листовом экстракте выше до поражения и уменьшается в период эпифитотийного развития инфекции, а у восприимчивых и с полигенным типом устойчивости отмечено повышение концентрации по мере развития инфекции. Установлено, что скорость накопления исследуемых веществ в листьях у форм с полигенным типом устойчивости идет интенсивнее.

Предложен генетико-статистический подход для разделения форм рода *Cerasus Mill.* по типам устойчивости к коккомикозу на основе биохимических показателей: непоражаемые, с полигенным типом устойчивости, поражаемые. Установлен оптимальный срок для выделения форм с полигенным типом устойчивости по биохимическим показателям – период максимального проявления инфекции.

Произведено разделение форм рода *Cerasus Mill.* по степени и типам устойчивости к коккомикозу на основе биохимических показателей, определенных с помощью автоматизированных систем капиллярного электрофореза и современных генетико-статистических методов.

Полученные данные свидетельствуют о значительной роли изучаемых химических веществ в устойчивости растений рода *Cerasus Mill.* к коккомикозу. Использование генетико-статистических методов на основе биохимических показателей позволяет разделять формы рода *Cerasus Mill.* по степени устойчивости к патогену.

# Влияние скорости снижения температуры на реакцию растений *Cucumis sativus* L. на кратковременные ежедневные низкотемпературные воздействия

The effect of cooling rate on cucumber plant response to a daily short-term temperature drop

Шибаетова Т.Г., Шерудило Е.Г., Титов А.Ф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Пушкинская, 11, Петрозаводск, Россия  
+7 8142 769810, shibaeva@krc.karelia.ru

Ежедневные непродолжительные понижения температуры (обычно в конце ночи или рано утром) (ДРОП, от англ. *drop* – падение) широко используются в практике тепличного растениеводства для получения компактной и более устойчивой рассады овощных культур, клумбовых и цветочных растений без применения химических ретардантов. Современные системы управления климатом в теплице позволяют не только устанавливать необходимую для растений температуру, но и регулировать скорость ее изменения. Однако, мгновенно понизить температуру на 5-10°C в большом объеме теплицы невозможно. В природе в период активной вегетации растений скорость снижения температуры, как правило, не превышает 4°C/ч. Тем не менее, в лабораторных экспериментах при изучении тех или иных эффектов температуры на растения довольно часто практикуется резкая смена температуры, которая достигается путем перестановки растений из одних температурных условий в другие. Между тем известно, что реакция растений на охлаждение зависит помимо прочего и от скорости снижения температуры, хотя пока этому параметру температурного воздействия на растения в исследованиях не уделяется должного внимания. В связи с этим задача данной работы заключалась в изучении влияния скорости снижения температуры на реакцию растений на ДРОП.

С этой целью растения огурца (*Cucumis sativus* L., Кураж F1) выращивали в климатической камере при температуре воздуха 25/20°C (день/ночь), ФАР 250 мкмоль/(м<sup>2</sup>с), фотопериоде 16 ч, влажности воздуха 70%. Ежедневные кратковременные (2 ч) понижения температуры (ДРОП) до 9°C в конце ночного (темновой ДРОП) или в начале дневного (световой ДРОП) периода проводили в течение 14 суток. Температуру снижали и повышали или постепенно, со скоростью 0,4°C/мин, или резко (11°C/мин), путем перестановки растений из одной климатической камеры в другую.

Полученные результаты показали, что скорость изменения температуры во время ДРОП-воздействий оказывает существенное влияние на состояние фотосинтетического аппарата и накопление биомассы растений. При этом резкие изменения температуры во время ДРОП-обработок оказали на растения более сильное влияние. Различия в реакции растений на ДРОП, связанные со скоростью изменения температуры, были более выраженными в случае, когда ДРОП-обработкам растения подвергались на свету. Так, если у растений,

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

подвергавшихся темновому ДРОП с постепенным или резким изменением температуры, биомасса была ниже, чем у контрольных растений, соответственно, на 15 и 17%, то при действии ДРОП на свету – на 32 и 41%. Содержание хлорофиллов снижалось в варианте темнового ДРОП на 5 и 13%, а при световом ДРОП на 10 и 30% при постепенном и резком изменении температуры, соответственно. Содержание каротиноидов уменьшалось на 3 и 10% при темновом ДРОП и на 17 и 38% при световом ДРОП, соответственно. Величина максимального квантового выхода фотохимической активности ФСII ( $F_v/F_m$ ) снижалась от 0.820 (в контроле) до 0.810 и 0.802 при темновом ДРОП и до 0.809 и 0.797 при световом ДРОП при постепенном и резком изменении температуры, соответственно. Вместе с тем, скорость изменения температуры не сказывалась на таких показателях как высота растений, скорость появления и площадь листьев, их холодоустойчивость.

Таким образом, резкое (11°C/мин) снижение температуры (от 20°C до 9°C) при кратковременных (2 ч) низкотемпературных воздействиях оказывает более выраженное негативное воздействие на состояние фотосинтетического аппарата растений и накопление биомассы по сравнению с постепенным изменением температуры. В то же время линейный рост и развитие растений, а также холодоустойчивость листьев изменялись под влиянием ДРОП независимо от скорости снижения температуры.

Считается, что скорость изменения температуры играет более важную роль при кратковременных температурных воздействиях, чем при продолжительных экспозициях. В литературе имеются данные о том, что в восприятии растением скорости охлаждения ведущую роль играют холодочувствительные кальциевые каналы и высказано мнение, что именно они являются первичными сенсорами низкой температуры. Результаты нашей работы, хотя и не позволяют говорить о механизмах восприятия растением скорости снижения температуры, но подтверждают, что растения способны «измерять» скорость падения температуры и реагировать на это вполне определенным образом.

## Заочное участие

Роль протеомных перестроек в реализации защитного действия 24-эпибрасинолида на растения пшеницы в условиях засухи

Role of proteomic changes in the protective action of 24-epibrassinolide on wheat plants under drought stress

Авальбаев А.М.<sup>1</sup>, Юлдашев Р.А.<sup>1</sup>, Федорова К.А.<sup>1</sup>, Гильманова Р.И.<sup>2</sup>, Федина Е.О.<sup>2</sup>, Петрова Н.В.<sup>2</sup>, Аллагулова Ч.Р.<sup>1</sup>, Каримова Ф.Г.<sup>2</sup>, Шакирова Ф.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, 450054, пр. Октября, 71, Уфа, Республика Башкортостан, Россия  
+7 347 235-60-88, [avalbaev@yahoo.com](mailto:avalbaev@yahoo.com)

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, 420111, ул. Лобачевского, 2/31, Казань, Республика Татарстан, Россия  
+7 843 292-73-47, [karimova@kibb.knc.ru](mailto:karimova@kibb.knc.ru)

Ранее нами было обнаружено, что предобработка 24-эпибрасинолидом (ЭБ) способствует уменьшению уровня повреждающего действия засухи на рост растений пшеницы, что может быть обусловлено изменениями в протеоме. С целью выявления их значения в проявлении защитного действия ЭБ, мы провели анализ влияния предобработки ЭБ на распределение пула растворимых белков побегов 5-суточных проростков пшеницы восприимчивого к засухе сорта Салават Юлаев (СЮ) в условиях засухи, вызванной 5%-ным маннитом. Так, воздействие маннита приводит к значительным количественным и качественным изменениям в белковом спектре растений пшеницы сорта СЮ. У подвергнутых засухе проростков выявлено уменьшение содержания большинства полипептидов, в частности, идентифицированных нами белков фотосинтеза (малая и большая субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы (РБФК), РБФК-связывающий белок, фруктовая бисфосфат альдолаза), регуляции роста и развития растений (актин,  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулин), белков энергетического обмена (глутамин синтаза, альдегид редуктаза). Вместе с тем, наблюдается также и исчезновение ряда полипептидов. Поскольку предобработка ЭБ оказывает протекторный эффект на рост растений пшеницы в условиях засухи, можно было ожидать активацию ЭБ адаптационного потенциала протеома к возможным неблагоприятным воздействиям. В пользу этого свидетельствуют данные об увеличении в растениях в ответ на обработку ЭБ содержания таких защитных белков как хлоропластный пероксиредоксин, L-аскорбат пероксидаза, глутатион-S-трансфераза, тогда как в условиях засухи в предобработанных ЭБ проростках пшеницы уровень накопления этих белков в сравнении с необработанными гормоном растениями существенно снижен, что указывает на уменьшение

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

стрессовой нагрузки на предобработанные ЭБ проростки. На это также указывают данные о предотвращении гормоном стресс-индуцированного снижения белков фотосинтеза, роста, развития и энергетического обмена растений. Вместе с тем, привлекает внимание ЭБ увеличение содержания под влиянием ЭБ таких белков как хлоропластный шаперонин с М.м. 20 кДа, участвующий в фолдинге хлоропластных белков и их защите при действии негативных факторов, а также полипептида PINB-2v2-2 из семейства PINB (пуриноидины В) белков, способные к выполнению защитных функций. В то же время, у предобработанных гормоном проростков в ходе воздействия маннита наблюдается дополнительная аккумуляция данных белков, что, по-видимому, обеспечивает дополнительную защиту структурам клеток, в частности белкам, от негативного воздействия засухи. Полученные результаты иллюстрируют эффективность предобработки ЭБ в снижении уровня негативного действия засухи на проростки и вклад идентифицированных белков в проявление антистрессовой активности ЭБ на растения пшеницы. Таким образом, ЭБ играет важную роль в регуляции активации белкового метаболизма, лежащего в основе формирования его преадаптирующего и защитного эффектов на проростки пшеницы, что в целом отражается в предотвращении резких стресс-индуцированных перестроек в протеоме ЭБ-предобработанных растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-04-00731\_a).

## Эволюционные предшественники светособирающих белков растений, стрессовые, HliA/HliB белки цианобактерий: ассоциация с фотосистемами

High light-inducing HliA/HliB stress proteins of cyanobacteria – the evolutionary ancestor of plant light-harvesting proteins: association with photosystem

Акуликина Д.В., Юрина Н.П.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Институт биохимии им.

А.Н. Баха Российской академии наук, Ленинский проспект, д. 33, с. 2, 119071 Москва, Россия

+7 916 958-32-25, +7 495 954-27-32, [nyurina@inbi.ras.ru](mailto:nyurina@inbi.ras.ru)

При высокой интенсивности света нефотохимическое тушение избыточно поглощенной энергии защищает фотосинтетический аппарат растений и цианобактерий от деструкции. Важную роль в защите фотосинтетического аппарата цианобактерий от деструкции играют светоиндуцируемые стрессовые белки Hlip (high-light inducible proteins) или SCPs (small chlorophyll a/b Cab-like proteins). Эти белки, необходимые для выживания организмов в условиях высокой интенсивности света, обнаруживают сходство с хлорофилл a/b-связывающими белками светособирающих комплексов (Cab) растений и, по-видимому, являются их эволюционными предшественниками. У цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803 идентифицировано пять белков Hli, четыре из которых представляют собой низкомолекулярные белки HliA/HliB, HliC/HliD; пятый белок является C-концевым фрагментом феррохелатазы. Гены, кодирующие HliA–HliD, индуцируются различными стрессовыми условиями, включающими не только свет высокой интенсивности, но и низкую температуру, а также голодание по источникам азота и серы, что затрудняет выяснение механизма индукции синтеза этих белков. Особый интерес представляют два белка этого семейства – HliA и HliB, т.к. именно они являются критичными для выживания клеток *Synechocystis* в условиях светового стресса. Данные о связывании этих важных белков с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран цианобактерий разноречивы. Большинство статей, посвященных изучению локализации белков Hli в хлорофилл-белковых комплексах, связано с исследованием их локализации в ФС2. Противоречивые данные были получены о локализации HliA/HliB в ФС1. Так, было обнаружено, что белки HliA/HliB не связаны с ФС1 *Synechocystis*. С другой стороны, показано, что белки HliA/HliB содержатся в тримерах ФС1 и не обнаруживаются в мономерах ФС1 цианобактерии. Данная работа посвящена изучению ассоциации светоиндуцируемых стрессовых белков HliA и HliB с тримерами и мономерами ФС1 клеток дикого типа *Synechocystis* PCC 6803 и мутанта, лишённого ФС2. Нами установлено, что HliA/HliB белки ассоциированы с тримерами ФС1 из клеток, выращенных при нормальных условиях, и их содержание увеличивается в 1,7 раза в условиях светового стресса. При исследовании мутантов *Synechocystis* без ФС2 нами

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

впервые показано, что в клетках цианобактерий, выращенных в нормальных условиях, белки HliA/HliB ассоциированы с мономерами ФС1 цианобактерии, и их содержание увеличивается в условиях светового стресса. Эти данные согласуются с работой, проведенной на клетках высших растений, в которой было показано, что эволюционный гомолог Hliр – односпиральный белок Ohr *Arabidopsis thaliana* – связан с мономером ФС1. Разноречивость полученных данных может быть обусловлена тем, что время обновления белков ФС1 существенно превышает таковое в ФС2. Из-за этого содержание дополнительных HliA/HliB белков, участвующих в реутилизации хлорофилла и ассоциированных с ФС1, ниже, чем в ФС2. Возможно, их содержание ниже чувствительности методов, используемых в работах. Кроме того, отличия могут быть вызваны различными условиями культивирования клеток. Связь белков Hli с мономерами и тримерами ФС1 не кажется удивительной, т.к. они, по-видимому, могут выполнять функции запасаения и сохранения хлорофилла и являться белками-переносчиками хлорофилла при нарушениях ФС1 и синтезе новообразованных комплексов ФС1, как это предполагается для ФС2. По-видимому, белки Hli участвуют в системе координированной доставки пигментов и вновь синтезированных апобелков при биогенезе фотосинтетических комплексов ФС1 и ФС2, уменьшая риск накопления фототоксичных несвязанных молекул хлорофиллов.



Роль лектина в формировании индуцированной 24-эпибрассинолидом устойчивости проростков к обезвоживанию в контрастных по засухоустойчивости сортах пшеницы

The role of lectin in the development of 24-epibrassinolide-induced resistance of seedlings to dehydration in wheat cultivars contrasting in drought tolerance

Безрукова М.В., Лубянова А.Р., Плотников А.А., Шакирова Ф.М.

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, 450054, пр. Октября, 71, г. Уфа, Россия

+7 347 235-60-88, [lectin@anrb.ru](mailto:lectin@anrb.ru)

Ранее нами было показано, что в индукции экспрессии гена лектина агглютиниона зародыша пшеницы (АЗП) и накоплении этого белка участвует фитогормон 24-эпибрассинолид (ЭБ), в спектре физиологического действия которого выявлен защитный эффект на растения при воздействии разных по природе стрессовых факторов, который проявляется на фоне отсутствия каких либо изменений в концентрации АБК. Нами исследованы контрастные по засухоустойчивости сорта пшеницы *Triticum aestivum* L.: неустойчивый Салават Юлаев (СЮ) и устойчивый Омская-35 (Ом-35) на 3-7-е сутки прорастания в ходе их проращивания в нормальных условиях и при дефиците влаги, моделируемом 5%-ным маннитом.

Определение площади листьев неустойчивого сорта СЮ показало, что они отличались большей площадью, вместе с тем растения этого сорта характеризовались меньшей транспирацией. Предпосевная обработка 0.4 мкМ ЭБ увеличивала площадь листьев, как в норме, так и в стрессовых условиях, наиболее интенсивно у Ом-35, что, по-видимому, способствовало поддержанию транспирации 5-7 суточных проростков на более высоком уровне. Маннит создавал дефицит водонасыщенности в проростках обоих сортов, снижая относительное содержание воды (ОСВ) в побегах на 30% на протяжении всего опыта, а также уменьшая осмотический потенциал корней, наиболее значительно у неустойчивого сорта СЮ. Поскольку для обеспечения водного статуса растений при стрессе важным является поддержание их осмотического потенциала на уровне, способном обеспечивать приток воды из среды в растение, снижение концентрации осморегулирующих веществ в корнях ЭБ-предобработанных растений по сравнению с необработанными, по-видимому, способствовало поддержанию осмотического потенциала обоих сортов на более высоком уровне, что приводило к улучшению их осморегуляции, наиболее заметно у устойчивого сорта Ом-35. ЭБ-предобработанные проростки сорта Ом-35 характеризовались также более высоким уровнем ОСВ и меньшим уровнем выхода электролитов из растительных тканей при воздействии маннита, что свидетельствует о стабилизации клеточных мембран.

Далее был проведен анализ содержания АБК и АЗП в корнях 3-7 дневных необработанных и подвергнутых предпосевному замачиванию семян в растворе ЭБ проростков сортов СЮ и Ом-35. Воздействие маннита в корнях

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

проростков сорта Ом-35 вызвало почти двукратное накопление АБК с максимумом на 5-е сутки относительно контроля, тогда как у сорта СЮ более чем двукратное увеличение уровня АБК было более ранним и продолжительным. Анализ в этих же корнях динамики АЗП выявил накопление и поддержание в них высокого уровня лектина при стрессе, который коррелировал с увеличением концентрации в них АБК, причем в корнях СЮ повышенный уровень АЗП поддерживался в ходе всего опыта. Предобработка проростков ЭБ способствовала независимому от эндогенной АБК уменьшению уровня стресс-индуцированного накопления АЗП в корнях пшеницы. Более того, корни ЭБ-предобработанных растений Ом-35, в отличие от таковых сорта СЮ, характеризовались не столь резкими и долговременными перестройками в состоянии гормональной системы в условиях дефицита влаги, что обусловлено не только уменьшением уровня стресс-индуцированного накопления АБК, но и предотвращением падения содержания цитокининов в ходе всего опыта. Полученные результаты, наряду с поддержанием в проростках деления клеток меристемы корней и других ростовых характеристик растений на уровне близком к контролю, свидетельствуют о вовлечении АЗП в спектр защитного действия ЭБ на растения в условиях водного дефицита на начальном этапе прорастания. Таким образом, предобработанные ЭБ проростки при стрессе характеризовались меньшим уровнем накопления АБК и АЗП, особенно у устойчивого сорта, что наряду с поддержанием в этих проростках водного статуса и ростовых параметров близким к контрольным, указывает на меньшую степень повреждающего действия на них стресса и участие АЗП в развитии ЭБ-индуцированной устойчивости исследованных сортов в ходе прорастания.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00731.

## Электрофоретический анализ активности липоксигеназы митохондрий проростков гороха и сои в условиях кратковременной гипоксии и $\text{CO}_2$ - среды

Бердникова О.С., Ершова А.Н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Воронежский государственный педагогический университет, г. Воронеж

+7 473 253-29-86, [olgaberdn@mail.ru](mailto:olgaberdn@mail.ru)

Растительные липоксигеназы (КФ 1.13.11.12) катализируют реакцию окисления как свободных, так и связанных в фосфолипидах полиненасыщенных высших жирных кислот с образованием гидропероксидных производных, являющихся одной из форм АФК, которые сами в дальнейшем могут окислять различные соединения. Липоксигеназы участвуют в биосинтезе травминовой, жасмоновой кислот, этилена. Фермент обнаружен в цитоплазме, вакуолях, хлоропластах. Для ряда растений показано его присутствие и в митохондриях [Braidot, 2004]. В настоящее время недостаточно исследована роль липоксигеназы в процессах накопления разных типов АФК в клетках растений в условиях гипоксии [Ершова, 2011]. Показано, что в клетках листьев картофеля в условиях дефицита кислорода активность липоксигеназы могла возрастать [Pavelic, 2000]. В связи с этим исследовали изменение липоксигеназной активности, а также проводили электрофоретический анализ белковой фракции митохондрий растений гороха и сои на присутствие липоксигеназной активности, как в условиях аэрации, так и при действии кратковременной гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды.

Для исследования липоксигеназной активности использовали двухнедельные растения гороха сорта «Рамонский 77» и сои «Белгородская 48», обладающие разной степенью устойчивости к дефициту кислорода. Растения выращивали методом гидропоники в условиях 12-часового фотопериода. Надземную часть проростков помещали в темновых условиях в различные газовые среды: воздух (контроль), азот (гипоксия) и  $\text{CO}_2$  (100%) на 3-24 часа. Митохондрии растений выделяли методом дифференциального центрифугирования, чистоту которых оценивали по маркерному ферменту сукцинатдегидрогеназе (СДГ) и содержанию хлорофилла. Было показано, что степень перекрестного загрязнения фракций составила не более 2 %. Электрофорез белков митохондрий проводили методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (1% ПААГ) по Дэвису. Электрофорез проводили в камере для вертикального электрофореза белков при температуре  $0...+4^{\circ}\text{C}$  и силе тока 12 мА в течение 2-3 часов. Для выявления зон локализации молекулярных форм липоксигеназ использовали метод Хейдека [Heydeck, 1985], основанный на образовании йод-крахмального комплекса в присутствии йодистого калия и гидроперекисей линолевой кислоты. Активность липоксигеназы определяли спектрофотометрическим методом, при внесении в качестве субстрата линолевой кислоты и рассчитывали с

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

использованием соответствующего коэффициента экстинкции на мг белка (Ильинская и др., 2000).

В проведенных опытах было показано не только присутствие достаточно значительной активности липоксигеназы в митохондриях растений гороха, сои, но и изменение ее активности в условиях гипоксии. В первые часы действия гипоксии активность фермента в митохондриях клеток значительно возрастала (в 1,5-2 раза), как у неустойчивых проростков гороха, так и у более устойчивых растений сои. К концу опыта (24 ч) активность митохондриальной липоксигеназы падала, но только у проростков гороха. В митохондриях клеток растений сои она снижалась до уровня контрольных растений, а при действии  $\text{CO}_2$ -среды еще превышала его на 20-30%. Впервые обнаружено, что высокие концентрации  $\text{CO}_2$  повышали активность митохондриальной липоксигеназы у всех исследуемых растений в большей степени, чем условия обычной гипоксии.

При электрофоретическом анализе в митохондриях растений гороха и сои обнаружено присутствие одной четко окрашенной полосы липоксигеназной активности. Через 3 часа действия гипоксии, как у проростков гороха, так и проростков сои в митохондриях сохранялось присутствие только одного пятна липоксигеназы. Это свидетельствует о том, что гипоксический стресс повышает активность фермента, но не вызывает появление новых изоформ митохондриальной липоксигеназы у анализируемых растений. Изменение активности митохондриальной липоксигеназы проростков гороха и сои при действии гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды не изменило скорость электрофоретической подвижности фермента. Величина  $R_f$  при всех вариантах опыта митохондриальной липоксигеназы проростков гороха составила 0,72, такая же величина  $R_f$  была характерна и для митохондриальной липоксигеназы проростков сои.

Таким образом, проведенные электрофоретические исследования доказали присутствие липоксигеназной активности в митохондриях проростков гороха и сои, что ранее только предполагалось [Ершова, 2011]. Показано, что при действии гипоксии активность митохондриальной липоксигеназы возрастала, как у неустойчивых растений гороха, так и у более устойчивых проростков сои. Однако не отмечено ни появления новых изоформ фермента, ни изменения его электрофоретической подвижности. Это свидетельствует о том, что при действии гипоксического стресса и высоких концентраций  $\text{CO}_2$  наблюдается изменение активности одной и той же молекулярной формы митохондриальной липоксигеназы, как в клетках проростков гороха, так и сои в условиях кратковременных экспозиций.

# Влияние различных концентраций хлористого натрия на морфометрические параметры проростков у генотипов пшеницы

## Influence of different concentrations of sodium chloride on morphometric parameters of seedlings of wheat genotypes

Гасымова Ф.И., Азизов И.В.

Институт Молекулярной Биологии и Биотехнологии Национальной Академии Наук Азербайджана, пр.Матбуат 2.,AZ1073 Баку, Азербайджан  
*fazilay@yahoo.com, ibrahim.azizov47@gmail.com*

Засоленность почв является одним из факторов оказывающих негативное влияние на рост, развитие и как следствие продуктивность сельскохозяйственных растений. Пшеница, как важнейшая продовольственная культура, также подвержена воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, в том числе и засолению почв. Проводимые в настоящее время многочисленные исследования с целью выявления механизмов воздействия солей на растения, а также адаптивных защитных реакций растительных организмов подтверждают актуальность этой проблемы. Наибольшее воздействие засоленность почв оказывает на семена и проростки. Оценка солеустойчивости растений по прорастанию семян, может быть использована для выявления устойчивых форм на ранних стадиях развития растений. В данной работе представлены некоторые материалы исследований по влиянию различных концентраций солей на рост и развитие проростков твердой и мягкой пшеницы.

В качестве объектов исследований использовали высокоурожайные сорта твердой пшеницы (*Triticum durum Desf.*) Шираслан-23 и Вугар, мягкой пшеницы (*Triticum aestivum L*) Гобустан и Лаягатли. Проростки выращивали рулонным методом в контрольном – вода и опытных солевых растворах содержащих NaCl в концентрациях 100, 150, 200, 250mmol L<sup>-1</sup>. Семена проращивались в рулонах 3 дня в термостате при температуре 22°C, затем продолжали проращивание на свету. При оценке солеустойчивости исследуемых генотипов пшеницы в течении 10-ти дней определяли энергию прорастания, всхожесть семян, длину и массу корней и проростков.

В наших экспериментах опытные образцы характеризовались разной всхожестью семян, в зависимости от степени засоления. Исследования влияния засоленности на энергию прорастания семян опытных образцов пшеницы выявили некоторые особенности. Так, у сорта Гобустан энергия прорастания в контроле и в опытных вариантах составляли соответственно 80, 90, 80, 80, 90%, у сорта Лаягатли - 80, 80, 77,70, 80%, у сорта Шираслан – 90, 70, 80, 70, 50% . У сорта Вугар эти показатели соответствовали 75, 70, 50, 50, 50%. Как видно сорта мягкой пшеницы Гобустан и Лаягатли по показателю энергии прорастания семян отличались большей устойчивостью к используемым концентрациям солей.

Изучение влияния засоления на изменчивость параметров корневой системы и побегов показало, что у всех сортов наблюдалось уменьшение этих параметров. Так, у сорта Гобустан по сравнению с контрольным вариантом

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

длина корней при засолённости 100, 150, 200. 250 mmol L<sup>-1</sup> составляла соответственно 54, 42, 34, 22%. При этих же концентрациях солей длина проростков составляла 97, 69, 39, 28%. У сорта Лаягатли изменения длины корней соответствовали 44, 32, 24, 18%, проростков - 79, 57, 46, 12%.

У твердой пшеницы Шираслан длина первичных корней в различных концентрациях засолёния составляла 47, 37, 27, 26%. Длина проростков соответствовала 77, 48, 20, 11%. У твердой пшеницы Вугар – длина корней соответствовала 48, 46, 32, 19% и проростков 78, 52, 15, 15%.

Таким образом, полученные данные показали, что по исследуемым параметрам сорта Гобустан и Лаягатли характеризуются относительной устойчивостью к засолению.

## Динамика метаболической активности митохондрий после совместного действия обезвоживания и пониженной температуры на проростки гороха

Changes of mitochondrial metabolic activity after combined effect of dehydration and the lowered temperature on pea sprouts

Генерозова И.П., Буцанец П.А., Шугаев А.Г.

Институт Физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, г. Москва, Ботаническая 35

+7 495 231-83-40, [igenerozova@mail.ru](mailto:igenerozova@mail.ru)

Исследованию феномена реабилитации растений после действия стрессов уделяется мало внимания, хотя немногочисленные публикации (например, Oono et al, 2003) показали, что после воздействия обезвоживания на растения восстановление вызывало индукцию целого ряда белков, как функциональных, так и регулирующих передачу сигнала и экспрессию генов. Перепрограммирование экспрессии генов могло кардинально изменить картину клеточного метаболизма. В результате восстановление метаболизма происходило в условиях изменившегося гомеостаза растений.

Исследовали изменения метаболической активности митохондрий, выделенных из проростков гороха (*Pisum sativum* L.), переживших раздельное и совместное действие обезвоживания и пониженной температуры, а также реабилитацию в нормальных условиях. Проростки выращивали 2 суток при температуре 24°C в темноте и затем переносили на температуру 15°C, а также помещали на сухую фильтровальную бумагу при температуре 24°C или 15°C на 1 сутки. Митохондрии выделяли из эпикотилей сразу после неблагоприятных воздействий и после 2-3-х суток восстановления проростков в контрольных условиях. Было показано, что НФ, на фоне торможения роста и увеличения водного дефицита, вызывали торможение скорости окисления митохондриями дыхательных субстратов (малата и сукцината) в состоянии 3, т.е. в присутствии АДФ, а также снижение величины дыхательного контроля по Чансу (ДК). При этом снижалась активность цитохромного пути дыхания (ЦП), тогда как активность альтернативного пути дыхания (АП), катализируемого альтернативной оксидазой, и остаточного дыхания (ОСТ) возрастала. Самый сильный эффект на дыхание митохондрий оказывало обезвоживание проростков. Двухдневное выдерживание стрессированных проростков в контрольных условиях первоначально способствовало восстановлению соотношения путей окисления субстратов, преимущественно за счет снижения мощности АП, а также скорости ОСТ. Однако скорость окисления субстратов и активность ЦП оставались низкими. В дальнейшем обнаружены существенные различия при действии НФ на скорость окисления малата и сукцината, донирующих восстановительные эквиваленты в разные участки ЭТЦ. При этом восстановление метаболической активности митохондрий протекало по-разному после разных воздействий. Так, только после совместного действия НФ окисление сукцината, катализируемое сукцинатдегидрогеназой (СДГ) или комплексом II ЭТЦ, существенно

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

ингибировалось сразу после действия НФ, но затем практически полностью восстанавливалось, параллельно с активацией ЦП, в контрольных условиях. В то же время, восстановление окисления НАД-зависимого субстрата (малата), катализируемого комплексом I ЭТЦ, после совместного действия НФ требовало более длительного выдерживания проростков в контрольных условиях. После отдельных воздействий НФ скорость окисления сукцината не обнаруживала стабильного роста и снижалась на 6 день, а после засухи скорость окисления малата становилась приоритетной. Впервые показано, что после прекращения действия холода и холода-обезвоживания в тканях проростков начинал развиваться окислительный стресс, который практически отсутствовал в период непосредственного воздействия НФ, о чем свидетельствовало увеличение в ткани проростков уровня МДА. При этом уровень окислительного стресса был наименьшим после совместного действия НФ. Также в этих условиях активировался рост проростков. Сделан вывод, что функционирование митохондрий чутко реагирует даже на незначительные изменения окружающей среды. При этом возвращение проростков гороха к нормальным условиям выращивания сопровождалось восстановлением метаболической активности митохондрий, причем первоначально происходило восстановление качественной составляющей дыхания, за счет инактивации альтернативных путей окисления (АП и ОСТ). Впервые показано, что наиболее быстрая реактивация митохондрий, а также наименьший уровень окислительного стресса наблюдались после совместного действия на проростки гороха обезвоживания и умеренного охлаждения. Таким образом, видно, что умеренный холод и обезвоживание могут влиять на митохондриальный метаболизм по-разному, когда прилагаются отдельно. Но при их совместном применении наблюдался рост активности окисления малата и сукцината в условиях восстановления с хорошими показателями дыхательного контроля, что свидетельствовало о восстановлении работы I и II комплексов дыхательной цепи. Одним из объяснений положительного влияния комбинированного стрессора на метаболизм проростков может быть следующий факт: ряд авторов (Rizhsky et al, 2002, 2004) показали, что совместно действующий стрессор вызывает коактивацию сегментов программ, действующих в условиях отдельных стрессоров, а также индукцию целого ряда специфических белков, действующих в условиях комбинированного стрессора. Такая дополнительная активация целого ряда белков может существенно повлиять на метаболизм проростков и создавать преимущество у растений, подвергнутых совместному действию неблагоприятных факторов.



## Регуляторная роль апопластной инвертазы в формировании устойчивости растений картофеля к гипотермии

Regulatory role of apoplastic invertase in resistance of potato plants to hypothermia

Дерябин А.Н., Трунова Т.И.

Федеральное государственное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Ботаническая ул., 35, Москва, 126276, Россия

+7 499 231-83-26, +7 495 977-80-18, [trunova@appras.ru](mailto:trunova@appras.ru)

Известно, что растворимые сахара являются не только криопротекторами и осморегуляторами, но также основными пластическими и энергетическими субстратами, необходимыми для реорганизации и формирования устойчивой к гипотермии структуры клеток. Согласно современным представлениям, концентрация сахаров в клетках растений является одним из факторов, влияющих на экспрессию генома. Избыток сахаров, равно как и их недостаток может усилить или подавить экспрессию стресс-зависимых генов. Поступающие в цитозоль с помощью STPs (сахар-переносящих белков) из внеклеточного пространства (апопласта) гексозы также участвуют в передаче внешних сигналов, регулируя экспрессию генов, контролирующую многие морфофизиологические процессы. Участие сахаров в сигналинге проявляется как на уровне клетки – при взаимоотношении между компартаментами, так и на уровне целого организма – между фотосинтезирующими (донор) и запасующими (акцептор) органами. Анализ литературы свидетельствует о важной роли сахарозы и продуктов её гидролиза в регуляции экспрессии генов, ответственных за рост, развитие и устойчивость растений к гипотермии.

В связи с этим были изучены физиолого-биохимические механизмы формирования повышенной холодоустойчивости у растений картофеля (*Solanum tuberosum* L., cv. Desiree), трансформированных целевым геном *SUC2*, кодирующим внеклеточную инвертазу дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* апопластной локализации.

Обнаруженное в период гипотермии в листьях трансформированных растений существенное повышение активности апопластной инвертазы, расщепляющей сахарозу на моносахара, инициирующей изменения в углеводном метаболизме клеток и апопластическом пространстве, может свидетельствовать о регуляторной функции этого фермента при адаптации растений к низкой температуре. Показана прямая зависимость формирования холодоустойчивости от активности апопластной инвертазы. Повышенная активность апопластной инвертазы приводила к увеличению содержания суммы сахаров в апопласте. Транспортируемые в клетку гексозы служили субстратом для синтеза сахарозы и тем самым способствовали увеличению суммы сахаров в ней, что повышало их холодоустойчивость и предотвращало внутриклеточную нуклеацию льда. Апопластная инвертаза в межклеточном пространстве усиливала гидролиз сахарозы и тормозила отток ассимилятов из

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

листьев в корнях, что также способствовало повышению их количества в надземной части растений. Этот процесс соответствует общей стратегии адаптации холодостойких растений: обеспечить большую холодостойкость надземной части в условиях краткосрочных заморозков.

Таким образом, увеличение активности апопластной инвертазы в листьях в условиях гипотермии следует рассматривать как часть катаболического процесса, являющегося одним из составляющих стрессовой реакции растений, а сам фермент как стресс-индуцируемый фермент углеводного метаболизма, выполняющий важную регуляторную функцию в модификации внутриклеточного состава сахаров.

## Активность сукцинатдегидрогеназы и накопление пероксида водорода в митохондриях растений при действии кратковременной гипоксии и CO<sub>2</sub>-среды

Ершова А.Н., Бердникова О.С.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Воронежский государственный педагогический университет, г. Воронеж

+7 473 253-29-86, [aershova@vspu.ac.ru](mailto:aershova@vspu.ac.ru)

Янтарной кислоте придается большое значение не только как одному из возможных интермедиатов цикла трикарбоновых кислот. Предполагается (Кондрашова, 1973), что повышение в клетках содержания янтарной кислоты при гипоксии имеет и важное функциональное значение, так как она может затем использоваться на репарацию повреждений в пост-аэробный период. Накопление органических кислоты (сукцината) при гипоксии является следствием торможения активности дегидрогеназ, в первую очередь сукцинатдегидрогеназы. В тоже время гипоксия может вызывать увеличение продукции пероксида водорода. Было обнаружено, что внесение сукцината усиливало процессы перекисного окисления липидов и накопление гидропероксидов в митохондриях (Yoichi Eto, 1992). Однако остается неясным вопрос взаимосвязи изменения активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и накопление пероксида водорода в митохондриях разных по устойчивости растений. Исследовали влияния гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на активность сукцинатдегидрогеназы и накопление одной из форм АФК – пероксида водорода у различных по устойчивости растений.

Объектом исследования служили 10-14 дневные проростки гороха и кукурузы, выращенные на свету методом гидропоники. Надземная часть проростков помещалась в затемненные вакуум-эксикаторы, через которые пропускали воздух, азот и CO<sub>2</sub> (из баллонов) на 3-24 часа. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования. Чистота фракций составляла 85-90%, которую определяли по хлорофиллу. Активность сукцинатдегидрогеназы определяли в реакции ферментативного окисления сукцината (Соорер, 1969), содержание пероксида водорода – энзиматическим методом с использованием пероксидазы и о-дианизидина (Васильева, 2007). Количество пероксида водорода и активно СДГ рассчитывали с использованием соответствующих коэффициентов экстинкции и рассчитывали на мг белка, который определяли методом Лоури.

Было показано, что активность СДГ митохондрией проростков гороха начинала снижаться уже с первых часов действия гипоксии и к концу опыта уменьшалась почти в два раза по отношению к аэрируемым растениям. У среднеустойчивых проростков кукурузы активность фермента в первые 3 часа действия гипоксии оставалась на уровне контрольных растений, а затем начинала резко падать (до 47%). В условиях CO<sub>2</sub> – среды активность митохондриальной СДГ изменялась более значительно и это наблюдалось как

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

у менее устойчивых растений гороха, так и у более устойчивых проростков кукурузы. Подученные данные совпадают с ранее проведенными исследованиями, в которых при введении в растения  $C^{14}$ -сукцината скорость поступления метки в малат и фумарат значительно падала, как в условиях гипоксии, так и  $CO_2$  – среды (Ершова, 2007). Это свидетельствовало о торможении активности СДГ и повышении содержания в клетках янтарной кислоты.

В связи с тем, что ранее было обнаружено активирующее влияние сукцината на процессы свободнорадикального окисления митохондрий, в дальнейшем мы проанализировали изменение содержания пероксида водорода в митохондриях проростков гороха и кукуруза в условиях разных газовых сред при тех же экспозициях. Было показано, что в митохондриях растений гороха накопление пероксида водорода отмечалось уже в первые 3 часа действия гипоксии и достигало 134 %. К концу опыта содержание пероксида водорода в митохондриях растений оставалось столь же высоким. При действии  $CO_2$  – среды увеличение содержания пероксида водорода происходило через 6 часов опыта почти вдвое и далее не снижалось. В митохондриях среднеустойчивых растений кукурузы содержание пероксида водорода было более низким, и наблюдали небольшое увеличение его содержания. Затем его содержание резко падало и становилось более чем в 2 раза ниже по отношению к митохондриям аэрируемых растений.

Проведенные исследования впервые показали возможность накопления значительного количества пероксида водорода в митохондриях растений в условиях кратковременной гипоксии. При этом уровень накопления пероксида в митохондриях зависел как от сроков действия, так и от степени устойчивости растений к дефициту кислорода. Одновременно отмечалось и более значительное падение активности митохондриальной СДГ в условиях гипоксического стресса у менее устойчивых растений гороха, чем у среднеустойчивых растений кукурузы, что способствовало повышению уровня янтарной кислоты в митохондриях. Полученные данные подтверждают, что накопление сукцината в митохондриях растений в условиях дефицита кислорода сопровождается усилением процессов перекисидации липидов и накоплением пероксида водорода. Отмечено, что действие  $CO_2$  – среды на растения было на отдельных этапах более эффективным, чем условия обычной гипоксии в отношении как образования АФК в митохондриях этих растений, так и активности СДГ.

## Жирнокислотный состав липидов вегетативных органов *Chenopodium album* L. в условиях гиперосмотического солевого шока

Fatty acid composition of lipids of halophilic plant *Chenopodium album* L. vegetative organs under hyperosmotic salt shock

Иванова Т.В., Кузнецова Э.И., Мясоедов Н.А., Цыдендамбаев В.Д.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук. 127276, Москва, Ботаническая ул., д.35

+7 499 231-83-51, +7 499 977-80-18, [itv\\_2006@mail.ru](mailto:itv_2006@mail.ru)

Важную роль в адаптации растений к повышенному содержанию солей в среде выращивания играет качественный и количественный состав жирных кислот (ЖК) мембранных липидов. Цель настоящей работы состояла в исследовании качественного и количественного состава ЖК липидов надземных частей и корневой солеустойчивого гликофита мари белой (*Chenopodium album* L.) под действием гиперосмотического шока. Растения выращивали в факторостатной камере в условиях водной культуры и на 41 сутки внезапно увеличивали концентрацию NaCl в питательной среде с 3 до 150 мМ. Растительный материал отбирали через 0, 3, 6, 24, 48 и 72 ч после шокового воздействия, фиксировали кипящим изопропанолом, экстрагировали суммарные липиды по методу Жукова и Верещагина, идентификацию и определение количественного содержания метиловых эфиров ЖК (МЭЖК) выполняли с помощью ГЖХ-МС на приборе Agilent 7890A GC (США).

У гликофита *Ch. album* в надземных органах гиперосмотической солевой шок вызывал увеличение абсолютного содержания липидов в расчете на сырую и на сухую массу спустя 3 часа после воздействия (с 116.9 до 145.0 и с 15,48 до 18,88 мкмоль связанных ЖК/г соответственно). Через 6 часов после шока количество липидов возвращалось к уровню контроля, и достигало максимума (167,64 и 21,44 мкмоль связанных ЖК/г соответственно) через 1 сутки после солевого шока. Между 2 и 7 сутками после шока в листьях происходило восстановление содержания липидов до уровня, наблюдавшегося спустя 3 ч после воздействия. В липидах надземных органов *Ch. album* идентифицировано 18 индивидуальных видов C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub> ЖК, главными из которых были пальмитиновая (C<sub>16:0</sub>), линолевая (C<sub>18:2</sub>), α-линоленовая (C<sub>18:3</sub>) кислоты. Через 3 часа после шока происходило незначительное увеличение доли C<sub>18:3</sub> (до 58,1% с 55,2%) за счет снижения уровня C<sub>16:0</sub> и C<sub>18:2</sub>, что сопровождалось понижением индекса ненасыщенности (ИН) ЖК мембранных липидов. Через 6 часов после шока доля C<sub>18:3</sub> достигала контрольного значения, а в дальнейшем происходило повышение её уровня до показателя равное 3 часам шока, которое уже не изменялось весь эксперимент. Доля C<sub>18:2</sub> через 3 часа после шока уменьшалась с 17,3% до 14,8%, через 6 часов шока возвращалась к уровню контроля, а после 1 суток и до окончания эксперимента оставалась на уровне 3 часов после воздействия.

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

В корнях *Ch.album* абсолютное содержание липидов по сравнению с контролем увеличивалось через 3 часа в расчете на сырую и сухую массу (до 64,55 и 5,7 с 49,71 и 4,35 мкмоль связанных ЖК/г соответственно), достигало максимума через 2 суток шока (66,32 и 6,24 мкмоль связанных ЖК/г соответственно), но в отличие от надземных органов, в которых происходила некоторая стабилизация содержания липидов, которое уже не изменялось до конца эксперимента, в корнях это содержание через 1 неделю после внесения NaCl уменьшалось до 47,33 и 5,22 мкмоль связанных ЖК/г соответственно. Качественный состав ЖК липидов корней *Ch.album* отличался большим разнообразием, чем надземные органы. Было идентифицировано 22 индивидуальных вида насыщенных, моно-, ди- и триненасыщенных C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub> ЖК. Относительное содержание главных кислот C<sub>16:0</sub>, олеиновой, C<sub>18:2</sub>, C<sub>18:3</sub>, как и величина ИН при действии гиперосмотического солевого шока изменялась незначительно. Наибольшее значение ИН липидов корней *Ch.album* наблюдалось через 6 часов после шока (1,401) в результате увеличения доли полиненасыщенных минорных ЖК.

Анализ полученных данных влияния гиперосмотического шока на ЖК состав суммарных липидов солеустойчивого гликофита *Ch.album* показал, что абсолютное содержание липидов стабилизируется через 6 часов и выходят на плато после воздействия раствора 150 мМ NaCl как в корнях, так и в надземной части растения. Данный эффект может быть обусловлен прохождением за это время стрессового сигнала в клетках растений и приспособлением их к изменившимся условиям окружающей среды, что приводит к стабилизации липидного гомеостаза. Однако необходимо иметь в виду, что растение *Ch.album* является солеустойчивым гликофитом, и наблюдаемые нами изменения липидного метаболизма, скорее всего, соответствуют выбранной эволюционной стратегии данной группы растений.

Точки изменения активности аскорбат-глутатионового цикла в процессе прорастания семян и роста проростков озимого ячменя

Points of ascorbat-gluthation cicle activity changes during winter barley seeds germination and seedlings growth

Казакова А.С.

Azov-Black Sea Engineering Institute of Don State Agrarian University,  
Zernograd, Rostov-on-Don Region, Russia

+7 906 452-68-93, [kasakova@inbox.ru](mailto:kasakova@inbox.ru)

При прорастании семян происходит активизация метаболических процессов, что сопровождается образованием активных форм кислорода (АФК), защита от которых осуществляется за счет использования высокоактивной антиоксидантной системы в составе низко- и высокомолекулярных соединений. Важную роль в защите клеток от избыточного накопления и повреждающего действия АФК играют аскорбиновая кислота (АК) и глутатион (GSH), которые функционируют как единый аскорбат-

глутатионовый цикл. Исследования содержания низкомолекулярных антиоксидантов в прорастающих семенах зерновых культур многочисленны, при этом во всех этих исследованиях для анализа отбирали семена не по фазе их развития, а по времени от замачивания. Такой подход даёт усреднённую характеристику изучаемого процесса, так как в анализ попадают семена, находящиеся на разных фазах прорастания, а полученные на основе такого подхода результаты не могут отражать протекание процесса в индивидуальном семени. Нами была разработана шкала микрофенологических фаз прорастания семян (МФФ ПС) ячменя, которая включает 8 микрофенофаз: в том числе МФФ ПС собственно прорастания семени (до его наклёвывания), а также микрофенофазы роста проростков, в том числе три МФФ ПС, предложенные нами впервые (К-1, К-2 и К-3) и описывающие этапы развития и роста зародышевой корневой системы [Kasakova, 2014]. На основе данного подхода к изучению физиологии и биохимии прорастающего семени ярового и озимого ячменя нами были впервые установлены закономерности изменения содержания компонентов системы АК и GSH в условиях оптимального и недостаточного увлажнения. Однако из-за того, что МФФ ПС «корешки 1» (К-1) длится только 2...4 часа, а «росток» (Р) – 6...8 часов, оценка содержания антиоксидантов в эти микрофенофазы проведена не была.

В связи с этим целью данного исследования явилось изучение содержания АК и GSH в семенах озимого ячменя по всем восьми МФФ ПС. Объектом исследования служили выделенные зародыши из сухих и прорастающих семян или проростки озимого ячменя трёх сортов за три года репродукции. Семена проращивали в растильнях на фильтровальной бумаге при +20°С. Содержание АК, GSH определяли методом Петта в модификации Прокошева и выражали в мкг/г на абсолютно сухую массу (АСМ).

Установлено, что изменение содержания АК и GSH в тканях проростка по фазам прорастания семян всех сортов озимого ячменя за все годы репродукции имеет общие закономерности: в целом оно у всех сортов возрастает от сухого семени до появления полноценного проростка, однако кривая при этом приобретает два минимума, так как содержание АК и GSH в интересующие нас микрофенофазы К-1 и Р существенно снижается. Следовательно, когда главный зародышевый корешок прорывает колеоризу, а затем появляются второй и третий корешки (но все они имеют длину до 2-х мм), в тканях проростка происходят существенные изменения активности антиоксидантной системы, что может являться отражением перестройки метаболизма в целом. От момента наклёвывания семени (что принято считать точкой прорастания семени) до микрофенофазы К-1 в среднем по всем изученным сортам содержание АК снижается в два раза (с 10 до 5 мкг/г), а содержание GSH – в 1,2 раза (с 59,3 до 48,6 мкг/г). Затем за короткий промежуток времени от МФФ К-1 до МФФ К-2 (короткие корешки) содержание АК возрастает в три раза (с 5 до 14,8 мкг/г), а содержание GSH – в два раза (с 48,6 до 93,4 мкг/г).

В МФФ ПС «росток», когда при наличии растущих корешков из цветковых чешуй семени появляется колеоптиль длиной менее половины длины семени,

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

происходит вторичное снижение содержания АК и GSH. От предыдущей фазы К-3 (длинные корешки) до микрофенофазы Р в среднем по всем изученным сортам содержание АК снижается в два раза (с 18,5 до 9,4 мкг/г), а содержание GSH – в 1,9 раза (с 138,5 до 72,8 мкг/г). Затем за короткий промежуток времени от МФФ Р до МФФ «проросток» (в формулировке ГОСТ-12038-84) содержание АК возрастает в 3,3 раза (с 9,4 до 31,3 мкг/г), а содержание GSH – в 1,6 раза (с 72,8 до 116,3 мкг/г).

Таким образом, выявленные закономерности изменения количества АК и GSH по микрофенофазам прорастания семян озимого ячменя свидетельствуют о том, что непродолжительные по времени МФФ ПС К-1 и «росток» являются точками изменения активности аскорбат-глутатионового цикла, когда расход АК и GSH сначала превышает их синтез/регенерацию, а затем их содержание быстро восстанавливается. Это может отражать и направленность физиолого-биохимических процессов в период прорастания семени и роста проростков. Очевидно, именно в эти МФФ ПС происходит переключение метаболизма и именно здесь следует искать ключевые лимитирующие факторы ростовых процессов.



## Роль активных форм кислорода и оксида азота в реализации стресс-протекторного действия жасмоновой кислоты на проростки пшеницы

Role of reactive oxygen species and nitric oxide in realization of stress-protective influence of jasmonic acid on wheat plantlets

Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О., Луговая А.А.

Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева. п/о «Коммунист-1», г. Харьков, 62483, Украина

+38 0572 99 73 52, [plant\\_biology@mail.ru](mailto:plant_biology@mail.ru)

Жасмоновая кислота (ЖАК) относится к ключевым фитогормонам, задействованным в реакциях растений на абиотические и биотические стрессоры. Наиболее изученной ее функцией является участие в развитии системной индуцированной устойчивости при поранении растений насекомыми-вредителями и заражении некротрофными патогенами. В последние годы получены и сведения о роли ЖАК в адаптации растений к действию абиотических стрессоров. Так, показано повышение ее содержания у растений при действии гипертермии, засухи, солевого стресса (Ismail et al., 2012; Wasternack, Hause, 2013), а также индуцирование их устойчивости к этим стрессорам действием экзогенной ЖАК (Shana, Liang, 2010).

Реализация физиологических эффектов стрессовых фитогормонов происходит с участием ряда сигнальных посредников, среди которых особая роль принадлежит активным формам кислорода (АФК) и азота. Получены данные, свидетельствующие об участии АФК в процессах индуцирования устойчивости отрезков coleoptилей пшеницы к гипертермии действием ЖАК (Карпец и др., 2014). Известно, что при формировании многих физиологических реакций растений с АФК как сигнальными посредниками функционально взаимодействует оксид азота. Показано повышение содержания оксида азота у растений арабидопсиса в ответ на обработку ЖАК (Huang et al., 2004). Недавно установлено, что сквенджером оксида азота РГЮ подавлялось вызываемое ЖАК повышение эффективности функционирования аскорбат-глутатионового цикла в листьях пшеницы при засухе (Shan et al., 2015).

В целом же данных, свидетельствующих об участии NO в индуцируемом ЖАК развитии устойчивости растений к абиотическим стрессорам, в литературе до сих пор очень мало. Почти не исследовано возможное функциональное взаимодействие NO с АФК и его роль в стресс-протекторном действии ЖАК на растения. В связи с этим целью работы было исследование возможного участия NO и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> как сигнальных посредников в процессе индуцирования теплоустойчивости проростков пшеницы.

Объектом исследования были корни интактных этиолированных проростков пшеницы мягкой озимой (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала. Обработка проростков ЖАК (10 мкМ, 24 ч) вызывала повышение их выживания после повреждающего прогрева в водном ультратермостате (46°C, 10 мин). При этом отмечалось транзиторное повышение содержания оксида азота в корнях

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

проростков с максимумом через 0,5-1 ч после начала обработки ЖАК. Под влиянием ЖАК происходило и кратковременное повышение содержания пероксида водорода в корнях с максимумом через 0,5 ч после начала обработки.

Предобработка проростков скавенжерами пероксида водорода диметилтиочевинной (ДМТМ) и свободнорадикальных АФК ионолом в значительной степени нивелировала увеличение содержания NO в корнях, вызываемое действием ЖАК, что свидетельствует о зависимости образования оксида азота от генерации АФК. Есть основания полагать, что пероксид водорода и оксид азота задействованы в трансдукции в генетический аппарат сигналов ЖАК, индуцирующих развитие теплоустойчивости проростков. Вызываемое действием ЖАК увеличение процента выживания проростков после теплового стресса нивелировалось их предварительной обработкой как антиоксидантами (ДМТМ, ионол), так и скавенжером NO РТЮ и ингибитором NO-синтазы L-NAME.

Таким образом, как АФК, так и оксид азота, являются необходимыми компонентами трансдукции сигнала ЖАК в генетический аппарат, индуцирующего развитие теплоустойчивости проростков. При этом, АФК, по-видимому, расположены в цепи трансдукции сигнала ЖАК выше NO. В экспериментах с использованием колеоптилей пшеницы было показано, что вызываемое экзогенной ЖАК усиление генерации АФК подавлялось ингибиторами НАДФН-оксидазы (Карпец и др., 2014). Возможно, что быстрая активация этого фермента ЖАК и кратковременное увеличение количества АФК (в частности, относительно стабильного пероксида водорода, выполняющего сигнальные функции), прямо или опосредованно активирует более продолжительное увеличение содержания оксида азота в клетках. Следует отметить, что на разных растительных объектах зарегистрировано повышение содержания NO в клетках под действием экзогенного пероксида водорода (Zhang et al., 2007; Xu et al., 2008). Известно, что под его влиянием может активироваться, по крайней мере, один из ферментативных источников NO – нитратредуктаза (Dubovskaya et al., 2011). В то же время в наших экспериментах положительное влияние ЖАК на теплоустойчивость проростков частично нивелировалось их обработкой L-NAME, что указывает на роль в образовании оксида азота фермента, подобного NO-синтазе животных. В целом на основании результатов ингибиторного анализа можно заключить, что АФК и оксид азота находятся в функциональном взаимодействии при индуцировании теплоустойчивости проростков пшеницы экзогенной ЖАК.

Индукция теплоустойчивости растительных клеток и активация антиоксидантных ферментов под действием оксида азота зависят от изменений кальциевого гомеостаза

Induction of heat resistance of plant cells and activation of antioxidant enzymes under influence of nitric oxide depend on changes of calcium homeostasis

Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Швиденко Н.В., Ястреб Т.О.

Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева. п/о «Коммунист-1», г. Харьков, 62483, Украина

+38 0572 99 73 52, [plant\\_biology@mail.ru](mailto:plant_biology@mail.ru)

Оксид азота (NO) задействован в формировании адаптивных реакций растений на действие многих неблагоприятных факторов, в том числе абиотических стрессоров (Mur et al., 2012; Oz et al., 2015). Одной из универсальных протекторных систем растений является антиоксидантная система. Оксид азота оказывает на нее крайне сложное влияние, механизмы которого исследованы далеко не полностью (Vital et al., 2008; Khan et al. 2015). Так, известно, что NO обладает способностью модифицировать многие антиоксидантные ферменты как *in vivo*, так и *in vitro*. Среди них аскорбатпероксидаза (АПО), гваяколпероксидаза (ГПО), различные формы супероксиддисмутазы (СОД), каталаза (КАТ), глутатион-S-трансфераза, глутатионредуктаза (Lozano-Juste et al. 2011; Begara-Morales et al. 2014). При этом тип посттрансляционной модификации белков действием оксида азота может по-разному влиять на их функциональную активность. С другой стороны, известно, что оксид азота способен как прямо, так и опосредованно влиять на состояние кальциевых каналов растительных клеток. В связи с этим многие его физиологические эффекты включают в себя изменения кальциевого гомеостаза растительных клеток. Целью работы было исследование с использованием ингибиторного анализа возможной роли различных пулов кальция в NO-зависимой регуляции активности антиоксидантных ферментов клеток колеоптилей пшеницы и их устойчивости к повреждающему прогреву.

Объектом исследования были отрезки колеоптилей, отделенные от этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала, и инкубируемые на 2% сахарозе с добавлением пенициллина 100 тыс. ед./л. В качестве донора оксида азота использовали нитропруссид натрия (НПН) в концентрациях 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 и 2 мМ. На растворах НПН колеоптили инкубировали в течение 24 ч. В случае предобработки ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом (1 мкМ), хелатором внешнего кальция – ЭГТА (50 мкМ), ингибитором фосфатидилинозитолспецифичной фосфолипазы С неомицином (40 мкМ) или антагонистом синтеза цАДФ-рибозы (ингибитор АДФ-рибозилциклазы) никотинамидом (1 мМ) эти соединения вносили в среду инкубации колеоптилей за 2 ч до добавления в нее НПН. После окончания инкубации колеоптилей на растворах исследованных соединений часть отрезков каждого варианта подвергали потенциально летальному

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

прогреву в водном ультратермостате при температуре  $43 \pm 0,1^\circ\text{C}$  в течение 10 мин.

Обработка колеоптилей НРН в концентрациях 0,1 и 0,2 мМ в наибольшей степени индуцировала их устойчивость к повреждающему прогреву. Под действием НРН в широком диапазоне концентраций происходило усиление генерации колеоптилями супероксидного анион-радикала и транзиторное увеличение содержания пероксида водорода. Однако значительное повышение активности СОД, КАТ и ГПО в колеоптилях наблюдалось под влиянием НРН только в концентрациях 0,1 и 0,2 мМ. Имидазол, ЭГТА, неомицин и никотинамид частично устраняли влияние НРН как на генерацию АФК колеоптилями пшеницы, так и на активность антиоксидантных ферментов.

Ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол, антагонисты кальция ЭГТА, неомицин и никотинамид сами по себе существенно не влияли на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы, однако имидазол и неомицин полностью, а ЭГТА и никотинамид частично нивелировали положительное влияние донора оксида азота на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы. НАДФН-оксидаза, считающаяся одним из основных источников образования сигнальных АФК, является кальцийзависимым ферментом (Wong et al., 2007; Ogasawara et al., 2008). Поскольку в наших экспериментах эффект индуцируемого донором NO образования АФК подавлялся различными антагонистами кальция, можно предположить, что в активации НАДФН-оксидазы принимает участие как кальций, поступающий в цитозоль извне, так и из внутриклеточных компартментов. Кальцийзависимая активация образования АФК, вызываемая донором NO, может быть причиной последующего повышения активности антиоксидантных ферментов в колеоптилях пшеницы. В пользу этого предположения свидетельствует нивелирование активации СОД, КАТ и ГПО действием как ингибитора НАДФН-оксидазы имидазола, так и антагонистами кальция. В то же время не исключено, что кальций при действии донора оксида азота необходим не только для активации НАДФН-оксидазы как источника АФК, но и для трансдукции в генетический аппарат сигналов самих АФК. Несомненно, сигнальная цепь, обеспечивающая индуцирование теплоустойчивости растительных клеток, является многокомпонентной. Оксид азота, кальций и АФК могут присутствовать на различных ее участках. При этом ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , концентрация которых увеличивается при действии NO на состояние кальциевых каналов, могут как индуцировать ферментные системы, генерирующие АФК (прежде всего, НАДФН-оксидазу), так и участвовать в трансдукции АФК- и NO-сигналов в генетический аппарат и формировании физиологических реакций, обуславливающих изменение устойчивости растений к стрессорам.

## Ответная реакция клеточного цикла трансгенных растений *N. tabacum* L., экспрессирующих ген FeSOD1, на холодовое воздействие

Cell cycle response of transgenic plants *N. tabacum* L. expressing FeSOD1 to cold conditions

Кононенко Н.В.<sup>1</sup>, Баранова Е.Н.<sup>1</sup>, Гулевич А.А.<sup>1</sup>, Куренина Л.В.<sup>1</sup>, Смирнова Е.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, 127550, Тимирязевская 42, Москва, Россия  
+7 499 977-16-36, nilava@mail.ru

<sup>2</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова  
kinggobi@yandex.ru

В настоящее время актуальной проблемой физиологии растений является защита растений от абиотического стресса, следствием которого может быть окислительный стресс и гибель растений. Вариантом повышения защиты растений от окислительного стресса является экспрессия генов белков, кодирующих дополнительные компоненты системы антиоксидантной защиты. Среди антиоксидантных ферментов, активно включающихся на первых этапах окислительного стресса, большое значение имеют супероксиддисмутазы (в том числе FeSOD1), катализирующие превращение супероксидных анион-радикалов до молекулярного кислорода и пероксида водорода. Перекись водорода служит сигнальной молекулой, запускающей каскад защитных реакций при различных стрессовых условиях. Для того, чтобы определить, как влияет повышение экспрессии гена FeSOD1 на такие значимые для роста и дифференцировки растений показатели как параметры клеточного цикла и пролиферативная активность клеток, было изучено действие низких положительных температур на параметры клеточного цикла в меристематических клетках корней исходных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L.

Методом цитофотометрического анализа было определено содержание ДНК в меристематических клетках корня исходных и трансгенных по гену Fe-SOD1 растений. У исходных и трансгенных линий табака наибольшее количество клеток находилось в S фазе клеточного цикла. Как у исходных, так и трансгенных растений табака, подвергнутых действию низкой температуры (8°C), большинство клеток находилось в G<sub>2</sub> фазе. При восстановлении температурного режима (22°C) у исходных растений увеличивалось количество клеток в G<sub>2</sub> фазе, а у трансгенных растений происходило незначительно снижение числа клеток в G<sub>2</sub> фазе и увеличивалось число клеток в S фазе, однако, у трансгенных растений в этих условиях число клеток в G<sub>2</sub> фазе было на 14% меньше, чем у исходного сорта. Таким образом, у трансгенных растений по сравнению с исходными растениями, направленный транспорт в хлоропласты табака цитоплазматической Fe-SOD1 не влияет на динамику прохождения клеточного цикла. У тех и других линий, холодной

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

стресс вызывает замедление клеточного цикла в  $G_2$  фазе ( $G_2/M$  arrest), что ведет к снижению пролиферативной активности клеток меристемы и может вести к замедлению роста растений. Эти данные также показывают, что действие холодового стресса на нормальные и трансгенные растения табака носит пролонгированный характер (о чем свидетельствуют данные по пост-температурному режиму) и может приводить к блоку делений и, соответственно, к существенным нарушениям в развитии растений. Известно, что клетки в  $G_2$  фазе являются более чувствительными к стрессу по сравнению с клетками в  $G_1$  фазе. Следовательно, есть основания полагать, что направленный транспорт в хлоропласты цитоплазматической супероксиддисмутазы (Fe-SOD) повышает защиту растений от стресса, вызванного воздействием низкой температуры.

## Абсолютное содержание и состав жирных кислот суммарных липидов листьев и плодов мушмулы германской (*Mespilus germanica L.*)

Absolute content and fatty acid composition of total lipids from leaves and fruits of *Mespilus germanica L.*

Кузнецова Э.И., Иванова Т.В., Цыдендамбаев В.Д.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук. 127276, Москва, Ботаническая ул., д. 35

+7 499 9778355, [vdt@ippras.ru](mailto:vdt@ippras.ru)

Мушмула германская (*Mespilus germanica L.*, сем. Rosaceae) – небольшое листопадное плодое дерево до 6 м высотой, завезённое в Юго-Восточную Европу из Юго-Западной Азии, в настоящее время произрастает на всем Кавказе в дубово-грабовых лесах морского побережья до высот 1800 м над уровнем моря. Растение холодоустойчивое, имеет темно-зелёные листья эллиптической формы 8-14 см длиной и 3-4 см. шириной, краснеющие перед опадением и красновато-коричневые твердые и кислые плоды диаметром 2-3 см, готовые к употреблению только после блитирования. Мушмула германская культивируется уже свыше 3000 лет в прикаспийских областях Северного Ирана. В древнеримскую и средневековую эпохи это растение было важной плодовой культурой до 17-18 веков, однако в настоящее время как съедобный фрукт используется редко. Мушмулу германскую выращивают в садах в декоративных целях благодаря витиевато-изогнутому стволу и «плакучести» ветвей. В Иране фрукты, листья и кора использовались в лекарственных целях для лечения болезней пищеварительной системы.

Данная работа посвящена определению жирнокислотного (ЖК) состава суммарных липидов листьев, мякоти плодов и семян *M. germanica* в зависимости от высоты произрастания. Для анализа брали листья, собранные с растений *M. germanica*, произраставших на Северном Кавказе (Кабардино-Балкария и Ингушетия) на высоте 370 м и плоды, собранные с высот 500, 800 и 1200 м над уровнем моря. Плоды препарировали на 3 фракции – мякоть плода и семена. Собранный материал хранился при  $-18^{\circ}\text{C}$  (листья), а части плодов (мякоть и семена) – в смеси хлороформ : метанол (3 : 2). Для выделения суммарных липидов растительный материал гомогенизировали и липиды экстрагированы в атмосфере аргона по методу Жукова и Верещагина. Состав ЖК нейтральных липидов определяли методом ГЖХ-МС как описано ранее.

В суммарных липидах листьев *M. germanica* идентифицированы 17 индивидуальных видов  $\text{C}_{10}\text{-C}_{24}$  ЖК, главными из которых были пальмитиновая ( $\text{C}_{16:0}$ , 27,2% от суммы ЖК), стеариновая ( $\text{C}_{18:0}$ , 6,1%) олеиновая ( $\Delta^9\text{-C}_{18:1}$ , 5,9%), линолевая ( $\Delta^9,12\text{-C}_{18:2}$ , 14,1%) и  $\alpha$ -линоленовая кислоты ( $\Delta^9,12,15\text{-C}_{18:3}$ , 42,5%) кислоты. Наряду с ними в липидах листьев содержались ряд минорных ЖК. В липидах плодов и семян обнаружены 20 видов  $\text{C}_{10}\text{-C}_{24}$  ЖК, среди которых преобладали  $\text{C}_{16:0}$  (24-35 и 10-12%, соотв.),  $\text{C}_{18:0}$  (12-24 и 3,6-4,2%),  $\Delta^9\text{-C}_{18:1}$  (3-8 и 29-33%) и  $\Delta^9,12\text{-C}_{18:2}$  (30-42 и 48-51%);

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

в липидах мякоти плодов к числу главных ЖК принадлежала также  $\Delta 9,12,15$ - $C_{18:3}$  ЖК (11-15%). По уровню ненасыщенности ЖК липиды листьев значительно превосходили липиды мякоти плодов и семян (ИН = 1,628, 1,170-1,196 и 1,279-1,341, соотв.).

ЖК-состав липидов мякоти плодов, собранных на разных высотах произрастания растений *M. germanica*, различался незначительно. Однако в целом степень ненасыщенности липидов мякоти плодов, собранных с растений на высоте 1200 м над уровнем моря была несколько ниже, чем на высоте 500 м за счёт значительно более низкого относительного содержания в них  $\Delta 9,12$ - $C_{18:2}$  ЖК. Аналогичная тенденция наблюдалась и для липидов семян. По абсолютному содержанию липидов (мкмоль связанных ЖК) в мякоти плода образцы с 500 м над уровнем моря уступали таковым с высоты 1200 м на ~9%, тогда как для липидов семян наблюдалась обратная картина – в образцах с 1200 м содержание липидов было на 62% ниже, чем в семенах с 500 м.

Таким образом, можно заключить, что исследованные части плода на разных высотах произрастания практически не отличаются друг от друга как по качественному, так и по количественному составу ЖК, в то время как различия абсолютного содержания липидов в разных частях плода могут быть весьма значительными.



## Ответная реакция плодовых растений на природные и искусственно созданные стрессы

Feedback of fruit plants to the natural and artificially created stresses

Малина Р.Б., Шишкану Г.В.

Институт генетики, физиологии и защиты растений АН РМ, 2002, ул. Лесная, 20, г. Кишинев, Молдова,

+373 68233770, [malinaraya@mail.ru](mailto:malinaraya@mail.ru)

Функциональное состояние многолетних растений складывается из баланса положительных и отрицательных воздействий в течение вегетационного периода. В отличие от дикорастущих видов, приспособленных к данной местности длительной эволюцией, культурные растения интродуценты сохраняют память о другой природной среде и сочетании факторов. Искусственно составленная комбинация родительских пар, учитывая потребности человека, не всегда соответствует интересам самого растения. Поэтому в Институте генетики, физиологии и защиты растений АН РМ (ИГФЗР) в течение ряда лет исследуется большая коллекция плодовых культур и однолетних сортов в полевых и контролируемых условиях с целью выявить наиболее продуктивные сорта, хорошо адаптированные к местным условиям.

Наши исследования проводились на шести сортах персика, четырех сортах винограда, четырех сортах абрикоса и двух сортах груши. Виноградник и грушевый сад находятся в полевых условиях, а растения персика и абрикоса выращены в лизиметрах ( $1 \times 1 \times 2,5 \text{ м}^2$ ) ИГФЗР АН Молдовы. Режим влажности почвы поддерживался путем регулярного полива, удобрения вносили по общепринятым нормам. Измерения  $\text{CO}_2$  - газообмена и флуоресценции листьев проводили на листьях среднего яруса в течение вегетационного периода. Фотосинтетический и дыхательный газообмен, транспирацию измеряли с помощью прибора PTM-48 (PHOTOSYNTHESIS and TRANSPIRATION MONITOR). Интенсивность дыхания листьев и побегов регистрировали манометрическим способом. Для характеристики состояния ФС II использовали следующие показатели флуоресценции хлорофилла: YELD - реальный квантовый выход флуоресценции, ЭТР - относительная скорость движения электронов по электронно-транспортной цепи. Показания флуоресценции определяли с помощью импульсного модулированного флуориметра PAM-2000 (фирма «Heinz Walz», Effeltrich, Germany). В конце вегетации проводили регистрацию ростовых и продукционных процессов.

За период исследования растения подвергались несколько раз воздействию стрессовых погодных условий, что позволило выявить наиболее сбалансированные генотипы, устойчивые к резким перепадам континентального климата. Растения испытывали почвенно-воздушную засуху и избыточное увлажнение, влияние жары до  $35-40^\circ$  и недостаток, для некоторых культур, суммы положительных температур. Резкие перепады температуры зимой от нуля градусов до  $-22^\circ$  и весенние заморозки ставили на грань выживания южные плодовые культуры. Степень зимних повреждений

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

растений зависит от генотипа и физиологического состояния в период подготовки и вхождения в состояние покоя, что обусловлено сочетанием погодных условий вегетационного периода и активностью физиологических процессов в сентябре-октябре. Резкая смена условий перезимовки в конце февраля позволила выявить реакцию сортов винограда на повреждающий фактор в зависимости от их происхождения. У давно культивируемого сорта Шасла, побеги вызревают и проходят закалку вовремя, поэтому уход от стрессора в глубокий покой стал его защитой. Второй способ - повышенная устойчивость тканей побега (сорт Декабрьский). Третий способ – быстрая регенерация утраченных побегов за счет высокой интенсивности фотосинтеза (ИФ) и обменных процессов – сорт Молдова. Ассимиляция углерода у сорта Молдова составляла 15-16 ммоль  $\text{CO}_2/\text{м}^2\text{с}$ , что на 40-60% больше, чем у других сортов. Вегетация этого сорта продолжается до глубокой осени, рост останавливается только заморозками. Три сорта, используя разные механизмы защиты, восстановили надземную массу и дали урожай. Если негативное влияние превышает порог адаптации сорта, то многолетнее растение сохраняет крону, сбрасывая плоды. В наших опытах это сорт Сурученский белый, у которого цветочные почки были практически утрачены. У персика, абрикоса и винограда отмечены сходные изменения листового аппарата как реакция на воздушную и почвенную засуху: уменьшение размеров листовой пластинки, особенно ее длины (на 10-20%), увеличение удельной поверхностной площади (на 18-23%). За счет этой реакции уменьшается площадь испарения, но сохраняется достаточное количество хлорофилла. В условиях засухи увеличивается интенсивность дыхания, возрастают энергетические затраты организма и активность ФС II по сравнению с состоянием ФА в благоприятные годы. Листья персика более устойчивы к высоким температурам и засухе, чем абрикос и виноград.

Многолетнее растение в течение онтогенеза накапливает информацию о возможных факторах природного влияния, тогда как на воздействие человека не предусмотрено специфической сигнальной системы. Ответное поведение организма на незнакомый фактор выглядит как тотальная мобилизация средств защиты. Такую реакцию наблюдали при чрезмерной обрезке побегов у персика (до 90% годового прироста). При умеренной коррекции формы кроны (удаление 30-40% годового прироста), интенсивность дыхания снижается в конце мая до 10-15 мкл • час/г, переходя в дыхание поддержания. Большая потеря побегов действует как стрессовый фактор, увеличивая интенсивность дыхания до 230-250 мкл • час/г, что свидетельствует о повышенной активности фотосинтетического аппарата. Это вызвало бурный рост кроны и сместило равновесие плод/биомасса в сторону вегетативной массы. Подобную реакцию наблюдали на груше при обработке биологически активными препаратами природного происхождения. Поэтому, прежде чем каким-либо способом помогать растению, необходимо иметь точное представление о функциональном состоянии растительного организма в момент воздействия и тогда экзогенное вмешательство достигнет желаемого результата.

## Протекторное свойство стевиозида при действии тяжелых металлов на митотическую активность корней проростков пшеницы

The protective property of stevioside by the action of heavy metals on the mitotic activity of wheat seedling roots

Михайлов А.Л., Куприянова В.В., Невмержицкая Ю.Ю., Тимофеева О.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, ул. Кремлевская 18, 420008

*almihailov@bk.ru*

В связи с ростом антропогенной нагрузки на среду постоянно увеличивается площадь почв сельскохозяйственного назначения, загрязненных тяжелыми металлами (ТМ). Избыточные концентрации ТМ приводят к торможению роста и развития растений, потере урожая и его качества. Изучение митотической активности клеток меристемы корня у разных видов растений (гороха, лука, ячменя и др.) показало, что в присутствии ТМ в высоких концентрациях замедляется интенсивность клеточных делений, уменьшается количество клеток на всех фазах митоза, увеличивается продолжительность отдельных фаз и всего митотического цикла. Модификация действия ТМ на культурные растения при применении различных регуляторов роста показана в ряде работ. Проводимые в последние несколько лет в нашей лаборатории исследования физиологической активности производных гиббереллиноподобного дитерпеноида стевиола позволили сделать заключение о том, что гликозид стевиозид обладает наибольшей антистрессовой и ростстимулирующей активностью. Целью работы было выявление защитного действия дитерпенового гликозида стевиозида на митотическую активность проростков озимой пшеницы в условиях стресса, вызванного тяжелыми металлами. Определение митотического индекса и длительности фаз митоза проводили по методу Паушевой.

Как показали результаты, пролиферативная активность корней пшеницы, обработанных стевиозидом ( $10^{-8}$ М), увеличивалась на 15% по сравнению с контрольными растениями. При этом под влиянием стевиозида уменьшалось на 13% количество клеток в метафазе и на 14% увеличивалось количество клеток в анафазе.

Выращивание проростков озимой пшеницы на растворах ТМ приводило к снижению митотической активности корней. В наших экспериментах Cd ингибировал деление клеток в обеих концентрациях (1мМ и 10мкМ), Cu и Zn – только в концентрации 1мМ.

При этом под влиянием ТМ происходило уменьшение клеток в профазе и метафазе, но удлинялась анафаза. Таким образом, ингибирующие свойства тяжелых металлов проявились в задержке клеточного деления на стадии анафазы. Дитерпеновый гликозид во всех вариантах уменьшал токсическое влияние ТМ на пролиферативную активность корней пшеницы, а при совместном действии стевиозида и меди и цинка в концентрации 10мкМ

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

митотическая активность была как варианте только с одним стевиозидом. Предпосевная обработка стевиозидом уменьшала эффект тяжелых металлов на митотический индекс корней проростков озимой пшеницы, что указывает на его защитное действие на процессы клеточного деления в условия стресса, вызванного тяжелыми металлами.

Влияние стевियोзида на развитие окислительного стресса у растений пшеницы при инфицировании микромицетами

The influence of stevioside on development of oxidative stress in wheat plants infected by Mikromitsety

Невмержицкая Ю.Ю., Шаймуллина Г.Х., Грошева Е.А., Тимофеева О.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казань, Россия

+7 843 233-78-26, +7 843 233-78-14, nuu76@mail.ru

Известно, что патогенез растений сопровождается усилением окислительных процессов, которые имеют большое значение для реализации защитных реакций. Образующиеся активные формы кислорода могут влиять на метаболические процессы как растения, так и фитопатогена. Поскольку механизмы устойчивости растений к специфическим и неспецифическим фитопатогенам представляют собой сложные и недостаточно изученные процессы, цель нашей работы заключалась в выяснении влияния инфицирования специфическим и неспецифическим фитопатогенами на про-антиоксидантный статус растений яровой пшеницы при действии дитерпенового гликозида стевियोзида.

Объектом исследования являлись проростки яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Омская 33. Инфекционными агентами служили фитопатогенные грибы *Fusarium oxysporum* и *Aspergillus niger*. Грибы были выделены из семян пшеницы, районированных для Республики Татарстан сортов и селекционных линий. Для обработки семян пшеницы использовали раствор стевियोзида ( $10^{-8}$  М), полученного из листьев стевии. Растения пшеницы выращивали в лабораторных условиях в кюветах на водопроводной воде при освещенности 100 Вт/м<sup>2</sup> и 12-часовом фотопериоде. Семена опытных вариантов предварительно замачивали в растворе стевियोзида в концентрации  $10^{-8}$  М. Инфицировали 7-суточные проростки спорами грибов *F. oxysporum* и *A. niger* в концентрации  $(1-3) \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> в течение часа. Последующие образцы отбирали через 1 час, 3 часа, 6 часов и далее через каждые 24 часа в течение 4 сут.

Известно, что активация процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран, вызванная усиленной генерацией АФК, является одним из наиболее ранних эффектов при инфицировании фитопатогенами. Одним из относительно стабильных продуктов перекисного окисления липидов мембранных липидов в клетке выступает малоновый диальдегид (МДА), по накоплению которого можно судить о степени окислительного стресса. Для наблюдения за развитием окислительного стресса при патогенезе определяли содержание МДА в течение 4 сут. Инфицирование *A.niger* и *F.oxysporum* повышало содержание МДА в корнях проростков пшеницы, что свидетельствует об активации процесса ПОЛ, и, следовательно, развитии инфекционного процесса в растении. В варианте с *A.niger* повышение ПОЛ наблюдалось уже через час после инфицирования, и сохранялось на том же

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

уровне еще в течение двух часов, далее наблюдалось его снижение, и на 4-е сутки после инфицирования уровень МДА достигал уровня контроля. При инфицировании патогеном *F. oxysporum* мы наблюдали 2 пика повышения уровня МДА - через 1 час после инфицирования и через 6 часов, на 4 сутки уровень содержания МДА в этом варианте снижался до уровня контрольных растений. Предварительная обработка семян стевиозидом ( $10^{-8}$  М) заметно снижала уровень МДА в растениях, инфицированных фитопатогенами, что может быть обусловлено мембраностабилизирующими свойствами стевиозида в условиях патогенеза. Известно, что стевиозид может предотвращать перекисное окисление липидов в желудке животных.

При внедрении патогена в ткани растения возникает ответная реакция всего организма, связанная с образованием активных форм кислорода и азота, что приводит к развитию окислительного взрыва. При этом наблюдается изменение активности ферментных систем. Исследование активности растворимой пероксидазы показало повышение ее активности при инфицировании растений двумя патогенами в течение всего эксперимента. Наибольшее увеличение активности растворимой пероксидазы наблюдалось через 24 ч под влиянием *A. niger*. Активность аскорбатпероксидазы значительно повышалась только под влиянием *F. oxysporum* через 48ч. Предварительная обработка стевиозидом ( $10^{-8}$  М) заметно уменьшала эффект обоих возбудителей фитозаболеваний на активность растворимой пероксидазы и аскорбатпероксидазы в проростках пшеницы.

Таким образом, при инфицировании растений пшеницы неспецифическим патогеном *A. niger* ответные биохимические реакции возникали значительно быстрее и протекали более интенсивно, по сравнению с инфицированием растения *F. oxysporum*. Выращивание растений на среде со стевиозидом ( $10^{-8}$  М) уменьшало эффект фитопатогенов на рост растений, перекисное окисление липидов мембран и активность антиоксидантных ферментов, что свидетельствует о его защитном действии при биотическом стрессе.

## Изменения активности супероксиддисмутазы при переходе клеток чайного растения от гетеротрофного к фотомиксотрофному типу питания в норма и при действии стрессора

Changes in the active superoxide dismutase during cell transition tea plants from heterotrophic to fotomiksotrophic nutrition under normal and stress conditions

Николаева Т.Н.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия

+7 499 977-94-33, +7 499 977-80-18, [niktat2011@mail.ru](mailto:niktat2011@mail.ru)

Переход клеток высших растений от гетеротрофного к автотрофному типу питания происходит на ранних этапах их онтогенеза. Этот период имеет важное значения для последующего роста и развития растений, которое зависит и от экологических факторов окружающей среды, в том числе наличия в ней поллютантов. К числу наиболее распространенных и токсичных их представителей относится кадмий, приводящий к задержке роста растений, изменениям в их метаболизме и развитию окислительного стресса. И в этом случае важная роль в защите клеток от стрессовых воздействий отводится высокомолекулярным антиоксидантам, к числу которых относится супероксиддисмутаза (СОД; К.Ф. 1.15.1.11). Она отвечает за инактивацию супероксид-анион-радикалов и является одним из ферментов первой линии защиты от активных форм кислорода (АФК), количество которых значительно возрастает при действии стрессоров.

Одним из подходов при изучении действия стрессовых факторов являются использование культур клеток и тканей высших растений, выращиваемых в условиях *in vitro*, поскольку они характеризуются более простым уровнем организации и растут в строго контролируемых условиях.

Целью данной работы являлось изучение изменений в активности СОД в культуре ткани чайного растения при переходе от гетеротрофного к фотомиксотрофному типу питания, в том числе в условиях действия кадмия.

Каллусные культуры стебля чайного растения, выращиваемые в темноте на питательной среде Хеллера с 2,4-Д (5 мг/л) и глюкозой (1,5%), после пересадки переносили в условия 16-час. освещения (5000 люкс). В опытных вариантах к питательной среде добавляли  $10,6 \times 10^{-5} \text{M Cd(NO}_3)_2$ . Активность СОД определяли на 20-й и 40-й дни (линейная и стационарная фазы, соответственно) с использованием нитросинего тетразолия, конкурирующего с СОД за супероксидные анионы и выражали в отн. ед./г сырой массы.

Как показали наши исследования, активность СОД в контрольном варианте была примерно в три раза выше по отношению к опытному варианту на обоих сроках выращивания. Следовательно, в стрессовых условиях, вызванных поступлением кадмия в каллусные культуры чая, происходит уменьшение пула фермента, его инактивация или дегградация за счет избытка АФК, образующихся в этих условиях. При этом в каллусных культурах обоих

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

вариантов активность СОД в начале пассажа была в 2,5-3 раза выше, чем в конце. Это согласуется с имеющимися в литературе данными о снижении активности СОД в клетках и тканях растений при их старении.

Таким образом, при переходе клеток чайного растения от гетеротрофного к автотрофному типу роста как в норме, так и в присутствии кадмия, повышение активности СОД происходило лишь в начале пассажа, а затем ее уровень снижался. Все это свидетельствует о том, что культуры чайного растения с высокой способностью к накоплению фенольных соединений (вторичных метаболитов всеобщего распространения с высокой антиоксидантной активностью), обладают устойчивостью к действию кадмия, несмотря на то, что при проведении исследовании была использована его «пороговая» концентрация, достаточно токсичная для их клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-01742).



## Полиморфизм дегидринов древесных растений в условиях криолитозоны Якутии

Dehydrins polymorphism of woody plants in the conditions of cryolithic zone in Yakutia

Перк А.А., Татарина Т.Д., Васильева И.В., Бубякина В.В., Пономарев А.Г.

ФГБУН Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия

*aaperk@mail.ru, anaponomarev@yandex.ru*

Внутривидовое генетическое разнообразие определяет экологическую пластичность популяций растений, позволяя им успешно адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Одним из критериев биоразнообразия может служить степень полиморфизма белков, в том числе, задействованных в адаптации растений к температурному стрессу. К таковым относятся белки-дегидрины, участвующие в защите клеточных структур от дегидратации, вызываемой холодовым фактором. Данные по внутривидовому полиморфизму дегидринов у древесных растений малочисленны и касаются видов, произрастающих в относительно благоприятных климатических зонах. Целью работы явилось сравнительное изучение особенностей полиморфизма дегидринов разных видов древесных растений Центральной Якутии – региона с экстремальными климатическими условиями (криолитозона), где зимние температуры в течение значительного периода держатся ниже  $-40^{\circ}\text{C}$ . В качестве объектов служили однолетние побеги березы повислой (*Betula pendula* Roth), сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr.) – основных лесообразующих видов растений, адаптированных к местным условиям. Сбор растений проводили в 2009-2014 гг. в лесных массивах (окрестности г. Якутска,  $62^{\circ}$  с.ш.,  $129^{\circ}$  в.д.). Ранее нами было показано, что наибольшее качественное и количественное разнообразие дегидринов отмечается в зимний период, поэтому для сравнительного анализа использовали растения, отобранные во время покоя, когда достигается максимальная морозоустойчивость. Выделение белков из побегов, аналитический электрофорез и блоттинг белков осуществляли согласно принятым методикам. Идентификацию дегидринов выполняли с помощью поликлональных антител против их консервативного К-сегмента («Agrisera», Швеция).

У всех изученных растений *B. pendula* были идентифицированы две группы дегидринов: первая – с низкими мол. м. – 15-21 кДа и вторая – с мол. м. в области 56-73 кДа. Из низкомолекулярных дегидринов только 17 кДа дегидрин в достаточном количестве встречался у всех растений, другой мажорный дегидрин 18 кДа был представлен примерно у трети образцов, еще более редкими являлись 15 и 21 кДа дегидрины. Среднемолекулярные дегидрины второй области имели множество форм, не менее 15, но только мажорные 66 и 69 кДа дегидрины были выявлены у большинства берез, тогда как другие мажорные белки – лишь у отдельных экземпляров.

### С-3. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений

В период покоя в побегах *P. sylvestris* мажорные дегидрины в хвое идентифицированы в двух областях: 14, 15 и 66 кДа, причем два последних дегидрина присутствовали у всех изученных растений. У ряда растений присутствовал также мажорный дегидрин 14 кДа. Минорные дегидрины у деревьев сосны в период зимнего покоя представлены более чем 10 белками в области 22-55, а также 120-145 кДа. В основном, полиморфизм дегидринов проявлялся в количественном содержании дегидринов, главным образом, 14, 15 и 66 кДа.

Существенной особенностью дегидринов побегов *L. cajanderi* являлось их необычайно высокое разнообразие. Следует отметить, что лиственница Каяндера представляет собой доминирующий лесообразующий вид в условиях криолитозоны и, как считается, относится к наиболее морозоустойчивым из всех деревьев в мире. Иммуноблоттинг белков в побегах этого вида обнаруживает почти непрерывный спектр дегидринов в области 14-42 кДа. У всех экземпляров лиственницы встречались мажорные 14, 15, 17, 18, 20, 33, 37, 39, 42, 73 кДа дегидрины, но в разных количествах. Наибольшие различия по дегидринам между отдельными деревьями выявлены в области 21-32 кДа, где в определенных сочетаниях могут быть представлены от 3 до 6 дегидринов.

Пока не ясно, как влияют особенности выявленного нами полиморфизма дегидринов на уровень адаптационной пластичности изученных растений. Однако, постоянное наличие в спектре дегидринов двух мажорных областей, из которых для низкомолекулярной характерна выраженная сезонная динамика, позволяет предположить важную роль последних в формировании морозоустойчивости древесных растений в условиях криолитозоны.

Работа выполнена в рамках НИР по проекту № 0376-2014-0006, тема VI.56.1.6. «Продукционный процесс и физиолого-биохимические механизмы устойчивости растений в криолитозоне», № гос. регистрации 01201282193.

## Липиды и адаптация организмов к холоду

### Lipids and adaptation of organisms to cold

Петров К.А., Перк А.А.

ФГБУН Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия

*kap\_75@bk.ru*

Обсуждается общая концепция механизмов устойчивости растений и животных к длительной гипотермии в условиях криолитозоны Якутии. Предполагается, что в регуляции биоэнергетики травоядных животных особое значение имеет биохимическая ценность их кормовой базы, которую создают осенне-вегетирующие и зимне-зеленые растения, уходящие под снег в зеленом состоянии (зеленый криокорм). Подвергаясь закаливанию осенью, цельные растения, а также их отава, накапливают максимальное количество энергоемких и биологически активных веществ, включая такие важные, как фосфолипиды и их жирные кислоты.

В процессе адаптации к гипотермии у травянистых растений в естественных условиях осенних пониженных температур криолитозоны Якутии содержание всех классов полярных липидов, входящих в состав клеток, существенно увеличивается. Таким образом, формируются ценные по биохимическому составу корма, консервируемые естественным холодом и способствующие перезимовки северных видов животных. Содержание в них значительного количества полиненасыщенных жирных кислот липидов, играющих ключевую роль в качестве нажировочного и антиоксидантного факторов, позволяют формировать уникальный состав запасных жиров как у не впадающих в спячку, так и у зимне-спящих животных. При этом, по-видимому, особая роль липидов в регуляции адаптации организмов к холоду связана с их влиянием на термогенез при длительном низкотемпературном стрессе. Свободные жирные кислоты становятся не только основным субстратом окисления в митохондриях, но и важнейшим регулятором-разобщителем дыхания и фотофосфорилирования, упрощающим превращение энергии дыхательных субстратов в тепло.

Осеннее накопление и зимнее расходование фосфолипидов у не впадающих в спячку и зимне-спящих организмов – это лишь следствие особенности их метаболизма, определяемого изменением уровня жировых запасов. Исходя из многочисленных данных о значительном влиянии сдвигов состава, как фосфолипидов в целом, так и их отдельных жирных кислот, на свойства липопротеиновых мембран клеток организмов, следует полагать, что этим путем, во многом, регулируется адаптация организмов к холоду.

Работа выполнена в рамках НИР по проекту № 0376-2014-0006, тема VI.56.1.6. «Продукционный процесс и физиолого-биохимические механизмы устойчивости растений в криолитозоне», № гос. регистрации 01201282193.

## Снижение фотохимической эффективности ФСII *Pinus sylvestris* при адаптации к низким температурам в осенний период

### Down regulation of PSII efficiency in *Pinus sylvestris* during autumnal cold acclimation

Софронова В.Е., Максимов Т.Х.

ФГБУН Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, проспект Ленина 41, г. Якутск, Россия.

+7 4112 33-58-97, +7 4112 33-58-12, vse07\_53@mail.ru

Низкая температура приводит к нарушению баланса между световой энергией, поглощаемой фотосистемами, и энергией, потребляемой в темновых реакциях фотосинтеза. В качестве редокс-сенсора «разбаланса» в ЭТЦ выступает пластохиноновый пул. Его перевосстановление превращает электрон-транспортный сигнал в биохимический, который активирует транскрипцию генов, приводящих к снижению количества солнечной энергии, утилизируемой в ЭТЦ хлоропластов. При этом АФК выполняют сигнальную функцию. Одним из основных путей восстановления баланса является снижение фотохимической эффективности ( $F_V/F_M$ ) и увеличение тушения избыточной абсорбированной энергии в ФСII. Этот механизм предотвращает избыточное образование триплетного хлорофилла и АФК в хлоропластах. Целью работы было изучение закономерностей снижения  $F_V/F_M$  в хвое текущего года *Pinus sylvestris*. В опытах использовали деревья 60–65 лет, произрастающие на территории Ботанического сада ИБПК СО РАН (62°15' с.ш., 129°37' в.д.). Опыты проводили с 16 августа до 22 декабря 2014 г.

В летний период показатель  $F_V/F_M$  имел величину 0.83 отн. ед. Наибольшие сезонные изменения  $F_V/F_M$  (от 0.83 до 0.31) происходили при снижении среднесуточной температуры от +8 до -4°C. В конце октября при -18...-19°C величина  $F_V/F_M$  составила около 0.15. В ноябре – январе, когда хвоя была укрыта снегом, а температура воздуха снижалась до -30...-40°C, значения  $F_V/F_M$  опустились до 0.10-0.11. В сезонной динамике  $F_V/F_M$  можно выделить три последовательные фазы, ассоциирующиеся с адаптивными изменениями комплексов ФСII.

Первая фаза протекала при понижении среднесуточной температуры от 8-9 до 1-2°C. Величина  $F_V/F_M$  снизилась на 30% по отношению к летним значениям. Снижение  $F_V/F_M$  было обусловлено, главным образом, уменьшением  $F_M$  и слабо выраженным, но достоверным увеличением  $F_O$ . Снижение  $F_M$  обычно связывают с тушением энергии в центрах ФСII в результате фотоингибирования РЦ – деградации части пула D1 белка, накопления Qb- не восстанавливающих центров ФСII, не способных к восстановлению пластохинона. Транзитное повышение эмиссии  $F_O$  связывают как с увеличением числа инактивированных РЦ ФСII в результате восстановления  $Q_A$ , так и с отсоединением ССКII от ФСII.

Вторую фазу (фазу быстрого снижения  $F_V/F_M$ ), отмечали с конца сентября до начала третьей декады октября при постепенном снижении среднесуточных температур воздуха от околонулевых до -6...-10°C. В этот период наблюдали

одновременное снижение  $F_O$  и  $F_M$ . Данному этапу предшествовало увеличение содержания Зеа в диапазоне среднесуточных температур 2.2...–2.4°C до 18 и 23% соответственно от суммы каротиноидов, тогда как при 6.2...18.5°C доля Зеа было равным 4.2 и 1.7% соответственно. Роль Зеа в конститутивном тушении избыточной энергии в антенном комплексе ФСII становится существенной при снижении температуры до околонулевых значений и ниже. Этот пигмент участвует в формировании специализированных центров диссипации энергии в антенных комплексах. Третья фаза характеризуется постоянно низкими значениями  $F_V/F_M$  и наблюдается при дальнейшем снижении среднесуточной температуры до –18...–24°C. Значения  $F_M$  и  $F_O$  в ноябре-декабре снижались (на 21 и 10-12%) относительно начала третьей декады октября, когда температура составляли –8...–10°C. По-видимому, при понижении температуры до –18...–25°C происходит дальнейшая разборка РЦ, инактивация кислород выделяющих комплексов (КВК) и замедление конформационных движений пигмент-белковых макромолекулярных структур в липидной фазе, способствующих созданию выгодных конфигураций для фотоингибиторного тушения. Обосновано предположение, что снижение фотохимической активности ФСII ( $F_V/F_M$ ) контролируется определенными диапазонами действующих в природе температур и не зависит от естественных колебаний ФАР. Это способствует упорядоченной во времени активации соответствующих фотопротекторных и антиоксидантных механизмов.

## Дегидрины в разных органах сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в условиях криолитозоны Якутии

Dehydrins scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in different organs in the conditions of cryolithic zone in Yakutia

Татарина Т.Д., Пономарев А.Г., Перк А.А., Васильева И.В., Бубякина В.В.

ФГБУН Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия

*t.tatarinova@gmail.com, anaponomarev@yandex.ru*

В формировании криорезистентности растений важная роль отводится специфическим белкам, синтезирующимся во время их осеннего перехода в морозоустойчивое состояние и способствующим достижению наибольшей морозоустойчивости в условиях экстремально холодного климата Якутии. Короткий фотопериод, низкие температуры и адаптивное обезвоживание тканей в период подготовки к зимнему покою индуцируют в разных органах растений накопление стрессовых белков-дегидринов. Вероятно, дегидрины могут участвовать в защите биополимеров и мембран клеток от повреждений, вызванных дегидратацией при воздействии низких отрицательных температур. Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) – один из морозоустойчивых лесобразующих видов Евразии. Дегидрины у хвойных деревьев криолитозоны почти не изучены. В этой связи весьма актуальным представляется исследование стрессовых белков-дегидринов, участвующих в формировании устойчивости хвойных растений к экстремальному холоду.

Целью работы явилось исследование особенностей состава дегидринов в разных органах сосны обыкновенной *P. sylvestris*, произрастающей в условиях криолитозоны Центральной Якутии.

Сбор образцов (хвоя 1-го и 2-го года, побеги 1-го года, верхушечные почки) сосны обыкновенной проводили в 2009-2014 гг. в лесных массивах (окрестности г. Якутска, 62° с.ш., 129° в.д.). Выделение белков из растительного материала, аналитический электрофорез и блоттинг белков осуществляли согласно принятым методикам. Идентификацию дегидринов выполняли с использованием поликлональных антител против их консервативного К-сегмента («Agrisera», Швеция).

Известно, что отдельные органы и ткани растений обладают различной степенью ответа на холодовой стресс. Впервые с использованием специфических антител в разных органах сосны обыкновенной в уникальных условиях криолитозоны Якутии изучены стрессовые белки-дегидрины. Показано, что основные мажорные дегидрины во всех изученных органах сосны (хвое, побегах и почках) представлены в двух областях: низко- (14-15 кДа) и среднемолекулярной (66 кДа), а также обнаружены минорные дегидрины.

При изучении мажорных дегидринов в хвое сосны выявлено значительное сходство индивидуальных деревьев по их составу во время зимнего покоя. Различия между растениями проявлялись в количественном содержании

низкомолекулярных (14-15 кДа) дегидринов, имеющих выраженную сезонную динамику, что предполагает их вероятную связь с морозоустойчивостью растений. Показано, что в годичном цикле развития *P. sylvestris* накопление дегидринов в хвое в осенний период совпадает с уменьшением содержания воды. Уровень дегидринов является стабильно высоким во время зимнего покоя, когда морозоустойчивость деревьев достигает максимальных значений. Между одно- и двухлетней хвоей не обнаружено заметных отличий, как по составу суммарных белков, так и по составу мажорных дегидринов.

Также, как и в хвое, содержание дегидринов в однолетних побегах и верхушечных почках сосны было наибольшим в середине зимы, когда отмечались самые низкие отрицательные температуры. В однолетних побегах и почках сосны состав дегидринов, по сравнению с таковым хвои, был гораздо разнообразнее. В побегах к мажорным могут быть отнесены дегидрины 14, 15 и 66 кДа, к минорным – 22, 26, 28, 41 и 48 кДа. Больше всего дегидринов выявлено нами в верхушечных почках. Их состав представлен мажорными 14, 15 и 66 кДа и минорными белками 22, 26, 28, 34, 38, 41, 45, 48, 55 и 127 кДа. Таким образом, у *P. sylvestris*, произрастающей в Центральной Якутии, обнаружены стрессовые белки-дегидрины, разнообразие состава и содержания которых возрастает в ряду: хвоя – побеги – почки. Высокий уровень дегидринов в разных органах во время зимнего покоя может свидетельствовать об их важной роли в формировании морозоустойчивости сосны обыкновенной в условиях криолитозоны Якутии.

Работа выполнена в рамках НИР по проекту № 0376-2014-0006, тема VI.56.1.6. «Продукционный процесс и физиолого-биохимические механизмы устойчивости растений в криолитозоне», № гос. регистрации 01201282193.

## Влияние спектрального состава света на активность антиоксидантных ферментов при патогенезе

Influence of the spectral composition of light on the activity of antioxidant enzymes in the pathogenesis

Якушенкова Т.П., Михайлова В.Б.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008,  
ул.Кремлевская, 18, Казань, Россия

+7 843 233-78-26, +7 843 233-78-14, [tatyana.yakushenkova@kpfu.ru](mailto:tatyana.yakushenkova@kpfu.ru)

Значение света разного спектрального состава в формировании роста, развития и устойчивости многих видов растений хорошо изучено и показано многими исследователями. Однако вопрос о влиянии селективного света на патогенез до сих пор остается малоизученным. Существует предположение, что селективный свет способен изменять многие процессы, происходящие при инфицировании растений. Объектом исследования служили девятисуточные проростки озимой пшеницы сорта Казанская 560 (*Triticum aestivum* L.). Растения выращивались в растительные разделенной на три светоизолированных блока: 1- белый свет, 2- синий свет, 3 – красный свет при 12-часовом фотопериоде. Проростки выращивались в кюветах на стерилизованном речном песке водопроводной воде в контрольном варианте или с добавлением в среду выращивания культуральной жидкости *Fusarium oxysporum* в соотношении 9:100. Активность фермента пероксидазы определяли согласно методике Бояркина в гомогенате. При исследовании влияния качества света на рост проростков было обнаружено увеличение ростовых показателей как у наземной, так и подземной частей проростков, выращенных на красном участке спектра. При заражении проростков пшеницы *F. oxysporum* наблюдали снижение интенсивности роста надземной и подземной частей. У проростков, выращиваемых на красном участке спектра, ростовые показатели при заражении имели наибольшее значение. Положительное влияние красного участка спектра при патогенезе по- видимому связано с увеличением содержания ИУК и зеатина. Известно, что красный участок на начальном этапе развития проростков способствует лигнификации клеточной стенки, что также может положительно отразиться на росте растений. У проростков, произрастающих на белом и синем участке спектра, ростовые показатели под действием патогена снижались. Очень интересны оказался факт накопления сухой биомассы при патогенезе. Наиболее большее накопление сухой биомассы наблюдали у проростков с синего участка спектра. Предполагается, что данная закономерность связана с изменениями в структуре ассимиляционной ткани. Клетки ассимиляционной ткани листа, сформированного на синем свету, упакованы плотнее, так как объем межклеточного пространства у них составил 35,0%, тогда как на КС – 40%, БС-38%. Известно, что активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в защите растений при патогенезе, поскольку могут являться сигнальными молекулами. Под контролем АФК находятся реакции сверхчувствительности и апоптоза. Основными антиоксидантами, которые



играют решающую роль в детоксикации АФК являются – аскорбиновая кислота, глутатион, антиоксидантные ферменты. Красный свет вызывал наибольшее увеличение активности антиоксидантных ферментов - пероксидазы и каталазы. При патогенезе также было установлено наибольшая ферментативная активность у проростков с красного участка спектра. Считается, что активация пероксидазы под действием красного света реализуется через фитохромную систему.

Таким образом, установлено повышение ростовых показателей и активности антиоксидантных ферментов под влиянием красного участка спектра как в контроле, так и при патогенезе.

# Симпозиум 4. Микробиота растений, симбиотические отношения растений с бактериями и грибами

## Устные доклады

Исследование пределов устойчивости микроскопических грибов и формирование коллекции перспективных изолятов

Of limits of stability of fungi and formation of a collection of perspective isolates

Бухарина И.Л., Исламова Н.А.

ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет», ул. Университетская, 1, Ижевск, Россия

+7 3412 916-071, buharin@udmlink.ru

Изучение свойств живых организмов позволяет использовать биологические возможности и свойства живых организмов, а также связи между живыми организмами, в разработке биотехнологий во многих отраслях. Это мониторинг состояния среды, разработка экологических биотехнологий защиты растений, повышения их выносливости к стрессовым факторам среды. Все это необходимо в лесном хозяйстве, аграрном производстве, зеленом строительстве городов. Микроскопические грибы являются слабоизученным звеном, поэтому весьма актуальны исследования реакции этих микроорганизмов на различные стрессовые факторы и установления пределов толерантности к ним. Исходя из этого, целью нашей работы является тестирование изолятов микроскопических грибов к действию различных концентраций химических веществ и неблагоприятных факторов среды, формирование банка экологических характеристик (показатели пределов выносливости, включая металл-резистентность) и коллекции изолятов микроскопических грибов, перспективных и востребованных для разработки биотехнологических методов повышения выносливости растений.

Методом посева корневой системы древесных растений, а также анализа ДНК корней и почв, отобранных в насаждениях города Ижевска (Удмуртская республика), выделен целый ряд изолятов микроскопических грибов, включая эндотрофные и другие группы грибов, экологическая роль которых требует изучения и уточнения. Важным фактом является то, что все эти грибы и их популяции адаптированы к техногенным условиям.

В экспериментах были изучены особенности роста микроскопических грибов на субстратах с различными концентрациями хлорида натрия. Для опыта использовалась твердая питательная агаровая среда, в которую был внесен NaCl в следующих концентрациях: К (Контроль) – без соли; 0,5 моль/л; 1 моль/л; 1,5 моль/л.

В качестве тестируемых использовались изоляты грибов, выделенные из корней древесных растений, произрастающих на территории г. Ижевска. Растения имели хорошее жизненное состояние, несмотря на неблагоприятные экологические условия среды. В данную статью включены результаты исследования солеустойчивости двух видов грибов: *Cylindrocarpon radicum* и *Fusarium equiseti*. Опыт проводили в пятикратном повторении. Грибы инкубировали при температуре 24-25 °С в течение двух месяцев.

Результаты показали, что при весьма высокой концентрации хлорида натрия, преодолев адаптационный период в 7-12 дней, начинался рост мицелия у обоих изучаемых видов грибов.

Последние измерения, проведенные через 2 месяца после посева, показали, что у гриба *Cylindrocarpon radicum* существенной разницы в размерах мицелия в разных вариантах опыта не наблюдалось, за исключением варианта с максимальной концентрацией соли. Следует указать, что у *Fusarium equiseti* растворы NaCl 0,5 и 1 моль/л, наоборот, стимулировали рост мицелия. Изменилась и структура мицелия изолята, что свидетельствует о переходе гриба к спороношению.

Изоляты грибов с высоким потенциалом выносливости затем были использованы в лабораторном эксперименте по инокуляции тестовых культур растений и их выращиванию в моделируемых условиях среды (климатические камеры) в гидропонных фитильных установках в питательном растворе с внесением хлорида натрия в концентрации 0,5 моль/л; 1 моль/л; 1,5 моль/л. Наблюдение за ростом и развитием инокулированных растений проведено на культуре томата в догенеративный период. Следует отметить гибель растений в вариантах опыта с растворами максимальной концентрации. В остальных вариантах опыта растения, хотя и отставали в росте по сравнению с контролем, но оставались жизнеспособными. Была проведена оценка степени инфицированности корней, которая соответствует 2-3 классам. Также проведен сравнительный анализ морфометрических и биохимических показателей растений.

В настоящее время заложен лабораторный эксперимент с растениями, инокулированными *Cylindrocarpon radicum* и *Fusarium equiseti*, которые выращиваются на питательных растворах с внесением различных концентраций солей цинка, марганца и хрома.

Результаты исследований подтверждают возможность использования эндотрофных симбиотических грибов в экспериментах по повышению выносливости сельскохозяйственных и древесных культур путем инокуляции рассады и семян.

Исследования проводятся при поддержке гранта РФФИ (номер проекта 16-34-00855).

## Взаимодействие С<sub>4</sub>-растений с грибами рода *Trichoderma*

### Interaction С<sub>4</sub>-plants with fungi of the *Trichoderma*

Голованова Т.И., Валиулина А.Ф.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ). Российская Федерация, 660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79

[valiulina1988@mail.ru](mailto:valiulina1988@mail.ru)

Важнейшей задачей в сельском хозяйстве в настоящее время является повышение продуктивности растений и их устойчивости к факторам окружающей среды. Большую роль в культивировании сельскохозяйственных растений играет человек, но, создавая необходимые условия для роста и развития растительных организмов, он не исключает возможного взаимодействия растений с патогенными микроорганизмами, которые могут подавлять или задерживать рост растений, а в некоторых случаях приводить к их гибели. Как показывают исследования, в качестве стимуляторов роста и развития растений могут выступать микроорганизмы-антагонисты патогенов, способные образовывать ассоциации с корнями растений и оказывать помимо защитного эффекта прямое стимулирующее действие на рост и развитие растения. К таким микроорганизмам относятся грибы рода *Trichoderma*. В связи с этим, изучение взаимодействия микроорганизмов-антагонистов и растений в настоящее время представляет большой научный интерес и особенно актуально в связи с возможностью альтернативной замены пестицидов на вещества биологической природы. Накоплен значительный материал по влиянию грибов рода *Trichoderma* на растения с С<sub>3</sub>-типом метаболизма, однако среди сельскохозяйственных растений выделяют ряд культур, которые характеризуются С<sub>4</sub>-типом метаболизма, но работ по их взаимодействию с микроорганизмами крайне мало. Следует отметить, что действие микроорганизмов и факторов окружающей среды на растения определяется видовой специфичностью и отличается сезонной динамикой, поэтому научная новизна данной работы заключается в выявлении сезонных различий во взаимодействии растений с С<sub>4</sub>-типом метаболизма и грибов рода *Trichoderma*. В связи с этим цель данной работы – провести оценку влияния *Trichoderma asperellum* МГ-97 на физиолого-морфологические и биофизические параметры растений с С<sub>4</sub>-типом метаболизма в периоды весеннего, летнего и осеннего сезонов.

В качестве объекта исследования использовали растения кукурузы сорта сахарный гибрид Сахарный початок (фирма «Гавриш»). Перед посевом семена стерилизовали 0.5% раствором КМnO<sub>4</sub> в течение 10 минут, затем несколько раз промывали стерильной дистиллированной водой. Часть семян обрабатывали спорами гриба *Trichoderma asperellum* МГ-97, в качестве контроля были растения, семена которых не обработаны микромицетами. Растения выращивали в условиях естественного освещения в течение 30 суток, относительная влажность воздуха составляла 75±3%; температура воздуха -

25±2°C. Растения поливали отстоянной водопроводной водой, поддерживая относительную влажность почвы на уровне 60%, количество растений в каждом варианте - 30 - 40 штук.

Всхожесть семян определяли в соответствии с ГОСТ 12038-84. Сырую, сухую биомассу, размерные показатели, содержание пигментов и их отношение, скорость электронного потока определяли на 15, 21 и 27 сутки после появления всходов. Содержание зеленых пигментов определяли спектрофотометрическим методом по молярным коэффициентам экстинкции на приборе Spocol 1300. Фотосинтетическую активность листьев растений определяли на флуориметре JUNIOR-PAM (Walz, Effeltrich, Germany).

Достоверность различий средних значений оценивали на основе критерия Стьюдента для уровня значимости 95%.

Исследования показали, что не зависимо от сезона, ярко проявлялось стимулирующее действие грибов штамма *Trichoderma asperellum* МГ-97 на физиолого-морфологические параметры растений с C<sub>4</sub>-типом метаболизма. Наибольший стимулирующий эффект действия микромицетов был отмечен на развитие корневой системы, особенно в осенний период. Это можно объяснить тем, что растения в данный период находились в состоянии глубокого физиологического покоя, а вынужденный выход из данного состояния требует активной работы корневой системы для снабжения растений необходимыми питательными веществами в связи с перестройкой метаболических процессов. На взаимоотношение растений кукурузы и грибов рода *Trichoderma* большое влияние оказывали факторы окружающей среды. У растений, выращенных в осенний период, наибольший эффект действия микромицетов на физиолого-морфологические параметры проявлялся уже на 15-е сутки вегетации, а у растений, выращенных в весеннее - летний период – на 21-е сутки вегетации. Такое влияние грибов *T. asperellum*, вероятно, связано с перестройкой метаболических процессов растений с весенне-летнего на осенне-зимний период. Действие грибов рода *Trichoderma* проявлялось на содержании и соотношении форм хлорофиллов в листьях C<sub>4</sub>-растений в сторону увеличения содержания хлорофилла *b* на 15-е сутки вегетации как в весенне-летний, так и в осенний периоды, особенно ярко данный эффект проявлялся в осенний период, при этом общее содержание хлорофилла не изменялось. Однако на 21-е сутки в осенний период происходило увеличение общего содержания хлорофилла за счет хлорофилла *a*. Такое неоднозначное действие на перераспределение форм хлорофилла у растений кукурузы, возможно, связано с перестройками обменных процессов в растениях. При этом необходимо отметить, что *Trichoderma* не оказывала существенного влияния на биофизические параметры растений с C<sub>4</sub>-типом метаболизма.

## Изучение межмикробных и микробно-растительных взаимоотношений бактериальных эндофитов бобовых растений

### The study of intermicrobial and plant-microbial relationships of bacterial endophytes of Legumes

Гарипова С.Р.,<sup>1</sup> Гарифуллина Д.В.,<sup>2</sup> Иванчина Н.В.,<sup>1</sup> Маркова О.В.,<sup>1</sup> Уразбахтина Н.А.,<sup>3</sup> Хайруллин Р.М.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Башкирский государственный университет,

<sup>2</sup> Россельхозцентр, ФГБУ, филиал по РБ,

<sup>3</sup> Башкирский государственный аграрный университет,

<sup>4</sup> Институт биохимии и генетики УНЦ РАН. Россия, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32

+7 347 229-96-30, [garisveta@rambler.ru](mailto:garisveta@rambler.ru)

В настоящее время уже не вызывает удивления мысль о том, что непатогенные эндофитные (далее будем называть их просто «эндофитные бактерии») являются неотъемлемой частью растительного макроорганизма. Однако в начале 90-х гг. их присутствие в растениях подвергалось сомнению и считалось артефактом недостаточной поверхностной стерилизации тканей. Наш интерес к этой части микробиома возник, когда в коллекции выделенных нами клубеньковых бактерий были обнаружены стабильные ассоциации ризобий с их неризобияльными бактериальными спутниками, которые воспроизводились не только в пересевах *in vitro*, но и при выделении из клубеньков инокулированных растений. При длительном хранении и пересевах на микробиологических средах, без пассирования через растение, состав ассоциаций менялся, в некоторых случаях элиминировался ризобияльный компонент, в других случаях ризобии сохраняли свое присутствие и численное преимущество в ассоциациях. Антагонистическая активность против возбудителей грибных болезней растений у измененных ассоциаций, как правило, возрастала. Анализ бактериального сообщества эндофитов корня, корневой шейки, клубеньков растений гороха показал, что во всех органах встречались перспективные в хозяйственном отношении бактерии, способные *in vitro* стимулировать рост растений, подавлять развитие фитопатогенов. Так была начата программа скрининга ассоциаций эндофитных бактерий, выделенных из клубеньков растений гороха и фасоли, с целью найти стабильные сообщества бактерий, дружественные ризобиям и обладающие комплексом свойств: а) симбиотической азотфиксацией, б) стимуляцией роста растений, в) способностью формировать устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, для использования в биопрепаратах для растениеводства. Параллельно изучали изменчивость признаков клубенькообразующей способности, устойчивости к болезням и продуктивности у разных сортов растений гороха и фасоли в контрастных условиях среды для разработки рекомендаций по возделыванию определенных генотипов в интенсивной или адаптивной системах земледелия. Была также предпринята попытка выяснения пути проникновения эндофитных бактерий с помощью *gfp*-меченого штамма *Serratia* sp. Ent16,

который обнаруживался в сосудах корня и проникал внутрь растительных тканей предположительно через примордии боковых корней.

В результате изучения межмикробных биотических взаимоотношений в ассоциации эндофитов было сделано несколько нетривиальных выводов: антагонистическая активность против возбудителей корневых гнилей была характерна не только для псевдомонодных и бациллярных ризобияльных спутников, но и для некоторых штаммов *Rhizobium*; большинство коллекционных штаммов ризобий способствовало снижению распространения и степени поражения корней гороха корневыми гнилями в полевых условиях, этот же эффект был замечен у растений фасоли независимо от клубенькообразующей активности; была отмечена антагонистическая активность некоторых ризобияльных спутников против ризобий, но она была существенно ниже по отношению к ризобиям из собственной ассоциации; антагонизм к ризобиям, обнаруженный в системе *in vitro*, не препятствовал формированию *in planta* эффективных комбинаций штаммов, способствующих повышению продуктивности и устойчивости растений гороха. Эти наблюдения свидетельствуют об очень сложных взаимоотношениях в микробиоме растения.

Серия экспериментов *in vitro* по инокуляции одними и теми же штаммами растений пшеницы, гороха, фасоли показала, что для бобовых растений рекомендуемая высокая плотность ( $10^7$  клеток/семя) угнетала прорастание семян, малая ( $10^5$  клеток /семя) – стимулировала энергию прорастания и рост корней. При этом прорастание семян пшеницы не ингибировалось высокой плотностью клеток бактерий в инокулюме. Возникла гипотеза о том, что фактором дифференцированной реакции двудольных и однодольных растений на плотность клеток эндофитных бактерий являлась продукция бактериями индольных соединений. И действительно, в экспериментах по оценке гормонального статуса растений гороха, инокулированных эндофитными бациллами с различной продукцией фитогормон-подобных соединений, было выявлено торможение роста, связанное с увеличением АБК в корнях, как защитная реакция против высокой концентрации в спермосфере растения индол-продуцирующего штамма. В этих модельных экспериментах было также замечено, что присутствие в системе ризобий снимало ингибирующий эффект высокой плотности клеток, что, скорее всего, было связано с наличием ризобияльных сигналов негормональной природы. По нашему мнению, ключевым моментом в выяснении механизмов действия эндофитных бактерий является их способность продуцировать фитогормон-подобные соединения, которые наиболее заметно проявляют свое действие тогда, когда собственные гормоны растений, реагируя на изменения среды, тормозят рост и развитие организма. Активизация роста растений бактериальными гормонами, действующими относительно независимо, может иметь как положительное, так и отрицательное воздействие на растительный организм в зависимости от характера и продолжительности действия неблагоприятных факторов окружающей среды.

Функциональное взаимодействие автотрофного и гетеротрофного компонентов лишайников как устойчивой симбиотической системы при действии стресс факторов

Functional interaction between autotrophic and heterotrophic components of symbiotic lichen system under stress

Шелякин М.А., Захожий И.Г., Головки Т.К.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, 167982, ул. Коммунистическая, 28, г. Сыктывкар, Россия

+7 8212 24-96-87, +7 8212 24-01-63, [shelyakin@ib.komisc.ru](mailto:shelyakin@ib.komisc.ru)

Лишайники – устойчивая ассоциация гетеротрофного организма (микобионта) и фотосинтезирующего организма (фотобионта). Таллом (слоевище) лишайников представляет собой сплетение грибных гиф, куда интегрированы клетки фотобионта (зеленые водоросли и/или цианобактерии). В талломе лишайников доминирует микобионт. На долю фотобионта, роль которого считается ключевой в обеспечении существования всей ассоциации, приходится не более 10% биомассы таллома. Лишайники довольно хорошо изучены с точки зрения структурных и трофических взаимодействий клеток фото- и микобионта. Показаны изменения в структуре клеточных стенок компонентов лишайников при совместном существовании. Установлено, что зеленые водоросли поставляют клеткам микобионта сахароспирты, тогда как цианобактерии – глюкозу и продукты биологической азотфиксации. Считают, что микобионт способен оказывать воздействие на фотобионт, стимулируя синтез и выделение продуктов ассимиляции углерода. Исследованы некоторые молекулярно-генетические аспекты образования симбиоза. Известно, что на ранних стадиях его развития в грибном компоненте происходит усиление экспрессии генов ферментов, активность которых ингибируется глюкозой (оксидоредуктазы, диоксигеназы), а в клетках водорослей наблюдается активация генов белков, подобных хитиназам и белков, ответственных за метаболизм аминокислот аргинина и динамина.

Лишайники способны существовать в крайних условиях и быстро восстанавливать свои функции после десикации, замораживания и других неблагоприятных воздействий, вызывающих гибель других организмов. Полагают, что основу устойчивости лишайников составляют конститутивные механизмы защиты, а также способность клеток фотобионта предотвращать развитие окислительного стресса путем рассеивания избытка поглощенной энергии с участием каротиноидов виолаксантинового цикла и/или через изменение конформации белков реакционного центра фотосистем. Немаловажную роль играют синтезируемые микобионтом продукты вторичного метаболизма. Однако мало что известно о взаимодействии компонентов лишайниковой ассоциации при формировании реакций на внешние воздействия. Мы исследовали изменение функционального состояния фото- и микобионта лишайников под действием высоких и низких температур, УФ–радиации и загрязнения среды бокситовой пылью с высоким



содержанием алюминия и тяжелых металлов. Для этого использовали показатели фотосинтеза и дыхания, характеризующие биоэнергетику компонентов таллома.

Выявили, что стрессовые воздействия приводили к усилению процессов нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла и снижали фотохимическую активность фотосинтетического аппарата фотобионта. Нефотохимическое тушение, связанное с процессами ответственными за преобразование в тепло части поглощенной световой энергии, способствует предотвращению образования значительных количеств АФК, вызывающих деструкцию биомолекул и клеточных структур. В то же время усиленное образование АФК в фотосинтетической ЭТЦ может служить сигналом к активации защитных механизмов фото- и микобионта, что сопровождалось изменением дыхания и вовлечением альтернативного энергетически малоэффективного пути (АП). По нашему мнению, эти изменения носят защитно-приспособительный характер и в значительной степени связаны с микобионтом. Из литературы известно, что АП дыхания присущ грибам, но в отличие от растений альтернативная оксидаза грибов не образует димерную форму. Смещение дыхания микобионта в сторону энергетически диссипирующего АП, с одной стороны, может способствовать снижению генерации АФК в дыхательной ЭТЦ, с другой, обеспечивать поддержание высокой скорости работы цикла Кребса, продукты которого необходимы для образования лишайниковых веществ. Лишайниковые вещества, содержание которых составляет в среднем 5-10%, но может достигать 20% массы таллома, синтезируются грибом и откладываются на поверхности гиф верхнего корового слоя, экранируя и защищая фотобионт от губительного действия избыточного света и УФ-радиации. Изменения в метаболизме гетеротрофного компонента способствуют сохранению фотобионта, определяющего автотрофный характер всей ассоциации.

Проведенные исследования – важный шаг для дальнейшего выявления механизмов устойчивости лишайников к факторам среды и установления сигнальных путей взаимодействия компонентов симбиотической системы.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН по направлению «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» (проект 15-12-4-4).

## Физиологическая гетерогенность клеток пектобактерий при взаимодействии с растениями

The physiological heterogeneity of *Pectobacterium* cells during plant-microbe interactions

Горшков В.Ю.<sup>1,2</sup>, Даминова А.Г.<sup>1</sup>, Губаев Р.Ф.<sup>1,2</sup>, Петрова О.Е.<sup>1</sup>, Гоголева Н.Е.<sup>1</sup>, Исламов Б.Р.<sup>1,2</sup>, Агеева М.В.<sup>1</sup>, Воробьев В.Н.<sup>1,2</sup>, Тарасова Н.Б.<sup>1,2</sup>, Гоголев Ю.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, 420111, Лобачевского 2/31, Казань, Россия

+7 843 292 72 22, +7 843 292 73 47, [vladimir.gorshkov@kibb.knc.ru](mailto:vladimir.gorshkov@kibb.knc.ru)

<sup>2</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Кремлевская 18, Казань, Россия

+ 7 843 233 78 26, +7 843 233 78 14

Система паразит/хозяин это одна из категорий организации живой материи, в рамках которой происходит интеграция макро- и микроорганизмов. Практически любой организм даже в норме взаимодействует с патогенной микрофлорой. При этом, как правило, системы паразит/хозяин находятся в равновесном состоянии, несопряженном с развитием острого инфекционного процесса. Долгое время считали, что характер взаимодействия организмов в рамках патосистемы (например, острая или латентная инфекция) полностью определяется особенностями физиологии высшего организма; микробный компонент при этом расценивался как относительно статичный. В особенности это касается некротрофных фитопатогенов, использующих при колонизации хозяина «грубую силу», например, массивную продукцию экстраклеточных ферментов, разрушающих растительную клеточную стенку. К таким патогенам относятся представители рода *Pectobacterium*, которых причисляют к одним из самых вредоносных фитопаразитов и называют «чумой растений». Считается, что наличие «грубой силы» у пектобактерий делает ненужным применение изысканной тактики при колонизации растения-хозяина. Тем не менее, существуют предпосылки, чтобы расценивать «грубую силу» как не единственную стратегию взаимодействия пектобактерий с растениями. Во-первых, в геномах этих микроорганизмов обнаружены гены, характерные для биотрофных патогенов и, во-вторых, описаны случаи длительного бессимптомного взаимодействия этих бактерий с растениями.

В наших исследованиях мы оценили разнообразие тактических приемов, используемых пектобактериями при колонизации разных компартов растений при дифференциальном характере инфекционного процесса у неспецифичного (табак) и специфичного (картофель) хозяина. Был впервые описан особый способ колонизации сосудов ксилемы, связанный с формированием «многоклеточных» структур – бактериальных эмболов. Эти структуры, приводящие к закупорке сосудов, состоят из плотно

расположенных, пространственно ориентированных клеток бактерий, имеющих особый фенотип и области межклеточных контактов, и их формирование связано с желированием ксилемного сока, которое обеспечивается наряду с полимерами бактериального происхождения, полисахаридами растительной клеточной стенки. С помощью отделения бактериальных эмболов от остальной части популяции пектобактерий *in planta* с использованием лазерной микродиссекции были продемонстрированы различия в характере экспрессии генов, связанных с вирулентностью, в клетках, формирующих эмбол, и клетках, колонизирующих зону паренхимы. Разработана модель *in vitro*, имитирующая условия ксилемных сосудов инфицированных растений, в которой циркуляция бактерий в оптимизированной среде культивирования осуществляется через систему стеклянных капилляров; с помощью этой модели удалось добиться ассоциации клеток и формирования мультиклеточных структур, схожих с бактериальными эмболами.

Выявлены различия в колонизации паренхимы при взаимодействии пектобактерий с растениями картофеля и табака, а также при различном течении инфекционного процесса. При специфичных взаимодействиях в значительно большей степени, чем при неспецифических, выражена упорядоченность колонизации паренхимы: пектобактерии локализуются в субэпидермальных слоях в межклетниках, которые из-за очень сильного увеличения размеров занимают практически все пространство разрушенных прилегающих клеток. Более глубокие слои при этом, несмотря на выраженные симптомы заболевания, остаются интактными. Внутри межклетника пектобактерии имеют особую ультраструктуру. Такие же морфологические особенности пектобактерии приобретали *in vitro* при культивировании в присутствии экстрагированных из стеблей картофеля низкомолекулярных водорастворимых метаболитов, которые обладают сигнальной функцией в отношении пектобактерий. На поздних стадиях инфекции клетки части популяции пектобактерий приобретают признаки покоящихся, а часть клеток реализует социальную подвижность, колонизируя ризосферу.

Таким образом, при взаимодействии с растениями происходит функциональная специализация клеток пектобактерий в зависимости от типа колонизируемой ткани, стадии инфекционного процесса и специфичности растения-хозяина. По всей видимости, одной из движущих сил для подобной специализации служит сам растительный организм, формирующий динамичный информационный фон для бактерий. Для выяснения молекулярно-генетических детерминант, определяющих различия в стратегиях взаимодействия пектобактерий и растений, проведен анализ транскриптомов этих фитопатогенов в организме растения-хозяина с применением методов высокопроизводительного секвенирования следующего поколения.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект №15-14-10022); раздел исследований, связанный с фитогормональной регуляцией поддержан РФФИ (проект № 14-04-01750).

## Роль корневых выделений в ризосфере растений

The role of root exudates in plant rhizosphere

Демина О.С., Ларикова Ю.С., Кондратьев М.Н.

Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А.

Тимирязева, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49

+7 499 976-20-54, [scorpy08@mail.ru](mailto:scorpy08@mail.ru)

Корни растений выделяют в ризосферу низкомолекулярные органические соединения весьма широкого физиологического назначения, которые принимают участие во взаимодействиях корень-корень, корень-насекомое, корень-микроорганизмы. За последнее десятилетие были предприняты большие усилия к пониманию этих типов взаимодействий, в связи с чем эта область биологии растений признала важность корневых выделений в опосредовании биологических взаимодействий между организмами, организмами и средой. Ризосфера является весьма динамичной в процессе взаимодействия между корнями и болезнетворными или полезными почвенными микроорганизмами, беспозвоночными, корневыми системами конкурентов. Так как корни растений находятся в почве, многие интересные явления, в которых они участвуют, остаются практически незамеченными. В частности, совсем недавно среди множества функций корневых выделений растений стала обсуждаться возможность их использования в качестве химических сигналов. Таким образом, с каждым годом всё большее количество исследователей утверждает в мысли, что сигналинг между корнями растений и другими почвенными организмами осуществляется на основе химических соединений, содержащихся в корневых выделениях.

Названы общие принципы обмена химическими сигналами между корнями растений и биотой почвы. Так, одни и те же химические сигналы (химические соединения) могут вызывать разнородные ответные реакции от акцепторов этих сигналов. Химические компоненты корневых выделений могут привлекать один организм и отталкивать другой или же один организм может привлекаться разными химическими соединениями от других организмов. Конкретным примером различных значений для химического сигнала является выделение изофлавонов корнями сои, которые, с одной стороны, в процессе мутуалистических взаимоотношений, привлекают *Bradyrhizobium japonicum*, с другой стороны, привлекают патоген *Phytophthora sojae*. Механизмы интерпретации большого количества химических сигналов, получаемых от других организмов в ризосфере, в значительной степени неизвестны.

Взаимодействия корень одного растения с корнем другого, корень – бактерия, корень – гриб, корень – насекомое могут быть положительными, негативными или нейтральными. Положительные взаимодействия включают в себя симбиотические ассоциации с эпифитами и микоризными грибами, колонизацию корней симбиотическими азотфиксаторами, свободно живущими бактериями, стимулирующими рост растений (PGPB). Отрицательные взаимодействия включают конкуренцию или паразитизм

среди растений, патогенез бактерий или грибов, а также беспозвоночных насекомых.

Помимо сигнальной функции корневых выделений в настоящее время интенсивно исследуются аллелопатические отношения между растительными видами, в которых основную роль играют корневые выделения, химические компоненты которых также могут оказывать как положительное, так и отрицательное действие на растение – акцептор этого (этих) соединений. Из числа культурных видов наибольшей аллелопатической активностью обладают корневые выделения ржи (*Secale*), люпина (*Lupinus*) и подсолнечника (*Helianthus*). В отличие от вторичных соединений, выполняющих роль химического сигнала, эти соединения не обладают избирательностью действия на целевые растения, а их эффект зависит от концентрации в составе корневых выделений и вида растения, акцептора аллелохимикалий. Кроме этого, накопление аллелохимикалий в зоне корней вида-донора может вызывать явление аутинтотоксикации. Например, в наших исследованиях люпин узколистный (*Lupinus angustifolius*) был склонен к аутинтотоксикации в большей степени, чем рожь или подсолнечник. После реализации 5-6 культурооборотов, проростки семян люпина, посеянные в субстрат, проявляли признаки адаптации к содержащимся в субстрате компонентам собственных корневых выделений. Проростки подсолнечника и ржи, выращиваемые на перлите после удаления растений люпина, также испытывали остаточный негативный эффект его корневых выделений, причём сильнее он проявлялся у проростков ржи. При сравнении эффекта корневых выделений люпина и подсолнечника, полученных, при длительном их выращивании в бессменной культуре на перлите, выявлено, что прорастание семян и рост проростков ржи существенно ингибировались на корневых выделениях люпина, тогда как на корневых выделениях подсолнечника отмечалась некоторая стимуляция этих процессов по сравнению с проростками контрольного варианта.

Таким образом, можно заключить, что химические соединения корневых выделений, в силу своего широкого разнообразия, обладают множественными физиологическими функциями, причём те из них, которые обладают аллелопатической активностью, скорее всего, не могут участвовать в передаче химического сигнала.

Опосредованное управление самоорганизацией биоты макро - и микромицетов в искусственных лесных биогеоценозах (по материалам Джаныбекского стационара РАН)

Indirect regulation of self-organization of biota of macro- and micromycetes in artificial forest ecosystems (based on Dzhanlybek Research Station of RAS)

Душков В.Ю.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия

*vdushkov@yandex.ru*

Известно, что основная часть сосудистых растений (70% однодольных, и 80-90% двудольных) являются микотрофами, то есть видами, образующими на корнях симбиоз. Такие растения как дуб, сосна, лиственница (облигатные микоризообразователи) вообще не могут нормально существовать без микоризы. Интенсивное развитие грибов и бактерий активизирует деятельность нематод и членистоногих, а это в свою очередь активизирует процессы почвенного плодородия. Гифы микоризных грибов могут уходить в почву на большие расстояния и транспортировать трудно доступные питательные вещества и воду к корню растения. Грибы, поселяющиеся на мертвой древесине (рядовка, вешенка, свинушка) способствуют очищению леса от опавших ветвей и валежа. В целом биота грибов является важнейшей составной частью минимальных единиц биосферы – биогеоценозов, которые своей совокупностью поддерживают гомеостаз биосферы. В этой связи важно знать, с какой скоростью может быть сформирована биота макро - и микромицетов в натурно моделируемых человеком лесных биогеоценозах, на базе которых человечество может стабилизировать гомеостаз биосферы и противостоять глобальному потеплению (Душков, 2000, 2005, 2006, 2011, 2012).

Уникальные результаты по данной проблеме получены на агролесомелиоративном Джаныбекском стационаре, заложенном (1952 г) в глинистой полупустыне Северного Прикаспия. Натурное моделирование древесных и кустарниковых биогеоценозов в изолированных от естественных лесов (на 120-200 км) условиях, показало, что создание лесных насаждений, как на солонцовом комплексе, так и интразональных черноземовидных почвах больших палин (10-12% территории), способствует спонтанному формированию лесной микофлоры. В дендропарке стационара созданном в большой палине, после смыкания крон деревьев (через 5-8 лет после посадки) и образования лесной подстилки макро - и микромицеты (малые грибы налеты, плесени, пятна на растениях) начали формировать различные биогеоценозические связи. В 15-20 летних культурах появились различные шляпочные грибы, в том числе съедобные. Первым в лесных насаждениях был зафиксирован лесной шампиньон, разновидность которого (шампиньон луговой) во влажные годы встречается в степи. Позже в значительном

количестве появилась свинушка, и затем дубовик. Массовое появление последнего отмечалось в дубраве, на участке где проводилась интродукция ландыша и дождевого червя. В 25 летних культурах созданных в больших падинах было зафиксировано 64 вида макромицетов (Бурова, Нейздаминого, 1980) среди которых, было около 10 видов съедобных шляпочных грибов. В последующем, видовой состав, встречаемость и урожайность грибов стал быстро нарастать. В пятом десятилетии число съедобных шляпочных грибов достигло 2-х десятков. По четкой приуроченности грибов к видам растений (сосновый масленок - к сосне, лиственничный масленок - к лиственнице, подберезовик - к березе), мы пришли к заключению, что мицелии грибов были завезены вместе с сеянцами (на корнях), доставляемых из питомников (опосредованная антропогенная интродукция). Завозу мицелия различных грибов, способствовала так же интродукция (из ближайших естественных дубрав) червей, сныти, ландыша в моделируемую дубраву, где отмечалось максимальное разнообразие грибов. Распространению спор грибов, безусловно, способствовали ветер и птицы. За 15-25 лет в искусственных биогеоценозах стационара, были сформированы представители основных групп лесной микрофлоры: микоризообразователи, гумусовые сапрофиты, сапротрофы и т.д.

В 1982-84 гг., А.Н. Кузнецов (1989) обнаружил грибного симбионта у вяза приземистого произрастающего на солонцовом комплексе. Гриб - представитель семейства *Endogonaceae* образовал с 15 и 25 летним вязом («Госфонд») микоризу, локализованную в сосущих корневых окончаниях. Отмечено, что на более плодородных черноземовидных почвах западин, укороченных корней, было в 3-4 раза меньше, чем на солончаковых солонцах. Предположили, что на мелиорируемых солончаковых солонцах для улучшения своего питательного режима вяз вступает в более активные симбиотические отношения.

Выводы: (1) Уникальный полувековой эксперимент, поставленный в полупустыне, в изолированных условиях, вскрыл возможность ускоренного (за 15-20 -25 лет), формирования в моделируемых лесных биогеоценозах полноценной биоты макро - и микромицетов; (2) Для опосредованного управления и стимулирования самоорганизационных процессов в натурно моделируемых биогеоценозах, следует использовать сеянцы растений выращенные в стационарных, длительно функционирующих лесных питомниках, в почве которых уложены основные биогеоценозические связи; (3) В искусственно моделируемых биогеоценозах, особенно ценных, целесообразно проводить биогеотехнологические работы, способствующие ускоренному формированию базовых группировок макро - и микромицетов, бактерий и дождевых червей.

## Роль низкомолекулярных тиолов при формировании эффективного и неэффективного бобово-ризобияльного симбиоза

Role of low-molecular-weight thiols during development of effective and ineffective legume-*Rhizobium* symbiosis

Иванова К.А., Цыганов В.Е.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной  
микробиологии. 196608, ш. Подбельского 3, Пушкин-8, Санкт-Петербург,  
Россия

+7 812 4761601, kirakosmonavt\_24@mail.ru

Аскорбат-глутатионовый цикл является одним из главных антиоксидантных механизмов в растениях и, в частности, в азотфиксирующем клубеньке бобовых, где многочисленные процессы способствуют продукции активных форм кислорода (АФК). Накоплено множество фактов, свидетельствующих об исключительной важности аскорбат-глутатионного цикла как для развития симбиотического взаимодействия, так и для процесса азотфиксации. Глутатион (GSH) – наиболее распространенный низкомолекулярный тиол в растениях. Он принимает участие в регуляции клеточного цикла, транспорте и хранении серы, в ответных реакциях на различные стрессы, включая атаку патогенов, и ряде других процессов. Восстановленный GSH непрерывно окисляется в клетках до глутатиона дисульфида (GSSG), который возвращается в исходную форму с помощью фермента НАДФН-зависимая глутатион редуктаза (GR). Соотношение [GSH : GSSG] влияет на окислительно-восстановительный статус, регулирующий многочисленные процессы в клетке. Некоторые из эффектов GSH связаны с его ролью в процессах сигнальной трансдукции, другие – с синтезом гормонов и вторичных метаболитов. У бобовых растений, структурно родственный трипептид гомоглутатион (hGSH) может частично или полностью замещать GSH. Существует положительная корреляция между активностью основного фермента биосинтеза азота – нитрогеназы и содержанием GSH и hGSH в клубеньках.

Для выявления пространственной локализации GSH, ферментов его синтеза ( $\gamma$ -глутамилцистеин синтетазы, глутатион синтетазы) и GR в тканях симбиотического клубенька гороха, были использованы исходная линия SGE и полученные на ее основе мутанты, блокированные на различных стадиях развития симбиотического клубенька. Во всех анализируемых генотипах GSH локализовался в клетках активной меристемы, проводящих пучках и в неинфицированных клетках паренхимы. В клубеньках исходной линии GSH присутствовал также в зонах инфекции и азотфиксации. В клубеньках мутанта по гену *sum40* (ортолог гена *Medicago truncatula* *EFD*, регулирующего работу негативного регулятора цитокининового ответа в клубеньках), характеризующихся гипертрофированными инфекционными каплями, локализация GSH также наблюдалась в инфицированных клетках. У мутанта



по гену *sym33* (ортолог генов *M. truncatula* *IPD3* и *Lotus japonicus* *CYCLOPS*, кодирующих ключевой транскрипционный фактор, активирующий процесс органогенеза клубенька) не наблюдается выход бактерий в цитоплазму растительных клеток из «запертых» суберенизированных инфекционных нитей. В таких инфекционных нитях сигнал был ассоциирован с находящимися в них бактериями. Если в отдельных клетках бактерии высвобождались из инфекционной капли, наблюдалось активное накопление GSH в клетках, содержащих бактериоиды. Во всех изученных вариантах наиболее интенсивный сигнал наблюдался вокруг ювенильных бактериоидов, что свидетельствует о важной роли GSH именно на стадии выхода бактерий из инфекционных капель в цитоплазму растительной клетки. Кроме того, GSH может принимать участие в защитных реакциях, активное проявление которых было показано для мутантов по генам *sym33* и *sym40*.

Ферменты синтеза и GR имели схожую с GSH пространственную локализацию, а наиболее интенсивный сигнал в клубеньках дикого типа наблюдался в зонах меристемы и азотфиксации. При этом, наблюдалось активное накопление в тканях клубенька GR. Можно предположить, что в эффективных азотфиксирующих клубеньках наибольшее значение имеет именно поддержание определенного окислительно-восстановительного статуса клеток, нежели синтез GSH *de novo*.

Была исследована экспрессия генов, кодирующих ферменты синтеза GSH и hGSH в клубеньках: *GSH1* ( $\gamma$ -глутамилцистеин синтетаза), *GSHS* (глутатион синтетаза) и *hGSHS* (гомоглутатион синтетаза). Наблюдалось значительное увеличение экспрессии гена *GSH1* по сравнению с исходной линией, у всех мутантных линий. При этом было показано, что наибольший уровень экспрессии гена *GSHS* характерен для мутанта по гену *sym40*, а гена *hGSHS* – для мутантов по гену *sym33*. Полученные данные позволяют предположить наличие не только различных регуляторных механизмов для генов *GSHS* и *hGSHS*, но и, вероятно, различных функций данных тиолов в клубеньках.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (14-04-00383).

Экологическая и микробиологическая характеристика штаммов эндофитных бактерий, выделенных из клубеньков фасоли

Ecological and microbiological characteristics of endophytic bacteria isolated from common bean nodules

Маркова О.В., Гарипова С.Р.

Башкирский государственный университет. Россия, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32

+7 347 273-67-34, o-ksana@list.ru, garipovasvetlana@gmail.com

Эндофитные бактерии – это таксономически разнообразная группа бактерий, обитающих во внутренних тканях растений и вместе с эктофитами составляющих микробиом растений. Эндофиты встречаются во всех тканях и органах, в том числе и в клубеньках бобовых растений. Экологическая роль эндофитных бактерий, по-видимому, аналогична ризосферному сообществу ассоциативных бактерий, многие из которых стимулируют рост и развитие растений, способны к азотфиксации, выступают индукторами устойчивости к фитопатогенам. Целью нашей работы являлось определение состава и свойств бактериальных ассоциаций, выделенных из клубеньков фасоли, которые могут служить основой биопрепаратов для повышения продуктивности и устойчивости растений. Задачи исследования: 1) скрининг природных бактериальных консорциумов из клубеньков фасоли по эффективности инокуляции разных сортов фасоли в полевых условиях; 2) таксономическая идентификация штаммов, составляющих эти консорциумы; 3) оценка антагонистической активности к *Fusarium oxysporum*, способности улучшать рост растений *in vitro* и продуцировать фитогормон-подобные вещества.

Первичный скрининг бактериальных изолятов клубеньков, перспективных для повышения устойчивости растений к фитопатогенам, осуществили методом посева биомассы поверхностно стерильных разрушенных клубеньков уколом на газоне тестовой культуры *Fusarium oxysporum*. Из 120 выделенных нами изолятов клубеньков фасоли 40 % бактериальных культур проявили антагонизм к возбудителю фузариозных корневых гнилей, однако только 8 % образовывали зоны подавления гриба более 3 мм. Для испытаний в полевых мелкоделяночных опытах были выбраны 4 коллекционных изолята, сохранивших в своем составе ризобии и обладавших хорошим ростом на бобовом агаре. По результатам инокуляции растений фасоли в 2007-2010 гг. на территории Северной и Южной лесостепной зон Южного Предуралья было обнаружено, что ответная реакция растений фасоли на инокуляцию семян ассоциациями эндофитных бактерий в значительной степени зависела от сорта растений. Обработка в 2008 и 2010 гг. французского сорта Эльза отобранными бактериальными культурами Ф2, Ф4, Ф5 и Ф6 не привела к повышению продуктивности семян, тогда как сорта местной селекции Уфимская и Золотистая были более отзывчивы. В 2007 на серой лесной почве инокуляция сорта Золотистая ассоциациями Ф5, Ф4 и Ф6 способствовала увеличению массы семян соответственно на 15, 20 и 26% по сравнению с контролем без инокуляции и по сравнению с эталонным штаммом *Rhizobium leguminosarum*

*bv. phaseoli* 2630 (ВНИИСХМ). В 2008 г. на черноземе прибавка семенной продуктивности сорта Золотистая при инокуляции ассоциацией Ф4 и эталонным штаммом составила 28 и 22% соответственно, а на серой лесной почве для сорта Уфимская обработка ассоциацией Ф5 обеспечила увеличение массы семян на 29 % по сравнению в неинокулированным контролем. В 2009 г. максимальная семенная продуктивность 168% от контроля была достигнута при обработке сорта Золотистая ассоциацией Ф6, в то же время обработка ассоциацией Ф4 и эталонным штаммом дала увеличение продуктивности 132 и 139 %. В разделенных ассоциациях лучший результат показал изолят Ф52, который в 2009 г. способствовал увеличению массы семян на 78 % от контроля без инокуляции и на 33 % по сравнению с инокуляцией эталонным штаммом. Из изолята Ф52 был в дальнейшем выделен штамм 522, обеспечивший двукратное увеличение количества и массы бобов у растений сорта Уфимская в 2010 г. Однако этот эффект наблюдался только в опыте с поливом, без которого на двух других участках в крайне засушливых условиях 2010 г. влияние инокуляции оказалось неэффективным во всех вариантах инокуляции.

Для определения видового состава изученных ассоциаций были изучены морфолого-культуральные, физиолого-биохимические и генетические свойства штаммов. Результаты этих исследований показали, что каждая ассоциация состояла из 2-5 штаммов, принадлежащих к видам *Rhizobium leguminosarum sp.* (420, 530a, 621), *Bacillus megaterium* (411, 412, 413, 511, 512, 521, 610, 622), *Bacillus subtilis* (522) и *Bacillus psychrodurans* 5306. При взаимодействии изолированных штаммов с растениями в опытах *in vitro* был обнаружен стимулирующий эффект, улучшающий в 1,2-2,8 раз рост корней и побега инокулированных растений, который зависел от плотности клеток в инокулюме, стадии роста микробной культуры и от генотипа растения-хозяина. Методом биотестов была определена способность бактерий продуцировать цитокинин-подобные вещества. Все исследуемые штаммы проявляли нейтраллизм к *Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli* 2630 и слабую фунгистатическую активность к *Fusarium oxysporum*.

Результаты лабораторных и полевых экспериментов в целом показали, что бактериальные эндофиты клубеньков имеют потенциал для применения в качестве основы биопрепаратов для растениеводства.

Анализ экспрессии маркерных «генов старения» и локализации гиббереллинов в симбиотических клубеньках гороха (*Pisum sativum* L.)

Analysis of expression of marker “senescence genes” and localization of gibberellins in pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodules

Серова Т.А., Цыганов В.Е.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Российской академии наук, 196608, ш. Подбельского, 3, г.

Пушкин 8, г. Санкт-Петербург, Россия

+7 812 476-16-01, t\_serova@rambler.ru

Исследование старения азотфиксирующих клубеньков представляет большой интерес вследствие актуальности создания сортов бобовых растений с увеличенным периодом активной фиксации азота. Это могло бы оказать положительный эффект на насыщение почвы биологическим азотом и повышение урожайности возделываемых культур при ограничении доз химических удобрений.

В работе была использована серия симбиотических мутантов гороха (*Pisum sativum* L.), полученных на основе родительской линии SGE. Линия SGEFix<sup>-1</sup> (*sym40*), характеризуется формированием гипертрофированных инфекционных нитей и капель, следствием чего является массовый выход бактерий и нарушения в дифференцировке бактериоидов; мутанты SGEFix<sup>-3</sup> (*sym26*) и SGEFix<sup>-7</sup> (*sym27*) блокированы на стадии поддержания структурной и функциональной стабильности клубенька. Исследуемые мутантные линии характеризуются преждевременной деградацией симбиотических структур – преждевременным старением клубеньков.

В качестве маркерных «генов старения» были выбраны гены цистеиновых протеаз (*PsCyp1*, *PsCyp15a*) и тиоловой протеазы (*PsTPP*), продукты которых участвуют в масштабной деградации белка; ген фактора транскрипции bZIP (*PsATB2*), экспрессия ортолога которого повышается у *Medicago truncatula* в ходе старения клубенька; ген гиббереллин 2-β-оксидазы (*PsGAOx2*), деактивирующей гиббереллиновую кислоту; гены 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат синтетазы и оксидазы (*PsACS2*, *PsACO1*), кодирующие ферменты синтеза этилена; ген альдегид оксидазы 3 (*PsAO3*), продуктом которого является фермент синтеза абсцизовой кислоты.

С помощью ПЦР в режиме реального времени было показано повышение экспрессии выбранных «генов старения» с увеличением возраста клубеньков родительской и мутантных линий гороха. В рано стареющих клубеньках мутантов на четвертой неделе после инокуляции, когда наблюдается пик азотфиксации у исходной линии, уровень транскриптов анализируемых генов был значительно выше по сравнению с родительской линией SGE, уровень мРНК «генов старения» в которой значительно повышался только к шестой неделе развития клубеньков. Уровень экспрессии генов *PsCyp1*, *PsCyp15a*,

симбиотические отношения растений с бактериями и грибами

*PsAO3*, *PsACS2* и *PsACO1* был выше в мутантных линиях SGEFix<sup>-1</sup> (*sym40*) и SGEFix<sup>-7</sup> (*sym27*) по сравнению с SGEFix<sup>-3</sup> (*sym26*).

Для выявления тканевой и клеточной специфичности был проведен анализ экспрессии маркерных «генов старения» в инфицированных клетках с признаками старения и без таковых. С помощью лазерной микродиссекции были вырезаны инфицированные клетки зоны азотфиксации 2-х и 4-х недельных клубеньков, а также инфицированные клетки зоны старения 4-х недельных клубеньков линии SGE. Было показано повышение уровня экспрессии *PsCyp15a*, *PsTPP*, *PsATB2*, *PsGAOx2*, *PsAO3* и *PsACO1* генов с увеличением степени деградации клеток клубенька. При этом транскрипты *PsCyp1* гена не были детектированы, а содержание мРНК гена фермента синтеза предшественника этилена (*PsACS2*) снижалось при старении клеток симбиотического клубенька.

С помощью лазерной конфокальной микроскопии была также проведена иммулокализация гиббереллиновой кислоты в клубеньках анализируемых генотипов. При этом наблюдалось снижение сигнала в зоне старения у клубеньков родительской и мутантных линий гороха.

Таким образом, была показана позитивная регуляция процесса старения симбиотического клубенька гороха этиленом, абсцизовой кислотой и транскрипционным фактором bZIP, активная роль в старении цистеиновых и тиоловой протеаз, а также возможная негативная регуляция процесса старения гиббереллинами.

Работа поддержана грантом Российского фонда научных исследователей (14-24-00135).

## Развитие инфекционной нити в зрелом симбиотическом клубеньке

### Infection thread development in mature symbiotic nodule

Цыганова А.В.<sup>1</sup>, Иванова К.А.<sup>1</sup>, Бревин Н.<sup>2</sup>, Цыганов В.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Российской академии наук, 196608, ш. Подбельского, 3, г. Пушкин 8, г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Центр Джона Иннеса, NR4 7UH, Норвич, Великобритания

+7 812 476-16-01, isaakij@mail.ru

Развитие бобово-ризобияльного симбиоза представляет собой совокупность двух процессов – инвазию клеток растения-хозяина и морфогенез клубенька. Колонизация клеток хозяина ризобиями происходит в результате формирования межклеточной туннелеподобной структуры, называемой инфекционной нитью, которая растет через цитоплазму в результате перераспределения материала первичной клеточной стенки.

Стенка инфекционной нити является продолжением растительной клеточной стенки, содержащей различные виды пектинов, ксилоглюканы и целлюлозу. В ответ на ризобияльную инфекцию клетки хозяина синтезируют несколько новых компонентов, которые модифицируют свойства клеточной стенки и матрикса инфекционной нити. Одним из важнейших компонентов являются арабиногалактан протеины (АГП) (богатые гидроксипролином гликопротеины). Структурные характеристики этих гликопротеинов предполагают, что они могут служить регуляторами перехода матрикса из жидкого состояния в твердое по мере роста инфекционной нити. При проведении иммуноцитохимического анализа АГП в симбиотических клубеньках гороха различных мутантных генотипов были выявлены нарушенная секреция АГП у мутанта по гену *sum40* и снижение количества АГП до его полного отсутствия в просвете инфекционных нитей у мутанта по гену *sum33*, что может коррелировать с аномальным ростом инфекционных нитей в первом случае и отсутствием выхода ризобий в цитоплазму клеток растения-хозяина во втором.

Растяжимость инфекционной нити, вероятно, контролируется перекисным перекрестным связыванием белков, а также, возможно, модификацией пектинового матрикса. Наличие активных форм кислорода, включая перекись водорода, определяется в просвете инфекционной нити. Индуцированное перекисью водорода перекрестное связывание различных компонентов стенки инфекционной нити и матрикса может объяснить, почему инфекционные нити подвергаются прогрессивному отвердеванию и становятся устойчивыми к действию ферментов, разлагающих клеточные стенки. При проведении цитохимического анализа перекиси водорода, определяемой преципитацией хлорида церия, были обнаружены различия в ее распределении в симбиотических клубеньках гороха различных мутантных генотипов. Так у мутанта по гену *sum40* содержание перекиси водорода увеличивалось в

матрикс гипертрофированных инфекционных капель, а также вокруг ювенильных бактериоидов, что свидетельствует о более сильном окислительном стрессе по сравнению с исходной линией в клетках клубеньков данного мутанта. У мутанта по гену *sum42* содержание перекиси водорода увеличивалось в клеточных стенках и стенках инфекционной нити. Напротив, у мутанта по гену *sum33* содержание перекиси водорода было снижено. Она определялась в ассоциации с бактериями в просвете инфекционной нити и в виде крупных капель на внешней поверхности стенки инфекционной нити.

Ризобияльная инфекция, так же, как и патогенная, вызывает индукцию защитных реакций, но при этом защитные реакции, возникающие при симбиотическом взаимодействии, менее выражены. Однако, неэффективное взаимодействие между растением и ризобиями в результате мутации как макро-, так и микросимбионта может приводить к развитию сильных защитных реакций. При проведении цитохимического и иммуноцитохимического анализа было выявлено, что мутации в симбиотических генах *sum33* и *sum40* приводят к отложению суберина в неэффективных клубеньках, а у мутанта по гену *sum42* в клеточных стенках и стенках инфекционных нитей откладывается каллоза. Кроме того, у мутантов по генам *sum33* и *sum42* наблюдается увеличение содержания дезэтерифицированного пектина в стенках инфекционных нитей, а в случае мутанта по гену *sum42* наблюдается инкапсулирование симбиосом тонкой пектиновой стенкой, обнаруживаемой с помощью моноклонального антитела JIM5.

Эти результаты показывают, что молекулярная композиция стенки инфекционных нитей в зрелых клубеньках очень лабильна и ее перестройка является интегральной и динамической частью развития инфекционных нитей в зрелом симбиотическом клубеньке.

Работа поддержана грантом РФ (16-16-10035).

Функциональное взаимодействие автотрофного и гетеротрофного компонентов лишайников как устойчивой симбиотической системы при действии стресс факторов

Functional interaction between autotrophic and heterotrophic components of symbiotic lichen system under stress

Шелякин М.А., Захожий И.Г., Головкин Г.К.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, 167982, ул. Коммунистическая, 28, г. Сыктывкар, Россия

+7 8212 24-96-87, +7 8212 24-01-63, [shelyakin@ib.komisc.ru](mailto:shelyakin@ib.komisc.ru)

Лишайники – устойчивая ассоциация гетеротрофного организма (микобионта) и фотосинтезирующего организма (фотобионта). Таллом (слоевище) лишайников представляет собой сплетение грибных гиф, куда интегрированы клетки фотобионта (зеленые водоросли и/или цианобактерии). В талломе лишайников доминирует микобионт. На долю фотобионта, роль которого считается ключевой в обеспечении существования всей ассоциации, приходится не более 10% биомассы таллома. Лишайники довольно хорошо изучены с точки зрения структурных и трофических взаимодействий клеток фото- и микобионта. Показаны изменения в структуре клеточных стенок компонентов лишайников при совместном существовании. Установлено, что зеленые водоросли поставляют клеткам микобионта сахароспирты, тогда как цианобактерии – глюкозу и продукты биологической азотфиксации. Считают, что микобионт способен оказывать воздействие на фотобионт, стимулируя синтез и выделение продуктов ассимиляции углерода. Исследованы некоторые молекулярно-генетические аспекты образования симбиоза. Известно, что на ранних стадиях его развития в грибном компоненте происходит усиление экспрессии генов ферментов, активность которых ингибируется глюкозой (оксидоредуктазы, диоксигеназы), а в клетках водорослей наблюдается активация генов белков, подобных хитиназам и белков, ответственных за метаболизм аминокислот аргинина и динамина.

Лишайники способны существовать в крайних условиях и быстро восстанавливать свои функции после десикации, замораживания и других неблагоприятных воздействий, вызывающих гибель других организмов. Полагают, что основу устойчивости лишайников составляют конститутивные механизмы защиты, а также способность клеток фотобионта предотвращать развитие окислительного стресса путем рассеивания избытка поглощенной энергии с участием каротиноидов виолаксантинового цикла и/или через изменение конформации белков реакционного центра фотосистем. Немаловажную роль играют синтезируемые микобионтом продукты вторичного метаболизма. Однако мало что известно о взаимодействии компонентов лишайниковой ассоциации при формировании реакций на внешние воздействия. Мы исследовали изменение функционального состояния фото- и микобионта лишайников под действием высоких и низких температур, УФ–радиации и загрязнения среды бокситовой пылью с высоким



содержанием алюминия и тяжелых металлов. Для этого использовали показатели фотосинтеза и дыхания, характеризующие биоэнергетику компонентов таллома.

Выявили, что стрессовые воздействия приводили к усилению процессов нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла и снижали фотохимическую активность фотосинтетического аппарата фотобионта. Нефотохимическое тушение, связанное с процессами ответственными за преобразование в тепло части поглощенной световой энергии, способствует предотвращению образования значительных количеств АФК, вызывающих деструкцию биомолекул и клеточных структур. В то же время усиленное образование АФК в фотосинтетической ЭТЦ может служить сигналом к активации защитных механизмов фото- и микобионта, что сопровождалось изменением дыхания и вовлечением альтернативного энергетически малоэффективного пути (АП). По нашему мнению, эти изменения носят защитно-приспособительный характер и в значительной степени связаны с микобионтом. Из литературы известно, что АП дыхания присущ грибам, но в отличие от растений альтернативная оксидаза грибов не образует димерную форму. Смещение дыхания микобионта в сторону энергетически диссипирующего АП, с одной стороны, может способствовать снижению генерации АФК в дыхательной ЭТЦ, с другой, обеспечивать поддержание высокой скорости работы цикла Кребса, продукты которого необходимы для образования лишайниковых веществ. Лишайниковые вещества, содержание которых составляет в среднем 5-10%, но может достигать 20% массы таллома, синтезируются грибом и откладываются на поверхности гиф верхнего корового слоя, экранируя и защищая фотобионт от губительного действия избыточного света и УФ-радиации. Изменения в метаболизме гетеротрофного компонента способствуют сохранению фотобионта, определяющего автотрофный характер всей ассоциации.

Проведенные исследования – важный шаг для дальнейшего выявления механизмов устойчивости лишайников к факторам среды и установления сигнальных путей взаимодействия компонентов симбиотической системы.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН по направлению «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» (проект 15-12-4-4).

Развитие арбускулярной микоризы у не формирующих клубеньки мутантов гороха по генам – предполагаемым ортологам генов транскрипционных факторов NSP1 и NSP2

Arbuscular mycorrhiza development in non-nodulating pea mutants impaired in genes, which are putative orthologs of genes encoding for the transcription factors NSP1 and NSP2

Штарк О.Ю.<sup>1</sup>, Федорина Я.В.<sup>1</sup>, Сулима А.С.<sup>1</sup>, Жернаков А.И.<sup>1</sup>, Клюкова М.С.<sup>1,2</sup>, Хайруллина М.М.<sup>2</sup>, Пинаев А.Г.<sup>1</sup>, Тихонович И.А.<sup>1,2</sup>, Жуков В.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, ш. Подбельского, д. 3, г. Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

+7 812 470-51-83, +7 812 470-43-62, oshtark@yandex.ru

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Университетская наб., д. 7-9, Санкт-Петербург, Россия

+7 812 328-08-52

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) образует мутуалистические эндосимбиозы, такие как арбускулярная микориза (АМ) с грибами фило *Glomeromycota* и азотфиксирующие клубеньки с бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Оба симбиоза улучшают снабжение растения питательными элементами, повышают его устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, способствуют повышению урожая и качества продукции растениеводства. У бобовых растений рецепция сигналов гриба или бактерии приводит к запуску общих и специфических симбиотических сигнальных путей, находящихся под контролем симбиотических генов растения (*SYM*-генов). Считается, что в процессе эволюции клубенька бобовых многие *SYM*-гены были заимствованы из более древней программы развития АМ. В то же время для многих *SYM*-генов гороха, контролирующих развитие клубенька, до сих пор не определена их роль в развитии АМ. Биохимическая функция большинства *SYM*-генов гороха не известна.

В данном исследовании проведен анализ развития экстрарадикального и интрадикального мицелия у не образующих клубеньки мутантов гороха по генам *SYM7* и *SYM34* на ранних этапах колонизации грибом *Rhizophagus irregularis*. Установлено, что оба гена необходимы для развития АМ у гороха. Мутация в гене *SYM7* (предполагаемый ортолог гена *NSP2*, ‘nodulation signaling pathway 2’) приводила к значительному повышению уровня развития экстрарадикального мицелия и существенному снижению уровня развития интрадикального мицелия, по сравнению с исходной линией Sparkle. Также продемонстрировано, что ген *SYM7* важен для развития арбускул. Напротив, растения с мутацией в гене *SYM34* демонстрировали существенно пониженный уровень развития экстрарадикального мицелия; кроме того, они отличались значительным снижением внутренней колонизации через 10 дней культивирования, однако к 20-му дню не отличались от растений исходной

линии Finale. Описанный микоризный фенотип позволил предположить, что ген гороха *SYM34* является ортологом гена *NSP1* ('nodulation signaling pathway 1').

Было произведено секвенирование последовательности, гомологичной последовательности гена *Medicago truncatula* (*Mt*) *NSP1*, которая была выявлена в клубенек-специфичном транскриптом гороха, у двух мутантов по гену *SYM34*, и выявлены ранние стоп-кодоны в данной последовательности. Дополнительно гипотеза о гомологии генов *SYM34* и *MtNSP1* была подтверждена с помощью косегрегационного анализа.

Известно, что гены *NSP1* и *NSP2* кодируют взаимодействующие друг с другом транскрипционные факторы GRAS-семейства, необходимые для развития азотфиксирующего клубенька. Недавно было установлено, что эти гены также вовлечены в формирование АМ. Кроме того, известно, что оба гена участвуют в активации биосинтеза стриголактонов (стимуляторов роста грибных гиф), а ген *NSP2* – в активации биосинтеза мономеров кутина (стимуляторов формирования структур прикрепления АМ-гриба – гифоподиев). С учетом вышеизложенного, предложено возможное объяснение различий в микоризных фенотипах мутантов *sym34* (= *Psnspl1*) и *sym7* (= *Psnspl2*). Результаты данной работы дают направление для проведения дальнейших исследований, которые позволят выявить специфическую роль стриголактонов и мономеров кутина в развитии АМ у гороха посевного.

Работа поддержана грантом СПбГУ (1.37.534.2016), а также грантами РФФИ (14-24-00135 и 16-16-00118) и РФФИ (14-04-01442, 15-29-02737, и 16-04-01859).

Симбиотические отношения *Medicago lupulina* с грибами арбускулярной микоризы

Symbiotic interactions between *Medicago lupulina* and arbuscular mycorrhizal fungi

Юрков А.П.<sup>1,2,5</sup>, Якоби Л.М.<sup>1</sup>, Степанова Г.В.<sup>3</sup>, Веселова С.В.<sup>4</sup>, Шишова М.Ф.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии” (ВНИИСХМ), 196608, ш. Подбельского, д. 3, г. Санкт-Петербург – г. Пушкин, Россия

+7 962 7001443, +7 812 4704362, yurkovandrey@yandex.ru

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Российский государственный гидрометеорологический университет” (РГГМУ), 195196, Малоохтинский пр., д. 98, г. Санкт-Петербург, Россия

+7 812 3725087

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский институт кормов им. В.Р. Вильямса” (ВНИИ кормов), 141055, Московская область, Научный городок, корпус 1, г. Лобня, Россия

+7 495 5777251

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук (ИБГ УНЦ РАН), 450054, Проспект Октября, 71, г. Уфа, Россия

+7 347 2356088

<sup>5</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Санкт-Петербургский государственный университет” (СПбГУ), 199034, Университетская наб., 7-9, г. Санкт-Петербург, Россия

+7 812 3289695

Арбускулярная микориза (АМ) представляет собой один из наиболее распространенных симбиозов между растениями (92% семейств вступают в АМ) и грибами отдела Glomeromycota. Известно стимулирующее действие АМ-грибов на рост и развитие растений, адаптацию растений к стресс-факторам биотической и абиотической природы. В связи с этим актуальным направлением исследований является изучение механизмов, контролируемых формированием и развитием эффективного АМ-симбиоза. Для исследования симбиотических отношений в АМ разработана модельная система, в которой в качестве модельного растения используется сильно микотрофная (облигатно микотрофная в условиях низкого уровня доступного фосфора в почве) линия MIS-1 люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L. var. *vulgaris* Koch). Изучена симбиотическая эффективность 25 штаммов АМ-грибов в условиях

низкого уровня доступного для питания растений фосфора (P) в почве (3,5 мг P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> на 100 г почвы) и при внесении фосфорного удобрения (+3,5 мг P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> на 100 г почвы). Анализ показателей проведен на 45 сут от посадки и инокуляции люцерны одновозрастными инокулятами АМ-грибов. Показан существенный полиморфизм АМ-грибов по симбиотической эффективности на люцерне в условиях низкого уровня P в почве. По результатам эксперимента выделены контрастные по симбиотической эффективности группы АМ-грибов, проведен корреляционный и кластерный анализ полученных данных, ведется идентификация АМ-грибов до вида с применением анализа морфологии спор и молекулярно-генетических методов. В 2015 году проведено новое обследование участков леса, пашни и луга в 3 регионах Европейской территории России: поставлены 35, 42 и 21 накопительная культура АМ-грибов, выделенных из почв и корней идентифицированных видов растений Ленинградской, Московской и Ростовской области, соответственно. Определен тип и проведен агрохимический анализ 9 образцов почв исследуемых территорий, обилие спор АМ-грибов в гумусовом горизонте.

Проведен сравнительный анализ уровня фитогормонов, таких как зеатин, зеатин рибозид, индолилуксусная (ИУК) и абсцизовая (АБК) кислоты, в корнях и листьях линии MIS-1 *M. lupulina* без инокуляции грибом и при микоризации эффективным штаммом RCAM00320 ранее называемым шт. №8 гриба *Rhizophagus irregularis*. Оценка выполнена в фазы: проростка, первого, второго настоящего листа, стеблевания и цветения. По результатам экспериментов показано, что, начиная с фазы первого настоящего листа и стеблевания, АМ-растения характеризуются более высоким содержанием цитокининов в корнях и листьях, соответственно, в сравнении с растениями без АМ. Содержание ИУК в корнях и листьях АМ-растений против растений без АМ было выше (в 2,2 и 1,8 раза, соответственно), начиная с фазы первого и второго листа, соответственно. Содержание АБК в листьях растений без АМ существенно не меняется в процессе онтогенеза, но в листьях АМ-растений оно возрастает в фазу цветения (в 1,7 раза в сравнении содержанием в фазу стеблевания). Содержание АБК в корнях как растений без АМ, так и в АМ-растениях снижается вплоть до фазы цветения, когда оно существенно возрастало (в 2,2 и 8,1 раза, соответственно). Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-29-02753 офи\_м, гранта СПбГУ 1.37.534.2016 и с использованием оборудования РЦ “Развитие молекулярных и клеточных технологий” СПбГУ (проект №109-98) и оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ВНИИСХМ.

## Стендовые доклады

### Влияние условий культивирования на эффективность функционирования ассоциации картофеля с азоспириллами *in vitro*

Effect of cultivation conditions on the efficiency of the potato–  
*Azospirillum* association *in vitro*

Бойкова Н.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», 410012, Театральная пл.,1, г. Саратов. Россия

+7 8452 23-46-97, +7 8452 234781, n.boikova.ya@yandex.ru

Ризосферные бактерии, в том числе бактерии рода *Azospirillum*, в естественных условиях *in vivo* могут оказывать положительное влияние на рост и развитие растений. Предварительные данные показывают, что азоспириллы способны активизировать рост микроклонов картофеля в модельных условиях, при этом влияние условий совместного культивирования *in vitro* растений и бактерий на эффективность ассоциации детально не исследовалось.

Цель данного исследования – подбор условий для создания активно функционирующей ассоциации микроклонов картофеля сорта Кондор с бактериями *Azospirillum brasilense* Sp245 в культуре *in vitro* как инструмента совершенствования технологии микроклонального размножения растений.

Микрорастения картофеля, выращенные в культуре *in vitro*, разделяли на микрочеренки с одним листом и пазушной почкой и помещали в пробирку с питательной средой. В эксперименте использовали несколько вариантов питательной среды Мурасиге-Скуга (МС) без гормонов: 1) с полным составом солей по прописи МС, 2) с уменьшенным в 2 раза содержанием солей по прописи МС, 3) без источника/соединений азота в составе солей по прописи МС. Каждый из вариантов использовали в трех комбинациях: а) жидкая среда без агар-агара, б) полужидкая среда с содержанием агар-агара 3,5 г/л и в) твердая среда с содержанием агар-агара 7 г/л. Суспензию бактерий ( $10^8$  кл/мл) вносили по 0,1 мл в пробирки с 10 мл питательной среды при микрочеренковании растений с таким расчетом, чтобы конечная концентрация бактерий в среде составила  $10^6$  кл/мл раствора. Контролем служили пробирки со стерильными микрорастениями.

По результатам проведенных исследований установлено, что при определенных условиях в культуре *in vitro* возможно формирование эффективного растительно-микробного ассоциативного комплекса между микрорастениями картофеля и бактериями *Azospirillum brasilense* Sp245. Оптимальными условиями для проявления ростстимулирующей для растений активности бактериальной культуры является полужидкая питательная среда с содержанием агар-агара 3,5 г/л и полным составом солей по прописи Мурасиге-Скуга.

При совместном выращивании микрорастений в полужидкой агаризованной среде с бактериями, внесенными в момент черенкования в концентрации  $10^6$  кл/мл, в условиях достаточного и оптимального питания наблюдается стимулирование их роста: в первую очередь увеличение длины побега (в среднем на 40%), а также количества корней (в среднем на 36%).

Отмечено, что стимулирующий эффект не может быть связан с улучшением азотного питания растений за счет фиксации атмосферного азота азоспириллами, поскольку на безазотистой среде рост растений существенно угнетался независимо от присутствия бактерий. Вероятно, в условиях культивирования *in vitro* бактериии *A. brasilense* Sp245 не способны обеспечить фиксацию атмосферного азота на уровне, необходимом для развития микрорастений картофеля. В то же время в оптимальных условиях питания они стимулируют рост побегов предположительно за счет синтеза фитогормонов ауксинового и гиббереллинового ряда.

В результате исследования разработана методика получения активно функционирующей ассоциации картофеля с ростстимулирующими ризобактериями штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 при микроклональном размножении растений в культуре *in vitro*.

Полученные результаты создают основу для дальнейшей стандартизации процедур создания ассоциаций растений с ростстимулирующими бактериями в целях совершенствования технологии микроклонального размножения растений *in vitro* с последующей адаптацией их к условиям *ex vitro*.

Работа выполнена при поддержке грантом РФФИ № 16-34-00720.

## Влияние эпифитных УФ–В толерантных микроорганизмов на устойчивость растений ячменя к стрессовому облучению УФ–В радиацией и дефициту почвенной влаги

Influence of epiphytic UV–B tolerant microorganisms on the barley resistance to the UV–B stress and soil moisture deficiency

Борцова О.А., Кудрявцев Д.В., Галушко А.С., Пономарева Л.В., Цветкова Н.П., Вертебный В.Е., Хомяков Ю.В., Панова Г.Г.

ФГБНУ «Агрофизический научно-исследовательский институт»  
Гражданский пр., д. 14, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
+7 812 535-79-09, +7 812 534-19-00, raes@agrophys.ru

Проблема повышения устойчивости агроэкосистем к действию возникающих при глобальном изменении климата стрессовых факторов, в том числе к повышенному уровню УФ–В радиации, весьма актуальна в настоящее время. Одним из путей ее решения является разработка и широкое применение высокоэффективных экологически безопасных биопрепаратов с фитопротекторными и адаптогенными свойствами. На сегодняшний день в литературе имеется мало сведений о реакции ассоциированного с растением микробного сообщества на облучение УФ–В радиацией и о влиянии микроорганизмов на устойчивость растений к этому стрессору, что подчеркивает актуальность проведения исследований в данном направлении. Нами было проведено выделение чистых культур эпифитных аэробных гетеротрофных микроорганизмов, толерантных к УФ–В радиации (доза 3 кДж/м<sup>2</sup>), и изучено их влияние на устойчивость растений к действию стрессовых факторов (УФ–В радиация, дефицит почвенной влаги).

Выделение и отбор УФ–В толерантных штаммов эпифитных бактерий осуществляли с листьев растений ячменя сорта Белогорский после однократного облучения их УФ–В радиацией (доза - 5 кДж/м<sup>2</sup>). Сильнопигментированные штаммы бактерий являлись наиболее резистентными к УФ–В облучению. Эти штаммы бактерий обладали способностью к продуцированию стимуляторов роста растений. Так, замачивание семян ячменя в растворах культуральных жидкостей с биомассой микроорганизмов или без нее стимулировало прорастание семян ячменя, а в листьях его проростков способствовало увеличению синтеза фотосинтетических пигментов хлорофиллов и каротиноидов, обеспечивало повышение стабильности содержания хлорофиллов, оцениваемой после срезки листьев.

При использовании культуральной жидкости с биомассой микроорганизмов или без нее для некорневой обработки растений ячменя наряду со стимуляцией роста надземной массы растений отмечали и повышение устойчивости растений к стрессовому воздействию УФ–В радиацией и/или дефицита почвенной влаги. Результирующим эффектом положительного влияния некорневой обработки ячменя указанными растворами на рост, развитие, метаболизм растений явилось существенное повышение зерновой



продуктивности и полное нивелирование негативного влияния стрессовых факторов на данный показатель относительно контроля.

Таким образом, эпифитные микроорганизмы с более высокой толерантностью к УФ–В радиации обладали способностью к повышению устойчивости растений ячменя к действию таких стрессовых факторов, как высокоинтенсивная УФ-В радиация и дефицит почвенной влаги, наряду с этим, стимулировали рост, развитие и продуктивность растений.

Выделенные штаммы микроорганизмов являются весьма ценным материалом для создания экологически безопасных высокоэффективных биопрепаратов с фитопротекторными, адаптогенными и ростстимулирующими функциями, предназначенных для повышения устойчивости агроэкосистем в условиях глобального изменения климата.

## Долговременное сохранение растительного материала в криобанке института Физиологии растений Российской Академии Наук

Long-term preservation of plant material in Cryobank of Plant Physiology Institute of the Russian Academy of Sciences

Высоцкая О.Н., Никишина Т.В., Балекин А.Ю., Спринчану Е.К., Соловьёва А.И., Волкова Л.А., Урманцева В.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35, Россия

+7 499 977-93-63, +7 499 977-80-18, [cryo\\_ippras@mail.ru](mailto:cryo_ippras@mail.ru)

В стенах Института физиологии растений по инициативе Раисы Георгиевны Бутенко более трёх десятилетий тому назад Александром Сергеевичем Поповым был основан криобанк растений. За прошедшие годы научных исследований были разработаны и запатентованы оригинальные методы криосохранения, которые были использованы для формирования криоколлекций культивируемого *in vitro* растительного материала. В настоящее время в ИФР РАН в жидком азоте сохраняют образцы четырёх специализированных коллекций растительного материала. В первой из них сохраняют штаммы суспензионных культур клеток растений, во второй – меристематические апексы, изолированные из растений культивированных *in vitro*, а в третьей - семена орхидей (более 130 видов). Образцы семян четвертой коллекции были помещены в жидкий азот Валентиной Львовной Тихоновой (ГБС РАН) в конце 20 века и принадлежат 49 семействам высших растений и 227 видам. Многие из растений, которые сохраняют в криобанке ИФР РАН, имеют статус редких и исчезающих видов, занесенных в списки СИТЕС и Красные Книги, в том числе в Красную книгу СССР и Красную Книгу Российской Федерации.

Без сомнения пополнение криобанка ИФР РАН и описание коллекционных образцов это важнейшая часть нашей работы. Однако не менее важными

#### С-4. Микробиота растений

являются исследования влияния длительного криосохранения на растительный материал. Первые образцы криобанка ИФР РАН были помещены в жидкий азот более трёх десятилетий тому назад. После 25 лет криогенного хранения из клеток моркови посевной получен активно растущий каллус. Пролиферация клеток люцерны (*Medicago sativa* L.) была восстановлена после 27 летнего криогенного хранения. Из апексов малины (*Rubus idaeus* L.) и земляники (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) восстановили рост после 10-18 лет хранения в жидком азоте. Семена язвенника обыкновенного (*Anthyllis vulneraria* L.) из коллекции ГБС РАН после 17 лет криогенного сна сохранили свою всхожесть и энергию прорастания на высоком уровне (90% семян проросли за 72 часа в условиях *in vitro*). Таким образом показано, что ценнейшие образцы криобанка ИФР РАН, принадлежащие к различным систематическим группам растений, могут быть использованы при изучении влияния длительного хранения в жидком азоте на жизнеспособность растительного материала.

Другим важнейшим направлением наших исследований является экспериментальное сравнение эффективности методов, которые мы применяем для долговременного криосохранения растительного материала культивируемого *in vitro*. Было показано, что апексы земляники (*Fragaria* L.), замороженные с помощью патентованного метода воздушной дегидратации № 2302107 (РФ), как правило, восстанавливают свой рост быстрее, чем апексы, замороженные патентованным методом медленного охлаждения № 2220563 (РФ). Усовершенствованный метод криосохранения, разработанный для меристематических верхушек земляники и использованный для формирования криоколлекции из 50 сортов этой культуры, был адаптирован для криогенного замораживания верхушек побегов клонированных *in vitro* растений других видов: рябины, малины красной, ежевики, а также для каллусных тканей яровой пшеницы.

Особое место в криобанке ИФР РАН занимает первая и крупнейшая в Российской Федерации криоколлекция орхидей, где собраны семена многочисленных видов редких растений из различных климатических зон и континентов. Многие виды, сохраняемые в этой коллекции, нуждаются в особых мерах охраны и занесены в I и II приложения СИТЕС и Красную Книгу Российской Федерации. Некоторые образцы семян этой коллекции сохраняют в жидком азоте уже более 15 лет. Тестовая проверка всхожести семян орхидей *in vitro* после долговременного (6-12 лет) хранения в жидком азоте показала, что этот показатель существенно не изменился у 9 видов тропических орхидей.

Наш опыт экспериментальной работы с растительным материалом различного качества и происхождения показал, что после долговременного криогенного сохранения криоустойчивые образцы криобанка ИФР РАН, которые имели до замораживания высокую жизнеспособность, могут успешно восстанавливать свой рост и развитие.

Работа по формированию криобанка ИФР РАН последние годы была поддержана Программами фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа», «Биологическое разнообразие».

## Ответная реакция растений на введение в среду культивирования гликозилированных флагеллинов рост-стимулирующих ризобактерий

Plant response to the introduction of glycosylated flagellins of plant-growth-promoting rhizobacteria into the cultivation medium

Евсеева Н.В.<sup>1</sup>, Ткаченко О.В.<sup>2</sup>, Филиппчева Ю.А.<sup>1</sup>, Костина Е.Е.<sup>2</sup>, Каргаполова К.Ю.<sup>2</sup>, Бурыгин Г.Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, 410049 пр. Энтузиастов, 13; г. Саратов; Россия

+7 8452 97-04-74, +7 8452 97-04-44, [evseeva\\_n@ibppm.ru](mailto:evseeva_n@ibppm.ru)

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», 410012, Театральная пл., 1, г. Саратов; Россия

+7 8452 23-46-97, +7 8452 234781, [oktkachenko@yandex.ru](mailto:oktkachenko@yandex.ru)

Рост и развитие растений в природе происходит в среде, сформированной и обильно заселённой бактериями. При этом растения обладают системами поддержания гомеостаза и сдерживания бактериальной колонизации их внутренних тканей. Одними из бактериальных молекул, вызывающих каскад защитных биохимических реакций у растений, являются флагеллины – структурные белки, формирующие филамент жгутиков подвижных микроорганизмов. Взаимодействие бактериальных флагеллинов со специфическими растительными рецепторами (FLS2) приводит к значительному повышению внутриклеточной концентрации активных форм кислорода (в том числе и перекиси водорода), выделению этилена, снижению уровня метаболизма и скорости роста растений. Важной движущей силой эволюции симбиотических бактерий является повышение эффективности колонизации макроорганизма, в частности, путём преодоления иммунной системы растений. Примером такого механизма является гликозилирование флагеллина, снижающее вероятность узнавания этих молекул рецепторами растений.

Целью данной работы было исследование ответных реакций растений картофеля и пшеницы на внесение в среду культивирования гликозилированных флагеллинов рост-стимулирующих ризобактерий.

Флагеллины двух штаммов *Azospirillum brasilense* Sp7 и *Niveispirillum irakense* KBC1 были отделены от клеток и очищены стандартным методом дробного ультрацентрифугирования с изменением pH раствора. Водные растворы флагеллинов после диализа против дистиллированной воды и лиофилизации были добавлены стерильно в среду культивирования микрорастений картофеля сорта Кондор и пшеницы сорта Саратовская 29. На 10-ые сутки роста проводили измерения морфометрических параметров растений, а также оценивали активность пероксидазы и митотический индекс клеток корневых меристем.

#### С-4. Микробиота растений

При добавлении раствора флагеллина полярного жгутика штамма *Niveispirillum irakense* КВС1 (10 мкг/мл) к 3-х суточным проросткам пшеницы было выявлено значительное ингибирование длины (на 65%) и сухой массы (на 55%) корней, а также двукратное снижение митотического индекса клеток корневых меристем. При действии на проростки растворов флагеллинов в меньших концентрациях (0,01; 0,1 и 1 мкг/мл) не выявлено статистически достоверных различий в значении митотического индекса по сравнению с контрольными растениями. Таким образом, впервые для проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) выявлены ответные реакции системной устойчивости растений на обработку бактериальным флагеллином, свидетельствующие о наличии флагеллин-чувствительных рецепторов, входящих в состав системы, распознающей микроб-ассоциированные молекулы.

Для микрорастений картофеля не выявлено достоверного влияния гликозилированных флагеллинов бактерий на морфометрические параметры в исследованных концентрациях, в отличие от действия негликозилированного флагеллина *Pseudomonas syringae*,  $EC_{50}$  для которого составляет 1 нМ. При этом нами было выявлено достоверное увеличение активности пероксидазы в корнях микрорастений картофеля при действии на них флагеллина *Azospirillum brasilense* Sp7 в концентрациях 10 мкг/мл (100 нМ) и 1 мкг/мл (10 нМ) на 47% и 53% соответственно.

Таким образом, для растений пшеницы и картофеля выявлено, что действующие на них концентрации гликозилированных флагеллинов азоспирилл на 1-2 порядка выше описанных в литературе соответствующих концентраций негликозилированных бактериальных флагеллинов. Можно предположить, что присутствие углеводных фрагментов в молекулах флагеллинов является одним из важных адаптационных факторов бактерий, необходимых для успешной колонизации не только поверхностных, но и внутренних тканей растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантом РФФИ 16-04-01444.

Действие флагеллина полярного жгутика рост-стимулирующих бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7 на рост растений в условиях *in vitro*

An action of the polar flagellum flagellin of *Azospirillum brasilense* Sp7 on the plant growth *in vitro*

Каргаполова К.Ю.<sup>1</sup>, Бурьгин Г.Л.<sup>2</sup>, Костина Е.Е.<sup>1</sup>, Ткаченко О.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, 410012, г. Саратов, Театральная площадь, д.1

*kinaschchri@gmail.com.*

<sup>2</sup> ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, 410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13

*burygingl@gmail.com.*

Врождённая иммунная система растений направлена на снижение уровня метаболизма и ростовых процессов при внедрении патогенных микроорганизмов. Одной из бактериальных макромолекул, распознающихся растениями в качестве сигнала присутствия бактерий, является флагеллин – структурный белок, формирующий нить жгутика подвижных бактерий. Для некоторых растений показано присутствие киназных рецепторов FLS2, которые при взаимодействии с N-концевым фрагментом флагеллина запускают в растительной клетке каскад биохимических реакции иммунитета. Для изучения физиолого-биохимических процессов, происходящих в растениях при действии на них флагеллинами, удобной системой является выращивание микрорастений в культуре *in vitro* в стерильных условиях.

Целью данной работы было изучение влияния флагеллина рост-стимулирующей бактерии *Azospirillum brasilense* Sp7 на морфометрические показатели микрорастений картофеля и пшеницы в условиях *in vitro*.

Флагеллин полярного жгутика штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 был отделен от клеток и очищен стандартным методом дробного ультрацентрифугирования с изменением рН раствора. Водный раствор флагеллина после диализа и лиофилизации был добавлен стерильно в среду культивирования микрорастений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Кондор и пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская 29 до конечных значений концентрации белка в среде 0,1; 1,0 и 10,0 мкг/мл. В качестве контроля были использованы растения без добавления раствора флагеллина. На 10-ые сутки роста для 30 растений из каждого варианта проводили измерения морфометрических параметров растений: длина и количество корней, для микрорастений картофеля длина побега и количество узлов, а для пшеницы – длина coleoptиле и первого листа. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа в программе AGROS версия 2.09.

Анализ проведённых измерений выявил достоверные различия опытных растений пшеницы с контрольными только при концентрации флагеллина в среде 10 мкг/мл. При данной концентрации флагеллина полярных жгутиков А.

#### С-4. Микробиота растений

*brasilense* Sp7 наблюдалось снижение на 22,5% длины 1-го листа и на 30% длины корней. При этом длина coleoptиле и количество корней достоверно не различались у растений всех вариантов. Эти данные свидетельствуют о том, что бактериальный флагеллин ингибирует рост микрорастений пшеницы, не влияя на растяжение coleoptиле и процесс корнеобразования.

В экспериментах с микрорастениями картофеля на 10 сутки достоверных отличий опытных растений относительно контрольных зафиксировано не было. Ранее в литературе было описано угнетение роста растений картофеля флагеллином псевдомонад, который в отличие от флагеллина азоспирилл негликозилирован. Таким образом, нами для микрорастений картофеля показана зависимость действия бактериального флагеллина от его гликозилирования. При этом микрорастения пшеницы оказались более чувствительны к бактериальному флагеллину.

Биоинформационный анализ баз данных по аннотированным генам картофеля и пшеницы показал присутствие в геноме картофеля двух генов, продукты которых имеют высокую степень гомологии с рецептором FLS2 арабидопсиса. В геноме пшеницы генов, продукты которых близки FLS2-белкам, обнаружено не было, что, при наличии экспериментально выявленного нами действия флагеллина на микрорастения пшеницы, может свидетельствовать о значительных различиях в рецепции бактериального флагеллина у пшеницы и картофеля.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-01444.

#### Влияние растений душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.) на энтомопатогенный штамм *Bacillus thuringiensis* 0371

Effect of oregano plants (*Origanum vulgare* L.) on the entomopathogenic strain *Bacillus thuringiensis* 0371

Крыжко А.В., Кузнецова Л.Н., Мягких Е.Ф.

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», 295453, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150

+7 3652 560007, +7 978 7819248, [solanum@ukr.net](mailto:solanum@ukr.net)

Применение химических средств защиты растений на лекарственных и эфиромасличных культурах строго ограничено, поэтому актуальными являются исследования по использованию против вредителей биопрепаратов, в частности, на основе энтомопатогенных штаммов *B. thuringiensis*. Однако, применяя для обработки растений *B. thuringiensis*, необходимо учитывать, что в агроэкосистемах на бактерии влияют ряд внешних факторов, в частности фитонциды и экстрактивные вещества растений, что может сказаться на эффективности биопрепарата.

Целью наших исследований было изучить влияние растений душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.), которые обладают рядом бактерицидных веществ (карвакрол, тимол и другие фенольные соединения) на энтомопатогенный штамм *B. thuringiensis* 0371, перспективный для

разработки биопрепарата. Изучали динамику сохранности спор патогена на листьях и влияние экстрактивных веществ на морфологию культур данного штамма. В качестве основного показателя физиологического состояния фотосинтетического аппарата душицы исследовали содержание хлорофилла в листьях.

Работа проводилась на базе Отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма». Материалом для исследований служила жидкая споровая культура штамма *B. thuringiensis* 0371, и образец душицы обыкновенной 100.1 с высоким содержанием карвакрола (75,59%). Динамику сохранности спор штамма на поверхности листьев определяли по методике А.Г. Кольчевского и др. (1984). Исследование влияния экстрактивных веществ листьев душицы на морфологию бактерий проводили методом Е.М. Данини (1952), определение содержания хлорофилла - согласно методике В.Ф.Гавриленко и др. (1975).

Изучение динамики сохранности спор штамма *B. thuringiensis* 0371 на листьях душицы при обработке растений в полевых условиях показало, что в течение суток количество жизнеспособных спор на исследуемом материале снижалось в среднем более чем на 82,4 %. В дальнейшем, в течение 3-х дней, отмеченная тенденция сохранялась довольно активно (на 96,3%) и уже к 5-му дню количество жизнеспособных спор снижалось на 99,7%. Анализ, проведенный на 10-й день после обработки, выявил на листьях душицы практически полную гибель спор (на 99,9%). Поскольку в период исследований не отмечали осадков и значимых колебаний интенсивности инсоляции, можно предположить, что на сохранность спор штамма *B. thuringiensis* 0371, помимо факторов внешней среды, влияние оказывают и фитонциды душицы.

Влияние растений душицы на культуру штамма *B. thuringiensis* 0371 исследовали посредством экстрактивных веществ в условиях лабораторного опыта. В чашках Петри с МПА макроскопическому анализу подвергали колонии, взятые в зоне угнетения роста под воздействием экстрактивных веществ. Контроль – колонии с чашек, не подвергавшиеся воздействию экстрактивных веществ.

Показано, что колонии бактерий штамма 0371 в опытных вариантах, в отличие от контрольных, имели меньший диаметр и формировали ярко выраженную ареолу и кратерообразный профиль. Так колонии, испытывавшие влияние экстрактивных веществ образца 100.1 в фазе бутонизации были в диаметре в 2,2 раза, а в фазе цветения – в 1,9 раза меньше контрольных.

В качестве основного показателя физиологического состояния фотосинтетического аппарата душицы исследовали содержание хлорофилла в листьях. Установлено, что в листьях растений, обработанных жидкой споровой культурой штамма 0371, через 10 дней содержание хлорофиллов снижалось на 36,5% к контролю. Однако результаты анализа, проведенного через 20 дней после обработки, показали отсутствие какого-либо существенного влияния энтомопатогена на исследуемый показатель. Полученная динамика изменения содержания хлорофила в листьях может быть связана с процессом сохранности спор штамма 0371 на их поверхности под влиянием инсоляции и фитонцидной активности.

#### С-4. Микробиота растений

Таким образом, на культуру энтомопатогенного штамма *B. thuringiensis* 0371 при обработке растений душицы обыкновенной на сохранность спор на листьях помимо факторов внешней среды влияют и фитонциды растений. Данный показатель необходимо учитывать при разработке технологии применения патогена против вредителей на эфиромасличном растении.

#### Консорция «растение – бактерии» на примере *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (orchidaceae JUSS.)

Consortium “Plant – Bacteria” in the case *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae Juss.)

Шеховцова Н.В., Родькина М.В., Маракаев О.А.

Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова  
150003, г. Ярославль, ул. Советская, 14, Россия

+7 4852 79-77-02, +7 4852 25-57-87, marakaev@uniyar.ac.ru

Представители семейства Orchidaceae Juss. – одни из наиболее уязвимых компонентов природных экосистем, большинство видов являются редкими и охраняемыми. В связи с этим актуально выявление различных аспектов жизнедеятельности этих уникальных растений. Консортивные связи орхидных умеренного климата северного полушария остаются весьма слабо исследованными. Между тем, именно они во многом определяют их жизнеспособность в естественных условиях произрастания. Взаимоотношения орхидных с микроорганизмами, помимо микоризообразующих грибов, изучены незначительно. Сведения о метаболической структуре сообществ ассоциативных бактерий подземных органов орхидных умеренного климата в природных местообитаниях практически отсутствуют.

В связи с этим целью работы было выявление структурно-функциональной организации комплексов бактерий, ассоциированных с придаточными корнями и стеблекорневыми тубероидами *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó в фазу зимнего покоя. Исследуемые растения произрастали на территории Ярославской области (Даниловский район) в молодом злаково-разнотравном березняке с примесью ольхи на дерново-подзолистой суглинистой почве (содержание гумуса в корнеобитаемом слое – 1,4%, pH – 4,2). Подземные органы и почвенные пробы отбирали в октябре 2014 г. Из ризосферы, ризопланы и тканей (эндоризосферы) придаточных корней и тубероидов на стандартных лабораторных и селективных средах выделяли следующие группы бактерий – сапротрофы (МПА), олигонитрофилы (среда Эшби), азотфиксаторы (среда Фёдорова), нитрификаторы (среда Виноградского), фосформобилизующие (среда Пиковской), целлюлозоразлагающие (среда Гетчинсона), фенолоксиляющие (среда с фенолом), метилотрофные (среда Хирша). Выбор метаболических групп бактерий определялся предполагаемыми консортивными связями в системе «растение – бактерии». Они обусловлены «plant growth promotion»-свойствами микроорганизмов за



счет их участия в снабжении растений соединениями азота и фосфора, способностями проникать в подземные органы, противостоять регуляторным фитометаболитам с бактерицидным действием и усваивать экзометаболиты растительного происхождения. Сходство выделенных сапротрофных сообществ ризосферы, ризопланы и эндоризосферы оценивали по коэффициенту Сёренсена-Чекановского.

Методом чашечного посева на МПА зарегистрирован эффект концентрирования микроорганизмов на поверхности подземных органов *D. maculata*. Для придаточных корней максимум численности бактерий наблюдали в ризоплане –  $2,4 \cdot 10^7$  КОЕ/г сырой массы, что в 2 раза превышало концентрацию микроорганизмов в ризосфере и в 24 раза – в эндоризосфере. По сравнению с придаточными корнями численность ассоциированных с тубероидами сапротрофных бактерий была ниже: на 41% в ризоплане, в 3,2 раза – в ризосфере и в 12,5 раза в эндоризосфере. Таким образом, самым малонаселенным местообитанием оказались ткани тубероидов, где содержание микроорганизмов составило  $8,0 \cdot 10^4$  КОЕ/г сырой массы, что в 211 раз было меньше, чем в ризоплане этих подземных органов.

Выявлено, что микробный комплекс сапротрофных бактерий *D. maculata* был представлен палочковидными бактериями, из которых 10 штаммов – грамположительные спорообразующие, и один грамотрицательный вид. Ризосфера придаточных корней характеризовалась наибольшим разнообразием сапротрофных бактерий (7 штаммов), а ризосфера тубероидов – наименьшим (4 штамма). Во всех местообитаниях грамположительные бактерии доминировали над грамотрицательными по биоразнообразию (80–100%) и удельной численности (92–100%). Максимальное видовое сходство (коэффициент 0,9) установлено для сапротрофных сообществ ризосферы придаточных корней и эндоризосферы тубероидов. Учитывая, что микробное сообщество тканей тубероидов имеет большее сходство с бактериоценозами ризопланы и тканей придаточных корней (0,7) по сравнению с сообществами ризосферы и ризопланы тубероидов (0,6), можно предполагать, что проникновение бактерий в запасующие органы происходит через придаточные корни.

Метаболические группы ассоциативных бактерий придаточных корней и тубероидов *D. maculata*, выделенные на селективных средах, располагались по численности (КОЕ/г сырой массы) следующим образом: для ризосферы – олигонитрофилы ( $10^8$ ), фосформобилизующие, целлюлозоразлагающие ( $10^6$ ), нитрифицирующие, азотфиксирующие, фенолоксиляющие ( $10^6$ – $10^5$ ), метилотрофные ( $10^5$ ); для ризопланы – олигонитрофилы ( $10^8$ – $10^7$ ), целлюлолитики и азотфиксаторы ( $10^6$ ), фосформобилизующие и фенолоксиляющие ( $10^6$ – $10^5$ ), нитрификаторы ( $10^5$ ), метиловобактерии ( $10^5$ – $10^4$ ); и эндоризосферы – нитрификаторы ( $10^6$ ), целлюлозоразлагающие, олигонитрофилы ( $10^6$ – $10^5$ ), фосформобилизующие ( $10^6$ – $10^4$ ), азотфиксаторы, метилотрофы и фенолоксиляющие ( $10^5$ – $10^4$ ). Минимальные численности разных групп бактерий характерны для тубероидов, в эндоризосфере которых наибольшую потенциальную активность сохранили нитрификаторы.

#### С-4. Микробиота растений

Таким образом, в период зимнего покоя наибольшим потенциалом для поддержания консортивных связей с бактериями имеют придаточные корни *D. maculata*. При этом основным фактором сосуществования партнеров является способность микроорганизмов к олигонитрофилии, поскольку конкуренцию за доступные формы азота, по-видимому, выигрывает растение.

#### Поиск генов, регулирующих развитие галлов на землянике *Fragaria viridis* под воздействием эриофиоидных клещей *Fragariocoptes setiger*

Search for genes controlling gallogenesis induced by eriophyoid mite *Fragariocoptes setiger* (Acari, Eriophyoidea) on strawberry *Fragaria viridis*

Папонова С.А.<sup>1</sup>, Додуева И.Е.<sup>1</sup>, Паутов А.А.<sup>1</sup>, Вишняков А.Э.<sup>1</sup>, Четвериков Ф.Е.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет

<sup>2</sup> Зоологический институт РАН

Взаимодействие растений с паразитическими организмами представляет собой сложно регулируемый процесс, требующий участия регуляторных генов паразита и хозяина. Ярким примером является взаимодействие растений с паразитами, индуцирующими галлогенез. Для создания своей среды обитания галлоиндуцирующие паразиты изменяют фитогормональный баланс в тканях растений. Это приводит к локальному изменению уровней экспрессии генов, регулирующих морфогенез и, как результат, к развитию нового органа – галла. Членистоногие составляют наиболее многочисленную, но наименее генетически изученную, группу галлоиндуцирующих фитопаразитов. Клещи надсемейства *Eriophyoidea* – микроскопические червеобразные фитопаразиты, вызывающие образование галлов на высших растениях. На примере модельной системы «клещ *Fragariocoptes setiger* – земляника *Fragaria viridis*» нами был рассмотрен галлогенез под воздействием эриофиоидных клещей на розоцветных.

Инвазии *F. setiger* сопровождаются мощной ответной реакцией со стороны земляники, выражающейся в формировании красных волосистых мешковидных галлов на листьях. Мы провели изучение гистологической структуры галла на разных стадиях развития. Начальные стадии развития галла связаны с многочисленными антиклинальными делениями клеток абаксиальной части мезофилла. Результатом этого является потеря четко выраженных зон палисадного мезофилла и аэренхимы с формированием плотной массы единообразной паренхимы. Паренхимные клетки галла на ранней стадии развития имеют морфологические характеристики активно пролиферирующих клеток, типичные для клеток меристем – плотную гомогенную цитоплазму, гипертрофированные ядра. Интенсивные деления клеток абаксиального эпидермиса и паренхимы предположительно вызывает формирование инвагинации абаксиальной стороны листовой пластинки, из

которой в дальнейшем формируется мешковидный галл. В галлах на более поздних стадиях развития активное деление клеток в антиклинальном направлении сохраняется в нижней части галла; клетки апикальной его части утрачивают способность к делениям и морфологические характеристики меристемных клеток. На разных стадиях развития галла был проведен анализ экспрессии генов разных групп: семейств генов меристем-специфичных транскрипционных факторов (KNOX, WOX), генов транскрипционных факторов, отвечающих за развитие листа (*HD-ZIPIII*, *KANADY*, *YABBY*, *LBD*, *AS1*, *AS2*, *CUC*, *ANT*), генов, кодирующих компоненты систем *CLAVATA* (*CLE10*, *25*, *41*, *45*, *46*), генов первичного ответа на ауксин и цитокинин (*RR-A*, *Aux/IAA*), генов клеточного цикла (*CycB1*, *CycD3*). Так как геном *F. viridis* не секвенирован, праймеры подбирались к генам *F. vesca*; правильность выбора праймеров подтверждали путем секвенирования ПЦР-фрагментов, полученных с подобранными праймерами на ДНК *F. viridis*. Количественный анализ экспрессии исследуемых генов показал заметное возрастание уровней экспрессии ряда меристем-специфичных генов и генов-регуляторов развития листа (*FvWOX4*, *FvWOX5*, *FvKNOX5*, *FvYAB1*, *FvREV* и др.) в растущих галлах. Предположительно, изменение уровней экспрессии этих генов могло быть причиной вышеописанных процессов, приводящих к образованию галла.

Исследования поддержаны грантом РФФИ 16-04-01292.

### Морфологические характеристики гороха при обработке вторичными метаболитами гриба рода *Trichoderma* на инфекционном и неинфекционном фоне

Morphological characteristics of pea after being treated with the secondary metabolites of *Trichoderma* fungi in infectious and non-infectious environments

Павловская Н.Е., Гнеушева И.А., Полякова М.А., Реденкова А.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет»

Факультет биотехнологии ветеринарной медицины Кафедра биотехнологии  
Ул. Генерала Родина, 69 г. Орел, Россия

*morskaya\_marina\_@mail.ru*

Из всех продуктов, получаемых с помощью микробных процессов, наибольшее значение имеют вторичные метаболиты. Они производятся ограниченным числом таксономических групп и их промышленное получение представляет несомненный интерес, так как эти метаболиты являются биологически активными веществами: одни из них обладают антимикробной активностью, другие являются специфическими ингибиторами ферментов, третьи – ростовыми факторами, многие обладают фармакологической активностью. Как и в более ранних исследованиях, в последние годы большое внимание направлено на микофильные грибы рода *Trichoderma*, как наиболее

#### С-4. Микробиота растений

перспективные продуценты соединений с разнообразной биологической активностью.

В качестве объектов исследования были использованы штаммы грибов рода *Trichoderma*, *Fusarium oxysporum*, выделенные из почв Орловской области в 2012 году, горох посевной сорта Фараон.

Семена гороха были разделены на группы, и перед проращиванием первая группа была замочена в предварительно полученных этилацетатных экстрактах вторичных метаболитов грибов рода *Trichoderma*, содержащих 0,01 мг действующего вещества в 1 мл. Семена второй группы сначала замачивались в растворе экстракта *Fusarium oxysporum* с показателем мутности 0,2mF, а затем в этилацетатных экстрактах вторичных метаболитов грибов рода *Trichoderma*, контролем служили семена выдержанные в воде и семена выдержанные в экстракте *Fusarium oxysporum*. Проращивание проводили в рулонах. На 7 и 12 сутки оценивали проросшие семена по весу, длине проростка, длине корешка. Рассчитали энергию прорастания и всхожесть (ГОСТ12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести). Было отмечено отсутствие фитотоксичности вторичных метаболитов грибов рода *Trichoderma* в отношении растения гороха. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что на прорастание семян гороха вторичные метаболиты грибов рода *Trichoderma* существенно не влияют. В то же время отмечается выраженное стимулирующее действие на морфологические части гороха. У образцов, предварительно обработанных экстрактом вторичных метаболитов *Trichoderma*, на 12 сутки отмечали хорошо развитый корень, появление настоящих листьев. Опыт показал, что наиболее выраженной биологической активностью обладают растворы вторичных метаболитов в концентрации 6-10%.

Полученные данные позволяют судить о биологической активности вторичных метаболитов штаммов грибов рода *Trichoderma* для дальнейшего обоснования возможности их использования в качестве биопрепаратов.

## Эндоризобактерии *Epipactis helleborine* (L.) Crantz (*orchidaceae*) Juss.

Endorhizobacteria of *Epipactis helleborine* (L.) Crantz

Ромицына М.В., Шеховцова Н.В., Маракаев О.А.

ГОУ ВПО «Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова». 150003, г. Ярославль, ул. Советская, 14, Россия

+7 4852 79-77-02, +7 4852 25-57-87, romicyna\_masha@mail.ru

Ассоциативные микроорганизмы играют важную роль в жизнедеятельности растения. Они воздействуют на его рост и развитие за счет фиксации атмосферного азота, синтеза фитогормонов, стимулирования минерального питания, а также образования бактерицидных веществ, уменьшающих численность фитопатогенов. В значительной степени свое влияние оказывают микроорганизмы эндоризосферы – бактерии, которые заселяют внутренние ткани подземных органов растения, не нанося при этом негативного воздействия. Есть данные, что они используют эндосферу, в качестве уникальной экологической ниши, защищающей от изменений внешней среды. У представителей семейства *Orchidaceae* – одного из наиболее уязвимых компонентов растительных сообществ, также имеются ассоциированные с подземными органами бактерии, играющие важную роль в жизнедеятельности благодаря своим «Plant Growth Promotion»-свойствам. Эндоризобактерии орхидных могут продуцировать вторичные метаболиты – регуляторы роста, пигменты и антибиотики, защищающие растение от фитопатогенных микроорганизмов. Цавкеловой Е.А. (2004, 2005, 2007) установлено, что бактерии, ассоциированные с тропическими оранжевыми орхидеями, синтезируют и выделяют в культурную жидкость индол-3-уксусную кислоту. Она участвует в делении, растяжении и дифференциации растительных клеток и тканей, ускоряет процессы ксилемо- и корнеобразования, стимулирует прорастание семян орхидных. Аналогичные результаты получены Н.В. Шеховцовой с соавторами (2010, 2011) в отношении бактерий, ассоциированных с подземными органами орхидных умеренного климата, в частности тубероидного вида *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó.

Целью нашей работы являлось исследование эндоризобактерий корневища и придаточных корней *Epipactis helleborine* (L.) Crantz.

Исследуемые растения произрастали в тополево-разнотравном сообществе. Материал отбирали в фазу зимнего покоя *E. helleborine* (ноябрь 2015 г.). В работе приведены результаты для участка корневища и придаточных корней, образовавшихся на растении в вегетационном периоде 2009 г. Корневище и придаточные корни стерилизовали в 6%-ном растворе хлорамина в течение 5 мин, после этого 7 – 10 раз отмывали в стерильной воде. Подземные органы обсушивали фильтровальной бумагой. Выделение эндоризобактерий проводили на среде МПА путем наложения фрагментов корня и посевом из суспензии. Корневище и корни разрезали на небольшие кусочки для получения фрагментов: продольно (5,0 × 2,0 мм) и горизонтально (3,0 – 10 мм).

#### С-4. Микробиота растений

На поверхность питательной среды их помещали с помощью пинцета по 5 – 6 кусочков, распределяя на одинаковом расстоянии друг от друга. Для приготовления суспензии корневище и корни разрезали и растирали в ступке со стерильной водой. Объем суспензии доводили до 100 мл и вручную взбалтывали в течение 5 мин. Полученную суспензию перед посевом десятикратно разбавляли. Посевы проводили из двух последних разведений поверхностным способом в двукратной повторности. Чашки с посевами инкубировали в течение 5 – 10 суток при температуре 28°C.

Методом наложения фрагментов корневища и корня выделено 11 штаммов бактерий, представленных грамположительными спорообразующими палочками, что предварительно позволяет их отнести к представителям р. *Bacillus*. Посевом суспензии выделен один штамм грамположительных бактерий актиномицетного ряда. Их численность варьировала от  $10^4$  до  $10^6$  КОЕ/г сырой массы. Полученные результаты согласуются с известными данными по биоразнообразию и численности эндоризобактерий придаточных корней и тубероидов *D. maculata*. Ранее также было показано наличие представителей р. *Bacillus* и актинобактерий в эндоризосфере тропических эпифитных видов орхидных.

Данные результаты станут основой для дальнейшего изучения формирования сообщества эндоризобактерий в процессе роста подземных органов *E. helleborine*. Определение «Plant Growth Promotion» -свойств выделенных микроорганизмов будет способствовать установлению физиологической природы ассоциативных связей между корневищным видом орхидных и бактериями.

## Агробактериальные опухоли как возможные триггеры системы авторегуляции клубенькообразования (АРК)

### Agrobacterial tumors as possible triggers of AON (autoregulation of nodulation) suppressing nodule development

Самородова А.П., Творогова В.Е., Лебедева М.А., Лутова Л.А.

Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9., Санкт-Петербург, Россия

*alena\_08\_93@mail.ru*

Компоненты системы CLAVATA (CLV), такие как CLV1-подобная киназа, CLV2 и специфичные для клубенька CLE пептиды, как известно, являются частями системы авторегуляции клубенькообразования (АРК), которая запускается развивающимися клубеньками и негативно регулирует последующее развитие клубеньков по механизму обратной связи. Кроме того, компоненты системы CLV играют ключевую роль в апикальных меристемах, где они регулируют экспрессию ТФ семейства *WOX* в организующих центрах. Недавно мы обнаружили, что гены *WOX*, в частности, ген *WOX5*, также экспрессируется в клубеньках и опухолях, индуцированных *Agrobacterium tumefaciens* на гипокотиле гороха. Кроме того, экспрессия *WOX5* в развивающихся клубеньках была увеличена у мутанта с нарушением в системе АРК, указывая, что система АРК может регулировать экспрессию *WOX5* в клубеньках.

На основании этих данных, мы предполагаем, что клубеньки и агробактериальные опухоли могут и регулироваться и запускать общие компоненты системы АРК, в том числе гены *WOX* и *CLV*. Во-первых, чтобы оценить, управляются ли агробактериальные опухоли системой АРК, мы сравнили развитие опухоли у растений гороха дикого типа и у мутантов *sym29* и *sym28*, дефектных по АРК. Значимой разницы между диаметром агробактериальной опухоли, индуцированных *A. tumefaciens* штамма С58 у растений гороха дикого типа и у мутантов *sym29* и *sym28* не было найдено. Этот результат указывает на то, что компоненты системы АРК, CLV1-подобная киназа (PsSYM29) и CLV2 (PsSYM28), с малой вероятностью участвуют в регулировании размера агробактериальных опухолей. Далее, мы предположили, что развивающиеся агробактериальные опухоли могут сами запускать компоненты системного контроля клубенькообразования и, таким образом, могут повлиять на количество клубеньков. Действительно, согласно нашим результатам, растения гороха дикого типа с агробактериальными опухолями, которые были получены до инокуляции ризобиями, имеют уменьшенное количество клубеньков, и этот эффект отсутствует у мутанта *sym29*, дефектного по CLV1-подобной киназе, ключевого компонента системы АРК. Это говорит о том, что агробактериальные опухоли могут синтезировать сигнал, активирующий CLV1-подобную киназу, и тем самым подавлять количество клубеньков. Чтобы проверить, могут ли CLE-пептиды представлять собой такой сигнал, мы планируем оценить уровни экспрессии

#### С-4. Микробиота растений

группы генов CLE в агробактериальных опухолях, в том числе специфичных для клубенька генов CLE.

В целом, наши данные свидетельствуют о том, что агробактериальные опухоли избегают регулирования со стороны системы авторегуляции клубенькообразования, однако, опухоли могут запускать системный контроль клубенькообразования и подавлять таким образом развивающиеся клубеньки. Эта работа была поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (15-34-20071 и 15-29-02737).

#### Влияние бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 на клубнеобразование картофеля *in vitro*

Effect of the bacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 on potato tuber formation *in vitro*

Терентьева Е.В.<sup>1,2</sup>, Евсеева Н.В.<sup>3</sup>, Ткаченко О.В.<sup>1</sup>, Бурьгин Г.Л.<sup>3</sup>, Матора Л.Ю.<sup>3</sup>, Буров А.М.<sup>3</sup>, Щеголев С.Ю.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», 410012 г. Саратов, Театральная пл., 1, Россия

+7 8452 23-46-97, +7 8452 23-47-81, [elena-terenteva@inbox.ru](mailto:elena-terenteva@inbox.ru)

<sup>2</sup> ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, 410049 г. Саратов, пр. Энтузиастов, 13; Россия

+7 8452 97-04-74, +7 8452 97-04-44, [evseeva@ibppm.sgu.ru](mailto:evseeva@ibppm.sgu.ru)

Синтез крахмала и его накопление внутри специальных органелл амилопластов в виде крахмальных гранул является одним из важнейших биохимических процессов, характерных для клубнеобразования и определяющих качество и питательную ценность клубней картофеля. В настоящее время для изучения механизмов, контролирующих образование крахмальных гранул и регулирующих их размеры, используют, в основном, генно-инженерные методы исследования. Кроме того, известно, что содержание крахмала в клубнях картофеля, как правило, коррелирует с размером амилопластов.

В настоящей работе исследовали влияние ростстимулирующих ассоциативных ризобактерий штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 на среднюю площадь крахмальных гранул и содержание крахмала в микроклубнях картофеля сорта Кондор и Линии 1 (Л1), культивируемых *in vitro*. Микроклубни получали на питательной среде Мурасиге и Скуга с содержанием сахарозы 6% и сокращенном на этапе клубнеобразования до 12 часов фотопериоде. В опытном варианте к микрочеренкам картофеля добавляли бактерии штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 в виде суспензии в



концентрации  $10^7$  кл/мл. Контролем служили микроклубни, выращенные в стерильных условиях.

Среднюю площадь крахмальных гранул определяли с помощью комбинированной системы анализа изображений Ageol (Genetix, Великобритания). Содержание крахмала в микроклубнях определяли общепринятыми методами. Было установлено, что азоспириллы положительно влияют на размер крахмальных гранул в микроклубнях картофеля. У сорта Кондор средняя площадь гранул в опытных образцах микроклубней увеличивалась в 1,3 раза. У линии Л1 увеличение размера гранул под влиянием бактерий было менее заметным. В работе также было показано положительное влияние бактерий на содержание крахмала в микроклубнях картофеля: у сорта Кондор содержание крахмала в опытных образцах увеличивалось почти в 1,5 раза, у Л1 – в 1,7 раза. Кроме того, под влиянием бактерий уменьшалась оводненность клубней у сорта Кондор на 4,3%, что в сочетании с увеличением содержания крахмала приводило к повышению их качества. Можно предположить, что азоспириллы влияют на процессы, регулирующие инициацию крахмальных гранул, а также на активность ферментов, участвующих в синтезе крахмала.

Таким образом, установлено, что бактерии *A. brasilense* Sp245 увеличивают размер крахмальных гранул и содержание крахмала в микроклубнях картофеля в культуре *in vitro*, что может быть использовано в агробiotехнологиях для повышения качества получаемого оздоровленного растительного материала.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00720.

## Функциональная активность штаммов ассоциативных с растениями риса бактерий как фактор формирования устойчивых растительно-микробных систем

Functional activity of associative strains of bacteria with rice plants as a factor of sustainable plant-microbe systems

Якубовская А.И., Каменева И.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», РФ, г. Симферополь

yakubovskaya\_alla@mail.ru

Известно, что в состав корневых экссудатов входят азотсодержащие соединения такие как аминокислоты и т.д., а также вторичные метаболиты, которые выполняют роль молекулярных сигналов для ризобактерий, при которых формируется устойчивая растительно-микробная система. В свою очередь, микробные сообщества, формирующиеся на поверхности корня растения и в прикорневой зоне почвы, оказывают существенное влияние на его рост и развитие. Механизмами полезного для растений действия бактерий являются азотфиксация, фосфатмобилизация, синтез физиологически-активных веществ, в том числе стимуляторов роста (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов) и антибиотиков. Как правило, ризобактерии имеют комплекс полезных для растений свойств.

Из апикальной части корней (по принципу элективности) выделены штаммы ассоциативных с растениями риса бактерий родов *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*.

Цель наших исследований – изучить хозяйственно полезные свойства штаммов бактерий, ассоциативных с растениями риса.

Скрининг нововыделенных штаммов по способности фиксировать азот атмосферы методом ацетилен-редукции позволил выявить наиболее активные из них. Максимальная азотфиксирующая активность (549,7  $C_2H_4$  наноМ/мл/час) отмечена у *Enterobacter sp.* 32. Высокой азотфиксирующей активностью обладают штаммы *Flavobacterium sp.* 6 и *Flavobacterium sp.* 7 (430,2 и 517,9  $C_2H_4$  наноМоль/мл/час соответственно). Также высокая нитрогеназная активность отмечалась у штаммов рода *Bacillus* (254,9 – 509,9  $C_2H_4$  наноМ/мл/час).

Выявлена способность штаммов ассоциативных с растениями риса флаво- и энтеробактерий продуцировать фитогормоны, в частности индол-3-уксусную кислоту (ИУК). Анализ результатов показал, что ассоциативные с растениями риса штаммы бактерий синтезируют фитогормоны ауксиновой природы. Штамм *Enterobacter sp.* 32 в концентрации суспензии 1:50 проявил стимуляцию роста coleoptилей пшеницы на 32 %, *Flavobacterium sp.* 6 (1:10) – на 16 % превышали показатель контроля. Следует отметить, что *Enterobacter sp.* 32 в разведениях 1:10 и 1:100 раз, *Flavobacterium sp.* 6 – 1:50 увеличивали прирост coleoptилей пшеницы на уровне аутентичного раствора (ИУК  $10^{-5}$ ). При обработке coleoptилей культурой *Flavobacterium*

*sp.* 7 в концентрациях 1:10 и 1:100 были получены максимальные стимулирующие эффекты, которые на 44 % и 32 % превышали показатели контроля (вода) и 33 % и 22 % контроль (ИУК  $10^{-5}$ ).

Из исследуемых коллекционных культур бактерии рода *Bacillus* проявили антифунгальную активность к фитопатогенным микромицетам *Fusarium glumarum*.

Обработка семян риса перед посевом исследуемыми бактериальными культурами в условиях полевых опытов обеспечивала прибавку урожая до 45%.

Таким образом, результаты исследований показали, что штаммы бактерий родов *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, выделенные по принципу ассоциативности, имеют комплекс полезных свойств для роста и развития растений, что позволяет формировать устойчивую эффективную растительно-микробную систему.

## Заочное участие

Сохранение генетических ресурсов винограда таджикистана в культуре *in vitro*

Conservation of genetic resources of grapes of Tajikistan in culture *in vitro*

Бободжанова Х.И.

Центр биотехнологии Таджикского национального университета, Душанбе, Таджикистан

992-907956777, 992-37-2214884, bobjankh\_7@bk.ru

Таджикистан входит в Среднеазиатский центр, определенный Н. И. Вавиловым как один из основных центров происхождения винограда и введения его в культуру. В этом регионе виноград представлен огромным разнообразием культурных и диких форм, насчитывающим тысячи генотипов. Более двух тысяч форм и сортов винограда произрастает на территории Таджикистана, ряд из них являются аборигенами. Местные сорта винограда характеризуются большим разнообразием. Среди возделываемых сортов - ультраскороспелые и позднеспелые, бессемянные и пригодные для длительного хранения.

Местные сорта винограда характеризуются ценными технологическими качествами, отличным вкусовыми достоинствами, относительной устойчивостью к низким температурам и грибным болезням. Сорта местного происхождения являются, как правило, более приспособленными к природным условиям своей родины, чем завозные. Это объясняется тем, что при культуре на своей родине встречаются привычные климатические условия, под воздействием которых они когда-то сформировались.

Известно, что ампелографическая коллекция является национальным богатством и бесценным достоянием всего человечества. В настоящее время, в Таджикистане, основные коллекции сортов винограда в корнесобственной культуре, сосредоточены на коллекционном участке «Сумбула» Института садоводства и овощеводства Таджикской академии сельскохозяйственных наук (Гиссарский р-н), в его филиалах (район Б.Гафурова и Истаравшанский район). Однако эти коллекции не охватывают все разнообразие местных, интродуцированных и других сортов винограда, произрастающих на территории страны. К сожалению, некоторые ценные сорта винограда представлены несколькими кустами на коллекционных виноградниках или приусадебных участках, часть из них находится на грани исчезновения. Вместе с тем, меняющиеся климатические условия создают определенный риск сохранности в условиях открытого грунта. И здесь одним из новых подходов к сохранению биоразнообразия служат методы биотехнологии, в частности культура *in vitro*.

В Центре биотехнологии Таджикского национального университета с 2011 года ведется работа по сбору сортов винограда, культивируемых в различных регионах Таджикистана, по введению его в культуру *in vitro* и получению коллекции пробирочных растений. Созданная коллекция, в настоящее время,

насчитывает около 100 сортов и форм винограда, и работа по ее расширению продолжается. Коллекционные сорта разделены по срокам созревания, устойчивости к болезням и низким температурам, качественным показателям ягод. В коллекции имеются сорта народной селекции, характеризующиеся ценными качествами, часть из которых находится на грани исчезновения.

В настоящее время, собранные в коллекции сорта винограда хранятся в условиях открытого грунта опытного участка Центра биотехнологии (96 сортов), в защищенном грунте в культуральных комнатах (25) и в культуре *in vitro*, в условиях светокультуральных комнат (46). Следует отметить, что данная коллекция сортов винограда в культуре *in vitro* в Таджикистане создана впервые.

Метод культуры *in vitro* позволяет в короткие сроки размножить клоновый материал, свободный от вирусной и бактериальной инфекции, в необходимом количестве. Полученный в результате клонального микроразмножения генетически однородный материал является исходным для создания базовых насаждений и последующего производства сертифицированного посадочного материала. Возможность создания банка культур *in vitro* для длительного хранения генофонда растений является важнейшим достижением биотехнологии.

Сохранение генетических ресурсов винограда в культуре *in vitro* в виде растущих периодически субклонированных растений может служить альтернативой или дополнением к полевой коллекции.

## Характеристика $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ обмена $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы симбиосомной мембраны корневых клубеньков бобов

Characteristics of  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchange  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of symbiosome membrane from bean root nodules

Зартдинова Р.Ф., Крылова В.В., Измайлов С.Ф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, 127276, Москва, ул. Ботаническая, д. 35, Россия

+7 499 231-83-49, +7 499 977-80-18, [rosazartdinova@mail.ru](mailto:rosazartdinova@mail.ru)

Ключевой особенностью формирования внутриклеточного азотфиксирующего симбиоза в клубеньках бобовых растений является биогенез новой симбиосомной мембраны (СМ), которая окружает проникающие в клетки хозяина бактерии – ризобии. В инициации и поддержании симбиотических отношений партнеров через СМ важная роль принадлежит кальцию. Ранее нами была идентифицирована  $\text{Ca}^{2+}$  – АТФаза в СМ клубеньков бобов и показано, что она может функционировать как АТФ-зависимый  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  обменник, используя протон в качестве противоиона для  $\text{Ca}^{2+}$ .

Целью настоящей работы была биохимическая характеристика выявленного нами  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  антипорта, прямо сопряженного с гидролизом АТФ и лежащего в основе механизма трансмембранной транслокации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  этим ферментом. Выявлено, что скорость АТФ-энергизованного  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  обмена зависит от рН и достигает максимума при рН 7, 0. В экспериментах, в которых следили за щелочным сдвигом рН внутри симбиосом и везикул СМ установлено, что в наибольшей степени такой эффект вызывают лишь ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , в то время как в присутствии других испытанных нами катионов ( $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$   $\text{Mn}^{2+}$ ) он проявляется лишь в очень слабой степени. Эти данные указывают на высокую катионную специфичность исследуемого фермента к  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{K}^{+}$ -селективный ионофор валиномицин не изменял скорости  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  обмена, свидетельствуя об электронейтральности реакции, стехиометрия которой составляет  $2\text{H}^{+} : \text{Ca}^{2+}$ . Эозин У, ингибитор  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз, заметно подавлял активность фермента, что указывает на его принадлежность к  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазам ПВ-типа.

Исследование кинетики  $\text{Ca}^{2+}$  - зависимого сдвига рН внутри симбиосом, запускаемого активацией  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в СМ, от концентрации свободного кальция в среде инкубации обнаружило ясно выраженное насыщение, развивающееся уже при микромольных концентрациях данного катиона и качественно сходное с соответствующей концентрационной зависимостью скорости гидролиза ИТФ. Это означает, что транспортная и каталитическая активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы одинаково реагируют на уровень кальция в среде, где взаимодействие  $\text{Ca}^{2+}$  с  $\text{Ca}^{2+}$  - связывающим сайтом в молекуле является основным фактором, определяющим концентрационные зависимости двух указанных активностей данного фермента.

В целом полученные результаты подтверждают вывод о функционировании  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СМ корневых клубеньков бобов как  $\text{MgATP}$ -энергизируемого  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  антипортера. В связи с этим, закисление перибактероидного пространства симбиосом, происходящее в результате действия на той же мембране  $\text{H}^+$ -АТФазы, создает благоприятные условия для активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы благодаря стимуляции  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  антипорта трансмембранным протонным градиентом.

## Оценка эффективности действия ассоциативных ризобактериальных штаммов на рост и развитие горчицы абиссинской

Analysis of the effectivity of associative rhizobacterial strains on the growth and development of mustard Abyssinian

Лебедев В.Н., Воробейков Г.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 191186, наб. р. Мойки, 48, г. Санкт-Петербург, Россия

+7 812 314-46-15, antares-80@yandex.ru

В настоящее время все больше приобретают популярность идеи биологизации всей хозяйственной и производственной деятельности, т.к. повсеместное применение пестицидов и агрохимикатов усиливает процессы загрязнения агроэкосистем и деградацию почвы. Поэтому в современном земледелии важным элементом является применение бактериальных препаратов, на основе ассоциативных азотфиксирующих ризосферных бактерий, которые наряду с азотфиксацией, продуцируют физиологически активные вещества и, воздействуя на растения, стимулируют их рост и развитие. Особое внимание в их применении направлено на интенсивно растущие и хорошо вегетирующие растения из семейства капустные, к их числу относится и горчица абиссинская (*Brassica carinata* A. Braun.).

Исследования проводилась в 2015 гг. на биологической станции РГПУ им. А.И. Герцена в пос. Вырица Гатчинского района Ленинградской области на дерново-подзолистой, супесчаной почве, характеризующейся средней обеспеченностью гумуса, слабо кислой реакцией среды и средним содержанием фосфора и калия. Нами были использованы препараты: агрофил (*Agrobacterium radiobacter*, штамм 10) мизорин (*Arthrobacter mysorens*, штамм 7), флавобактерин (*Flavobacterium sp.*, штамм Л-30), экстрасол (*Pseudomonas fluorescens*, штамм АГ-5).

Цель нашей работы заключалась в выявлении эффективности влияния различных бактериальных препаратов на рост, облиственность, количество и размер междоузлий, число цветков и бутонов, а также продуктивность горчицы абиссинской сорта BRA 1152/85 (к-4705) в условиях полевого опыта.

#### С-4. Микробиота растений

С этой целью проводили посев семян на подготовленные опытные делянки, с трёхкратной повторностью, и инокулировали бактериальными препаратами. Контролем служили делянки без использования биопрепаратов.

По результатам исследования нами было отмечено, что препараты оказывали стимулирующее влияние на всхожесть растений абиссинской горчицы. Наиболее заметно это действие проявилось при использовании агрофила и мизорина – 9,25% и 22,45%, соответственно.

Далее в ходе вегетации нами рассматривалась серия ростовых показателей. Высота растений увеличилась в фазу бутонизации (на 19-30%) и цветения (на 25-39%), по отношению к контрольному варианту. Наиболее заметно это действие проявилось при использовании мизорина - до 33,5% и 39,7%, соответственно.

Нами также изучалось изменение числа бутонов и цветков. Инокуляция увеличивала сохраняемость бутонов (на 25-118%), а цветков (на 39-62,5%). При этом, наибольший эффект оказал препарат агрофил.

Следующим показателем, который мы рассматривали в данном опыте, было количество листьев и облиственность. По нашим наблюдениям количество листьев увеличилось в фазу бутонизации (на 32-36%) и в фазу цветения (на 35-51%). Облиственность возросла (4-17,7%) по отношению к контролю у всех препаратов.

Использование мизорина стимулировало увеличение числа (на 47-64%) и длины (27-35%) междоузлий в фазу цветения, по отношению к контролю.

При анализе продуктивности растений нами были получены следующие данные: общая продуктивность сухой массы растений горчицы абиссинской значительно увеличилась почти во всех опытных вариантах относительно контрольных данных. При выращивании горчицы наилучший эффект в отношении зеленой биомассы оказало применение агрофила – 19,982 ц/га сухой массы к контролю (11,656 ц/га).

По результатам нашей работы можно сделать вывод, что все бактериальные препараты оказывают положительный эффект при выращивании горчицы абиссинской, что проявилось в увеличении ростовых показателей и продуктивности в сравнении с контрольными вариантами.

Однако наиболее эффективными биопрепаратами для выращивания горчицы абиссинской являются агрофил и мизорин. Это может быть связано с наибольшей отзывчивостью отобранных штаммов ризобактерий к корневым выделениям исследованных нами культур.



# Симпозиум 5. Современные технологии сохранения генетических ресурсов растений: проблемы и перспективы

## Устные доклады

Использование методов биотехнологии для сохранения генетических ресурсов вегетативно размножаемых культурных растений в контролируемых условиях среды

Biotechnological methods applied for long-term preservation of genetic resources of vegetatively propagated crops under controlled environmental conditions

Гавриленко Т.А., Дунаева С.Е., Антонова О.Ю., Ухатова Ю.В., Шувалова А.Р., Апаликова О.В., Пендинен Г.И., Шувалова Л.Е., Клименко Н.С., Черепко М.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова" (ВИР), отдел биотехнологии, 190000, Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д.42-44

*tatjana9972@yandex.ru*

Генетические ресурсы культурных и родственных дикорастущих видов растений (ГРР) являются основой для производства продовольствия и устойчивого развития сельского хозяйства. Актуальность проблемы сохранения и изучения ГРР обусловлена обеднением видового и сортового генофонда культурных растений, генетической однородностью широко распространенных селекционных сортов и резким сокращением разнообразия родственных диких видов. В связи с этим существенно возрастает роль национальных коллекций в которых в живом виде сохраняется около 7,5 миллионов образцов. Одна из крупнейших и старейших в мире коллекций ГРР, включающая более 320000 образцов, сохраняется в ВИРе. Основная часть коллекций ГРР представлена видами растений, размножаемыми семенами. Однако такие важные культуры, как картофель, плодовые, ягодные, некоторые овощные, можно стабильно воспроизводить только при вегетативном размножении. Хранение генофонда этих культур в виде семян невозможно, поскольку половое размножение разрушает генетическую структуру сортов, представленных высокогетерозиготными генотипами. Традиционно генетические ресурсы вегетативно размножаемых культур сохраняют в виде полевых коллекций, которые несут постоянные потери в результате воздействия экстремальных абиотических факторов, заболеваний, вредителей. Для повышения надежности долгосрочного сохранения генофонда

## С-5. Современные технологии сохранения генетических ресурсов растений

вегетативно размножаемых культур крупные мировые генбанки развивают три системы хранения коллекционных образцов (полевые коллекции, а также дублетные *in vitro* и криоколлекции), взаимно дополняющие друг друга. Важно отметить, что в контролируемых условиях среды хранится не более 10% образцов полевых коллекций вегетативно размножаемых культур. Это связано с тем, что на сегодняшний день методы среднесрочного *in vitro* хранения и криоконсервации разработаны лишь для ограниченного числа видов.

Наши исследования направлены на совершенствование методов среднесрочного *in vitro* хранения и долгосрочного криохранения с целью сохранения высокой жизнеспособности и регенерационной способности растений, а также на разработку эффективных методов оздоровления микрорастений от вирусных инфекций. В настоящее время в ВИРе в условиях *in vitro* сохраняется более 700 коллекционных образцов - представителей родов: *Solanum*, *Rubus*, *Ribes*, *Sorbus*, *Lonicera*, *Fragaria*, *Allium*. Для создания *in vitro* коллекций отбирались клоны, охарактеризованные ранее по ряду хозяйственно-ценных признаков - биохимическим признакам качества (Lefevre et al. 2011), устойчивости к патогенам и вредителям (Khiutti et al. 2012; Limantseva et al. 2014). Более трети образцов *in vitro* коллекции генотипированы с использованием SSR и ISSR маркеров (Gavrilenko et al. 2010; Lamoureux et al. 2011). Материал *in vitro* коллекции ВИР фактически не представлен в зарубежных генбанках, поскольку преимущественно включает сорта отечественной селекции; местные сорта и клоны диких видов, собранные экспедициями ВИР, а также гибридный материал.

Выявлены меж- и внутривидовые различия по интенсивности микроразмножения, роста и развития пробирочных растений образцов ежевики, малины, земляники в условиях длительного хранения при +4°C. Для оценки жизнеспособности растений в условиях длительного беспересадочного *in vitro* хранения в качестве экспресс-теста перспективно использовать мониторинг уровня пероксида водорода (Саматова и др. 2009).

В наших исследованиях изучено влияние различных методов антивирусной терапии (термо-, химио-, крио- и комплексной терапии) на эффективность оздоровления *in vitro* растений от вирусных инфекций (Антонова и др. 2014, 2015). С использованием модифицированного нами метода комплексной термо- и химиотерапии получены оздоровленные от ВККМ микрорастения малины, а также микрорастения аборигенных сортов картофеля свободные от вирусов ХВК, ВСЛК, УВК (эффективность оздоровления, подтвержденная методами ELISA и RT-PCR, составила 85,7%, 74,3%, 71,7%, соответственно). При использовании метода криотерапии выход свободных от ВСЛК криорегенерантов картофеля достиг 93%.

Для криоконсервации образцов картофеля и малины успешно используется метод Droplet vitrification (Panis et al. 2005) с небольшими модификациями (Shvachko, Gavrilenko, 2011). Криоллекция аборигенных южно-американских сортов картофеля, сохраняемая в криобанке ВИР, в настоящее время насчитывает 130 образцов (11700 эксплантов), две трети криообразцов имеют уровень регенерации после оттаивания выше 40%.

Генетически охарактеризованный материал, сохраняемый в контролируемых условиях среды, является основой для реализации прикладных программ и развития фундаментальных исследований.

## Репродуктивная физиология культурных растений (эколого-генетические основы плодоношения и селекции)

Гончарова Э.А.

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И.Вавилова (ВИР).

190000, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42,44, Россия

+7 812 314 22 34, +7 812 5704770, [e.goncharova@vir.nw.ru](mailto:e.goncharova@vir.nw.ru)

Репродуктивная биология культурных и диких растений издавна привлекает внимание многих исследователей, чему посвящена разносторонняя научная литература. Однако, в большей степени, она отражает работы эмбриологов, ботаников, систематиков и др. В изучении этой важнейшей функции всего растительного мира, используя физиолого-генетический подход, нами впервые установлены физиолого-биохимические, метаболические и морфо-структурные механизмы, обуславливающие репродуктивный статус и его роль в формировании продуктивности и адаптивного потенциала растений.

Изучение этой проблемы, на наш взгляд, особо актуально в репродуктивный период развития и плодоношения растений в изменяющихся условиях окружающей среды. Причины этих взаимодействий, вероятно, можно объяснить особой биологической и функциональной значимостью генеративных органов (семена, плоды) для растения в эволюционном аспекте. Так, в процессе селекции человек гипертрофировал у культурных растений биомассу именно плодов, практически не изменив мощность фотосинтетического аппарата, что привело к напряженности функционирования донорно-акцепторной системы.

В многоплановых и многолетних исследованиях (1975-2015гг.) нами установлено, что донорно-акцепторные связи вегетативных и генеративных органов, проявляющиеся в конкурентных взаимоотношениях и аттрагирующей деятельности, являются ведущими механизмами в адаптации растений к разным экологическим стрессам (засуха, жара, засоление и др.). Поэтому изучение и выяснение механизмов эндогенной регуляции физиологических процессов в системе плодоносящего растения имеют теоретическое и практическое значение. Оригинальностью наших исследований, явилось многоплановое изучение основных метаболических и функционально-структурных изменений в системе плодоносящего растения при экстремальных воздействиях (засуха, засоление, высокие и низкие температуры, дефицит почвенного питания и др.): поглощение, транспорт и перераспределение воды, ассимилятов и других веществ между органами; фотосинтетическая деятельность, гормональный баланс и, связанная с ними, ростовая активность в период плодоношения, а также некоторые физиолого-биохимические и структурно-анатомические изменения, приводящие к опадению генеративных органов, т.е. к снижению продуктивности растений. При экспериментальной реализации изучаемой и актуальной проблемы нами использованы современные физиолого-биохимические методы газометрии, микрокалориметрии, хроматографии, спектрофотометрии, а также биофизические, радиоизотопные и анатомические. Анализ результатов

исследований проведен с использованием корреляционного анализа, статистических критериев.

На наш взгляд, основным базисом репродуктивной физиологии культурных и диких растений, являются физиолого-генетические механизмы функционирования донорно-акцепторной системы, определяющие ее стратегическую роль. Последнее, в эволюционном аспекте, раскрывает ее реализацию в различных условиях среды (оптимальных и экстремальных), в связи с формированием стабильной продуктивности и адаптивности в различных условиях «генотип – среда». Среди механизмов регуляции устойчивости растений к стрессам, особая роль принадлежит взаимодействию органов, соподчинение и функции которых, четко определены эволюцией (физиологическая сущность и закономерность этих процессов еще мало изучены). Теоретическая и практическая значимость исследований, проведенных на многолетних растениях (коллекция генетических ресурсов плодово-ягодных культур ВИР им. Н.И. Вавилова), обоснована доказательством изменения их морфо-физиологического статуса в годичном цикле, что обусловлено его адаптацией к различным условиям произрастания, в т.ч. экстремальным.

Изучены и предложены основные приемы онтогенетической и экологической регуляции роста и развития растений, основанные на выявлении взаимосвязи структуры и функциональной активности в процессе морфогенеза. Экспериментально обоснован физиолого-генетический базис, как основа для управления продуктивностью сельскохозяйственных растений.

Разработанные экспериментальные подходы и современная методология могут быть рекомендованы для совершенствования разноплановых приемов комплексной характеристики различных представителей ботанических видов и семейств из Генетических растительных ресурсов ВИР, с целью прогнозирования их поведения в различных экологических и ценологических условиях. С другой стороны, обсуждаемые подходы являются актуальными и эффективными для выявления ценных источников и доноров устойчивости (в т.ч. продуктивности) для селекции, растениеводства, плодоводства и овощеводства.

Полученные результаты вносят вклад в углубление и расширение представлений о формировании защитно-приспособительных механизмов (особо значимых для многолетних растений), обеспечивающих функциональную пластичность и эффективное потребление природных ресурсов.

## Сохранение генетического разнообразия представителей рода *Rubus* в ВИРе в условиях *in vitro* и в условиях сверхнизких температур

Ухатова Ю.В., Дунаева С.Е., Антонова О.Ю., Шувалова Л.Е.,  
Гавриленко Т.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр Всероссийский научно-исследовательский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 42-44

[uvl3011@rambler.ru](mailto:uvl3011@rambler.ru)

Из представителей многочисленного рода *Rubus* наибольшее селекционное значение имеют малины и ежевики, которые обладают ценными пищевыми и лечебными свойствами. Клоновый материал полевой коллекции ВИР, ранее охарактеризованный по биохимическим признакам качества (содержание и состав антоцианов, полифенолов, сахаров, макро-микроэлементов - Lefevre et al. 2011) и генотипированный с использованием различных систем маркеров (Дунаева и др. 2005; Lamougeux et al. 2011), был отобран для создания дублетных *in vitro* и криоколлекций.

Стандартных методов для *in vitro* и криосохранения больших коллекций, представленных генетически разнородным материалом, включающим представителей различных видов (источники и доноры ценных признаков) рода *Rubus*, гибриды, селекционные и местные сорта малин и ежевик различного происхождения, не существует, поэтому разработка протоколов, обеспечивающих высокую жизнеспособность и регенерационную способность коллекционных образцов, является актуальной. При формировании выборки образцов для исследований мы старались подобрать генетически разнородный материал, относящийся к разным таксонам, зачастую отличающихся уровнем ploидности, эколого-географическими и молекулярно-генетическими характеристиками. Такой подбор генетически разнородного материала позволяет исследовать влияние видовых и внутривидовых отличий, уровня ploидности и экологических характеристик изученных образцов на их способность к микроразмножению и среднесрочному *in vitro* хранению, а также на жизнеспособность и регенерационную способность эксплантов после оттаивания в экспериментах по криоконсервации. Кроме того, успешная апробация оптимизированных методов на генетически разнородном материале позволяет в дальнейшем использовать разработанные протоколы для расширения генетического разнообразия *in vitro* и криоколлекций.

В настоящее время в ВИРе *in vitro* коллекция представителей рода *Rubus* включает 182 образца, из них 114 сортов малины и ежевики и 68 образцов родственных дикорастущих видов. В наших исследованиях проведено структурирование образцов *in vitro* коллекции по способности к микроразмножению черенками, несущими пазушные почки. Исследовано влияние различных условий (температурный режим, фотопериод, состав

питательных сред, условия герметизации пробирок) на жизнеспособность и морфометрические параметры микрорастений; показана более высокая способность к «эффективному микроразмножению» посредством микрочеренкования представителей подрода *Rubus* (ежевика) по сравнению с образцами подрода *Idaeobatus* (малины) (Дунаева и др., 2005; Ухатова и др., 2015). Исследована способность образцов малины и ежевики к адвентивной регенерации в зависимости от типа экспланта, состава среды и генотипа. Выделены клоны с относительно высоким уровнем адвентивной регенерации (Лупышева и др., 2008а; Ухатова и др., 2015), ряд образцов был успешно использован в экспериментах по генной инженерии (Лупышева и др., 2008б). Изучено влияние различных методов антивирусной терапии на эффективность оздоровления от вируса кустистой карликовости малины (RBDV) в культуре *in vitro* (Антонова и др., 2015). Терапию проводили в четырех вариантах: химиотерапия на среде с рибавирином (30 мг/л) или РНКазой (0,01%) и комплексная терапия, совмещающая химиотерапию теми же реагентами с обработкой повышенной температурой (35°C). Практически все свободные от RBDV растения были получены посредством комплексной терапии. Отмечена разная чувствительность изученных образцов к действию антивирусных обработок (Антонова и др., 2015).

Начаты исследования по криоконсервации почек микрорастений образцов малины и ежевики с использованием метода капель-витрификации. У изученных образцов малин жизнеспособность и регенерационная способность после оттаивания в среднем составила  $62,7 \pm 4,2\%$ , и  $52,0 \pm 6,6\%$ , соответственно. Выявлено влияние генотипа на уровень регенерации почек после оттаивания.

## Дикорастущие виды *Hordeum*: сохранение и физиологическая идентификация

Wild *Hordeum* species: conservation and physiological identification

Пендинен Г.И., Чернов В.Е.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И.Вавилова» (ВИР), Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44, Россия

[vechernov@mail.ru](mailto:vechernov@mail.ru)

Одним из эффективных способов сохранения биологического разнообразия растений, и особенно дикорастущих видов - сородичей растений пищевого и промышленного назначения, является искусственное поддержание в условиях, контролируемых человеком. Дикорастущие виды - сородичи культурных злаков нуждаются в особом внимании в связи с тем, что часто занимают ареалы, оптимальные для возделывания культурных злаков и вытесняются с занимаемых территорий при производстве промышленных посевов. Дикорастущие виды *Hordeum* встречаются на всех континентах, кроме Антарктиды. На разных континентах виды *Hordeum* расселены как автохтонно, так и превнесено. Несмотря на широкое распространение, большинство видов дикорастущих ячменей легко вытесняются культурными злаками и другими видами трав на конкурентных территориях. Дикорастущие виды *Hordeum* предпочитают незаселенные почвенные пустоши и элиминируют при появлении других конкурирующих видов. В связи с этим более эффективным для дикорастущих ячменей является не сохранение *in situ*, а искусственное культивирование в контролируемых условиях. В многолетних экспериментах показана возможность искусственного культивирования большинства дикорастущих видов *Hordeum* в полевых условиях, все имеющиеся в коллекции виды культивируются в вегетационных сосудах в условиях открытой физиологической площадки и теплицы с естественным освещением, а также в климатических камерах с искусственным освещением с освещенностью не ниже 100 мкмоль/м<sup>2</sup>. Наиболее эффективным методом культивирования дикорастущих видов *Hordeum* для сохранения и поддержания коллекции является культивирование в вегетационных сосудах. Не выявлено универсального метода культивирования для всех видов, что связано с биологическими различиями видов и образцов. Среди ячменей встречаются однолетние и многолетние виды, образцы с озимым и яровым типом развития. Кроме того, даже в пределах вида образцы характеризуются разной регенерационной способностью *in vivo*. Культура *in vitro* дикорастущих ячменей для большинства видов довольно эффективна, но и в этом случае существует значительное межвидовое разнообразие по признаку регенерационной способности. В процессе многолетних исследований показано, что для каждого вида, а иногда и для каждого образца в пределах вида необходим выбор оптимальных условий культивирования для сохранения разнообразия, а так же для сохранения выявленных уникальных образцов. Для выявления



образцов уникальных по своим характеристикам определяющим их физиологическую ценность и хозяйственную значимость, необходимо не только хранение в жизнеспособном состоянии, но и исследование физиологических характеристик в норме и при стрессовых нагрузках.

Проведено комплексное исследование по идентификации образцов созданной нами коллекции видов и изучению их физиологических особенностей. Проведена идентификация образцов по морфологическим признакам, изучены особенности регенерации в культуре *in vitro*. Используя метод рентгеновской микротомографии исследована анатомическая структура зерновок дикорастущих видов без их диссекции. Для образцов видов, характеризующихся наличием цитотипов различного уровня ploидности, определено число хромосом, с использованием методов молекулярной цитогенетики (FISH) охарактеризовано распределение кластеров 5s rDNA и 45s rDNA в геномах ряда видов и образцов. С целью изучения возможностей работы с семенами дикорастущих видов после длительного хранения проводили выделение ДНК из невсхожих семян и оценку возможностей амплификации полученной ДНК с рядом специфичных праймеров.

Для надежного сохранения и оценки адаптационного потенциала различных видов и образцов проведены исследования физиологических особенностей образцов видов, сохраняемых в нашей коллекции. Для оценки физиологического потенциала видов рода *Hordeum* проведено исследование физиологических показателей видов рода в норме и при воздействии экстремальных внешних условий. Используя метод истечения электролитов установлены полулетальные температуры LD<sub>50</sub> для ряда видов при контролируемом замораживании. Определены летальные концентрации и группы устойчивости при искусственном контролируемом засолении NaCl. Проведена оценка интенсивности истечения электролитов при повышении температуры до критической. Проводилась оценка интенсивности поглощения ионов K<sup>+</sup> и NO<sub>3</sub> разными видами *Hordeum* в норме и при стрессовых температурных нагрузках и различных уровнях засоления. Для изучения возможностей дифференциации семян по всхожести изучали электрогенез зародышей семян различных видов с разным временем хранения. Полученные результаты позволяют дать всестороннюю физиологическую характеристику образцам видов *Hordeum* хранящимся в коллекции и надежно идентифицировать их в процессе хранения.

## Стеновые доклады

Влияние кадмия на содержание глутатиона в побегах *Triticum aestivum* L., инокулированных и неинокулированных эндофитными штаммами *Bacillus subtilis*  
Effect of cadmium on the content of glutathione in the inoculated and non-inoculated with endophytic strains of *Bacillus subtilis* shoots of *Triticum aestivum* L.

Арефьева А.А., Смирнова Ю.В., Курамшина З.М.

Стерлитамакский филиал Башкирского государственного университета,  
проспект Ленина, 37, г. Стерлитамак, Россия

43-38-69, arefyeva.anastasia.1993@yandex.ru

Растения, выращенные в почве, загрязненной тяжелыми металлами (ТМ), испытывают окислительный стресс. ТМ способны взаимодействовать с SH-группами белков. Это является одним из самых распространенных отрицательных эффектов, в результате которого происходит инактивация ферментов, нарушение клеточного метаболизма и физиологических процессов. Однако у растений имеются механизмы защиты от негативного влияния факторов внешней среды. Одним из таких механизмов является выработка глутатиона. Глутатион – мощнейший антиоксидант, обнаруженный практически у всех живых организмов. В его составе три аминокислоты (глутамин, глицин, цистеин) и серосодержащие группы (в их составе сера – клейкое вещество), которые непосредственно участвуют в связывании ТМ, токсинов и свободных радикалов. Глутатион существует в двух формах: восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG).

Восстановленный глутатион ( $\gamma$ -Glu-Cys-Glu) локализован в хлоропластах и цитозоле листьев, стеблей, корней, плодов и является донором H для восстановления SH-связей в белках. GSH играет центральную роль в предотвращении окислительного повреждения в клетках, подверженных абиотическим или биотическим стрессам, с помощью уравнивания окислительно-восстановительного состояния. Он также предотвращает повреждение мембраны, играет важную роль в нейтрализации  $H_2O_2$ , защищает SH-группы ферментов и белков от окисления, связывает свободные радикалы, участвует в тиол-дисульфидном обмене и в обезвреживании многих чужеродных соединений, восстанавливает рибонуклеотиды в дезоксирибонуклеотиды, переносит аминокислоты через мембрану клеток, является кофактором ряда ферментов, например глиоксалазы и формальдегиддегидрогеназы.

Глутатион участвует в процессах, направленных на защиту растения от окислительного стресса в условиях загрязнения тяжелыми металлами. ТМ способны снижать содержание восстановленного глутатиона, что свидетельствует о его окислении до GSSG. Преобладание окисленного глутатиона над восстановленным говорит о том, что растение испытывает стресс.

Цель работы – изучить влияние кадмия на общее содержание глутатиона в побегах пшеницы, инокулированных и неинокулированных эндофитными штаммами *Bacillus subtilis*.

Семена пшеницы мягкой сорта «Омская-35» (*Triticum aestivum* L.) выращивали в вегетационных сосудах (15×15×15 см) в течение 30 дней при температуре 18–20 °С. В каждый вегетационный сосуд насыпали 1 кг почвы (чернозем выщелоченный) и высаживали по 5 г (около 150 шт.) семян на глубину 1 см. Перед посадкой проводили обработку семян бактериями в ламинар-боксе. Часть семян обрабатывалась бактериями *B. subtilis* шт. 26Д или 11ВМ (в концентрации 10<sup>6</sup> кл/мл), остальная часть семян обрабатывалась дистиллированной водой и служила контролем. Металл в почву вносили в виде раствора соли Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O с концентрацией кадмия 10 и 200 мг/кг почвы. Почву металлом обрабатывали однократно после посадки семян. Контрольные растения поливали дистиллированной водой.

Определение содержания глутатиона в побегах растений проводили спектрофотометрически согласно методу, предложенному Зангом и Кирхамом (Zang, Kirkham, 1996). Содержание общего глутатиона в пробах оценивали в ходе цветной реакции при образовании комплекса с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой. Для оценивания содержания GSSG применяли 2-винилпиридин, который связывался с GSH. Количество восстановленного глутатиона оценивали как разность между количеством общего глутатиона и GSSG. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях.

Показано, что при воздействии кадмия содержание окисленной формы глутатиона (GSSG) в тканях необработанных бактериями растений увеличивалось, восстановленной формы (GSH), напротив, снижалось. Так, при концентрации кадмия 10 мг/кг содержание GSSG было выше на 31% по сравнению с контролем, а при 200 мг/кг – на 38%. Инокуляция семян растений бактериями *B. subtilis* снижала содержание GSSG и повышала концентрацию GSH в побегах пшеницы по сравнению с необработанными растениями. Так, при концентрации Cd<sup>2+</sup> в почве 10 мг/кг содержание GSSG в побегах обработанных бактериями растений было снижено по сравнению с необработанными на 18% и 29%, для шт. 26Д и 11ВМ соответственно, при концентрации 200 мг/кг - меньше на 17 и 28%, соответственно для шт. 26Д и 11ВМ. Концентрация GSH в побегах обработанных растений при малой концентрации ТМ (10 мг/кг) была больше, чем у необработанных (на 3% для обоих штаммов), при высокой концентрации кадмия (200 мг/кг) достоверных различий между вариантами опыта не наблюдали.

Таким образом, высокие концентрации кадмия в почве способствуют увеличению содержания окисленного глутатиона в тканях растений пшеницы. Инокуляция семян пшеницы бактериями обеспечивает защитный эффект: способствует поддержанию восстановленного глутатиона на определенном уровне.

## Сравнительное изучение ультраструктуры клубеньков растений сои и фасоли разных сортов при инокуляции ризоторфином

Comparative studying of a ultrastructure nodules of a soybean plants and varieties of beans when they was inoculated with a rizotorfin

Волобуева О.Г.

Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А.

Тимирязева. 125550 Москва, ул. Тимирязевская, 49, Россия

*ovolobueva@list.ru*

В условиях полевого опыта с растениями фасоли сортов Гелиада и Шоколадника и вегетационного опыта с растениями сои сортов Свапа и Магева изучали влияние инокуляции ризоторфином на эффективность симбиоза и ультраструктуру клубеньков бобовых растений. Исследования с растениями фасоли сортов Гелиада и Шоколадница проводили в условиях полевого опыта в ФГБНУ ВНИИЗБК (г. Орёл), инокулировав семена ризоторфином – *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli*, штамм 700. Исследования с растениями сои сортов Свапа и Магева проводили в условиях вегетационного домика лаборатории азотного обмена ИФР им. К.А. Тимирязева (г.Москва), инокулировав семена ризотофином – *Bradyrhizobium japonicum*, штамм 634. Ризоторфин для растений фасоли и сои получен во ВНИИСХМ (г. С.-Петербург).

В процессе вегетации проводили фенологические наблюдения за динамикой роста и развития растений, учитывали массу и количество клубеньков, определяли в них активность фермента нитрогеназы по методике Орлова В.П. с соавт. Для электронно-микроскопических исследований фиксацию клубеньков в глютаральдегиде проводили по методу Sabatini D.D. et.al. Срезы получали на ультрамикротоме «LKB-3» (LKB, Швеция), контрастировали 1%-ным водным раствором уранилацетата и 0,2%-ным цитратом свинца. Их просматривали под электронным микроскопом «TEMSCAN 100CX2» (JEOL, Япония). Морфометрические исследования проводили на приборе «МОР-VIDEOPLAN» фирмы Reichert (Австрия), статистическую обработку результатов – с использованием программы Statistica for Microsoft Windows.

В результате проведенных исследований установлена сортовая реакция растений фасоли и сои на инокуляцию ризоторфином. У растений фасоли наибольшей отзывчивостью характеризовался сорт фасоли Шоколадница. Обработка семян ризоторфином приводила к увеличению надземной массы, высоты растений, массы корней с клубеньками и активности фермента нитрогеназы, по сравнению с контролем. Ризобии в процессе образования клубенька превращаются в бактериоды, которые вместе с окружающей их симбиотической мембраной составляют симбиозу, играющую ключевую роль во взаимоотношениях микро- и макросимбионта. Электронно-микроскопическое изучение клубеньков растений сои и фасоли показало, что у растений сои сортов Магева и Свапа, семена которых были инокулированы ризоторфином, в клубеньках отмечено наличие симбиозом и находящихся в них бактериодов. У растений фасоли сортов Гелиада и Шоколадница, семена

которых были инокулированы ризоторфином, в клубеньках отмечено только наличие бактериоидов. В клубеньках растений фасоли сорта Шоколадница, семена которой были обработаны ризоторфином, наблюдалось увеличение площади и количества бактериоидов, включений волютина и снижение площади и количества включений поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты (ПОМ). Протекторное действие ризоторфина отмечено у растений сои сорта Магева. Предпосевная обработка семян растений сои сорта Магева ризоторфином приводила к увеличению надземной массы, высоты растений, массы корней с клубеньками и массы клубеньков, по сравнению с контролем. В клубеньках растений этого сорта наблюдали увеличение площади и количества симбиосом, бактериоидов, включений волютина. Площадь и количество ПОМ в этом варианте было минимальным. ПОМ – запасное вещество, эндогенный накопитель энергии и углерода прокариот. Наличие этого эндогенного резерва определяет большую пластичность метаболизма ризобий. Обычно при активной азотфиксации содержание ПОМ в клетках клубеньковых бактерий минимально, поскольку её синтез и распад при этом наиболее интенсивны. Включения волютина относятся к группе полифосфатов – соединений с макроэргическими связями. В процессе азотфиксации расходуется значительное количество энергии, поэтому наличие гранул волютина можно рассматривать как один из возможных источников энергии для этого процесса. В клубеньках растений фасоли и сои площадь и количество включений волютина было максимальным в тех вариантах, где отмечена наибольшая азотфиксирующая активность. Таким образом, содержание в клетках включений волютина и ПОМ может служить для некоторых видов ризобий дополнительной характеристикой активности симбиотической системы.

Разработка и использование современных технологий сохранения генофонда плодово-ягодных культур ВИР с помощью методов криоконсервации растений

Development and application of modern technologies of fruit and berry crop germplasm conservation at VIR by means of cryoconservation techniques

Дзюбенко Н.И.<sup>1</sup>, Вержук В.Г.<sup>1</sup>, Павлов А.В.<sup>1</sup>, Шубин Н.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБГНУ ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Россия, 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42,44

+7 812 314-44-14, [vverzhuk@mail.ru](mailto:vverzhuk@mail.ru)

<sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Россия, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4

[shubin\\_n@inbox.ru](mailto:shubin_n@inbox.ru)

Согласно Конвенции по биоразнообразию сохранение ценных генотипов растений от исчезновения возможно двумя путями: *in situ*, т.е. в естественных условиях – в полях, лесных массивах ( в дикой природе) и *ex situ* – в созданных трудом человека коллекционных садах , опытных насаждениях, генетических банках растений и т.д.

В генетических банках большинство растений хранится в виде семян, что не подходит для перекрестно опыляемых растений, размножаемых вегетативно. Сюда относится большая часть плодово - ягодных культур, теряющих сортовые признаки при семенном размножении. Для их сохранения перспективной является разработка технологий хранения путем криоконсервации вегетативных частей растений (черенков, почек) а также пыльцы в жидком азоте(при -196° С) или его парах при температуре – 183° С - 185° С. Криоконсервация представляет собой сложный многоступенчатый процесс с конечной целью сохранить длительное время жизнеспособность клеток, ткани, органы растений при сверхнизкой температуре жидкого азота. Для защиты биологических объектов при замораживании и размораживании от повреждающего действия сверхнизких температур применяется специальная закаливающая обработка материала, далее применяются специально разработанные программы замораживания и размораживания, сводящие к минимуму гибель клеток и тканей растений.

В наших исследованиях при разработке технологий сохранения генофонда плодовых и ягодных культур за основу был взят метод Форслийна(F.Forsline), разработанный для почек яблони. Данный метод был проверен и модифицирован нами для других культур, таких как груша, вишня, черешня, слива, черемуха, смородина, крыжовник, жимолость. Черенки одного года вегетации нарезали (заготавливали) в коллекционных садах ВИР в ноябре-декабре месяце. Перед закладкой на хранение черенки и почки подсушивали при - 4°С - 5°С, до 28% – 32% остаточной влажности и медленно замораживали в программном замораживателе до - 80°С - 90°С, после чего

погружали в криотанки с жидким азотом на длительное хранение. После хранения черенки и почки размораживали и оценивали их жизнеспособность, прививая в крону деревьев или с помощью окулировок на выращенных подвоях. Черенки ягодных культур (корнеотпрысковых), таких как смородина, крыжовник, жимолость, черемуха после размораживания высаживали в почву на садовом участке. Жизнеспособность черенков и почек после прививки или посадки в почву зависит от конкретного коллекционного сорта и места произрастания: образцы были взяты из разных эколого-географических зон России от южных (г. Крымск, г. Майкоп) до северных и северо-западных (г. Апатиты, г. Павловск, Ленинградской области). Значения жизнеспособности привитых черенков и почек изменялись в интервале от 30-35% до 89%. Криоконсервация пыльцы плодовых культур позволяет использовать селекционерам жизнеспособную пыльцу растений, цветущих в разные сроки или географически удаленных друг от друга. Жизнеспособность пыльцы плодовых культур после криоконсервации не только не снижалась по сравнению с исходной, а в некоторых случаях даже увеличивалась, пыльца в парах жидкого азота сохраняет свою фертильность длительное время, в то время как при хранении в обычных условиях она через короткий период времени становится фактически стерильной. Известно, что процессы оплодотворения, развития зародыша и эндосперма обуславливаются генетическими особенностями пыльцы, погодно-климатическими условиями ее формирования, зрелостью пыльцы и др. факторами. После опыления изолированных цветков пыльцой ягодных культур, прошедшей криоконсервацию (напр. черная смородина), завязываемость ягод во всех вариантах скрещивания составляла до 94% - 100%.

Разработка технологий сохранения генофонда ВИР при сверхнизких температурах продолжается в настоящее время, уже полученные нами результаты по величине жизнеспособности образцов плодовых и ягодных культур после криохранения дают возможность считать, что сохраняемые в криоколлекции ВИРа образцы можно восстановить в коллекционных насаждениях.

## Особенности формирования ассоциативного взаимодействия коллекционных образцов томата (*Solanum lycopersicum* L.) с ризосферным штаммом *Burkholderia* SP.418

Formation features of associative interaction of collection tomato samples (*Solanum lycopersicum* L.) with rhizosphere strain *Burkholderia* sp.418

Некрасевич Н.А.

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» ул. Академическая, 27, г. Минск, Республика Беларусь, 220072

+375 (17) 284-19-11, +375 (17) 284-19-17, n.nekrashevich@igc.by

Растительно-микробные взаимодействия представляют собой сложные системы, организованные посредством активизации сигнальных и морфогенетических процессов. Изучение растительно-микробных симбиозов имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. Знания об особенностях их формирования необходимы для создания искусственных растительно-микробных систем в ризосфере сельскохозяйственных культур. В настоящее время наиболее изученными на биохимическом и генетическом уровнях взаимодействиями являются симбиозы бобовых с ризобиями. Глубокий анализ растительно-микробных ассоциаций других сельскохозяйственных культур с ризосферными бактериями затруднён в связи с недостаточной изученностью механизмов ответа/стимула партнеров.

В связи с этим, целью проведенных исследований был анализ формирования растительно-микробного взаимодействия коллекционных образцов томата со штаммом ризосферной бактерии *Burkholderia* sp. 418.

В результате проведенных многолетних исследований подтверждена сортовая специфика томата на обработку штаммом *Burkholderia* sp.418 по ряду биометрических признаков. Доказана целесообразность использования информативного параметра ОЗП (отношение значения признака в варианте с бактериализацией к значению признака в контроле без обработки, выраженное в процентах) для оценки степени отзывчивости образцов томата на бактериализацию на разных этапах онтогенеза. У отзывчивых на обработку штаммом ризосферной бактерии *Burkholderia* sp. 418 генотипов томата отмечено достоверное увеличение значения признака «высота сеянцев», что может быть использовано для отбора нужных образцов в начале онтогенеза. Выявлено существенное влияние микроорганизмов на признак «число цветков в среднем по трём кистям», что, вероятно, обусловлено активным синтезом фитогормонов. При этом по признакам, наиболее подверженных влиянию внешних условий, «число завязавшихся плодов в среднем по трём кистям» и «процент завязываемости в среднем по трём кистям» существенных различий между контрольным и вариантом с бактериализацией не отмечено. У большинства изучаемых коллекционных образцов при обработке штаммом *Burkholderia* sp. 418 наблюдалось достоверное увеличение ранней урожайности, что могло определяться высокой метаболической активностью микроорганизмов, обусловленной повышенным синтезом корневых выделений растений в период цветения. У генотипов с медленной



положительной реакцией на бактеризацию увеличение ОЗП отмечалось, как правило, только по признаку «общая урожайность». На основе анализа данных многолетних полевых экспериментов и расчета параметра ОЗП проведена дифференциация используемых генотипов томата на группы по степени отзывчивости на обработку штаммом *Burkholderia* sp. 418. Выделены образцы с максимальной положительной отзывчивостью на бактеризацию на протяжении всего онтогенеза и с замедленной положительной реакцией.

Изучение качественного и количественного состава корневых метаболитов позволило говорить о наличии сортоспецифичности по данным признакам и корреляции их со степенью отзывчивости образцов томата на обработку штаммом *Burkholderia* sp. 418. Таким образом, сортовая специфика на бактеризацию обусловлена не только разной реакцией на дополнительное содержание доступного азота и фитогормонов, продуцируемых используемым штаммом, но и различными условиями для их биосинтеза микроорганизмами в ризосфере изучаемых генотипов. Так, высокое содержание L-триптофана в корневых экссудатах могло способствовать увеличению содержания ИУК в ризосфере определенного генотипа и тем самым определять характерное для ауксинов ростостимулирующее действие. Выявленная сортовая специфичность корневых экссудатов томата следует использовать для формирования комплементарных ассоциаций «растение x бактерия». Отбор должен быть ориентирован на выделение образцов с оптимальным содержанием корневых экзаметаболических метаболитов, обеспечивающих комфортные условия для интенсивного роста численности бактерий интродуцируемого штамма в зоне ризосферы. Кроме того, необходимо учитывать полученные данные о том, что у генотипов с относительно низкой в стерильных условиях корневой экссудацией (Калинка, Линия 164) инокуляция микроорганизмами приводила к значительному усилению выделения корневых метаболитов, что потенциально может обеспечивать успешное взаимодействие бактерий-интродуцентов с растением.

Таким образом, проведенные исследования подтверждают возможность использования генетической изменчивости томата и микроорганизмов для создания взаимовыгодных растительно-микробных ассоциаций, эффективность которых определяется уровнем интеграции метаболических процессов у партнеров.

Исследования проведены в рамках задания «Генетический анализ растительно-микробного взаимодействия у томата» ГППИ «Новые биотехнологии» и совместного проекта с Всероссийским научно-исследовательским институтом сельскохозяйственной микробиологии РАСХН в рамках БРФФИ-РФФИ «Роль генотипа томата в формировании устойчивых растительно-микробных ассоциаций».

## Влияние селенита натрия на морфогенез клеточной культуры *Saussurea orgaadayi*

The effect of sodium selenite on the morphogenesis of *Saussurea orgaadayi* cell culture

Чигинцова А.Е., Головацкая И.Ф., Бойко Е.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет,  
634050 пр. Ленина, 36, г. Томск, Россия

+7 3822 529765, [golovatskaya.irina@mail.ru](mailto:golovatskaya.irina@mail.ru)

Современная биотехнология включает в себя обширную группу направлений, одним из которых является производство с помощью организмов и культивируемых клеток биологически активных соединений и лекарственных препаратов. Культуры клеток редких и уязвимых видов лекарственных растений позволяют заместить природное сырье, сохраняя биоразнообразие. Они служат источниками продуктов вторичного метаболизма, имеющих медицинское применение. Они являются адекватной моделью для изучения метаболизма и его регуляции в клетках и тканях целого растения, а также для выяснения механизмов устойчивости растений к различным экзогенным факторам.

Среди факторов внешней среды особое место занимают микроэлементы, которые необходимы для нормального функционирования организма человека и животных. Одним из них является селен. Он привлекает особое внимание исследователей вследствие существования обширных территорий с его недостатком. Селен входит в состав специфических селенопротеинов человека: глутатионпероксидазы, селенопротеина Р, 5-йодотирониндейодиназы, тиоредоксинредуктазы, поэтому он отвечает за каталитические реакции распада перекиси водорода в клетке, нейтрализует токсическое действие тяжелых металлов (свинца и ртути), поддерживает окислительно-восстановительный гомеостаз в клетке, влияет на метаболизм йода. В растительном организме селен участвует в антиоксидантной защите, влияя на его устойчивость к разному рода стрессам, и, прежде всего к окислительному стрессу, вызванному УФ-облучением, гербицидами, гипотермией, засолением и старением. Менее изучена роль этого микроэлемента в ростовых процессах растений, а поскольку растения используют в пищу и они различаются по способности накапливать селен, то особенно важно изучение его функций в растительном организме, обеспечивающих накопление биомассы.

Целью наших исследований явилось изучение действия селенита натрия на морфогенез клеточной культуры *Saussurea orgaadayi*. Объектом исследования служила стабилизированная культура *S. orgaadayi* Khan. & Krasn. Горькуша оргаадай – многолетнее растение сем. *Asteraceae*, является узлокальным эндемиком небольших высокогорных территорий (субальпийский пояс), занесенным в список охраняемых видов в Красные книги Тывы и Алтая со статусом “Уязвимый вид”. Широкий спектр вторичных метаболитов обеспечивает важное фармакологическое значение видов рода *Saussurea*.

Регуляцию роста каллусной культуры клеток *in vitro* изучали по изменению сырой и сухой биомассы во время культивирования без (контроль) и с селенитом натрия (опыт). Кривая роста по сырой массе у контрольной каллусной культуры имела S-образный вид. Добавление 1 нМ селенита натрия в питательную среду незначительно активировало ростовой индекс на 5 и 10 сут с последующим сохранением темпов роста на уровне контроля до 15 сут. Дальнейший рост культуры клеток замедлялся. Ингибирование роста сырой массы опытной культуры обуславливалось торможением накопления ею сухого вещества, поскольку оводненность клеток в культуре с селенитом натрия была в два раза выше, чем в контроле.

Цитологические исследования морфологии каллусной культуры показали присутствие мелких, средних и крупных клеток разной формы: округлых, эллипсоидных и вытянутых. Не зависимо от состава питательной среды у культуры вытянутых клеток было меньше, чем округлых и эллипсоидных. Добавление селенит-иона увеличило на 14% число вытянутых клеток по сравнению с контролем. Селенит натрия увеличил в культуре число мелких и средних округлых клеток (соответственно на 12 и 7%) и мелких эллипсоидных (на 8%), но уменьшил число крупных клеток этих форм. При этом округлые и эллипсоидные клетки имели более мелкие размеры на селените по сравнению с контролем, в противоположность этому, вытянутые клетки были более крупными (средние из них были больше по объему на 7%, тогда как крупные – на 47%). Можно предположить, что в присутствии селенит-ионов увеличивалась скорость происходящих в данный момент процессов: делящиеся клетки завершали активнее процессы деления, тогда как растущие клетки активно растягивались. Суммарный объем клеток (объем клеток с учетом их количества) на среде с селенит-ионами превосходил контроль у округлых клеток мелкого и среднего размера (на 10–14%) и вытянутых клеток мелкого и крупного размера (соответственно на 50 и 120%). Однако объем, занимаемый одной средней клеткой, на селените был на 11% меньше контроля.

Таким образом, показано, что изменение микроэлементного состава питательной среды за счет селенита натрия влияло на динамику роста каллусной культуры *Saussurea orgaadayi*, как за счет накопления сухой массы, так и обводненности клеток. Селенит натрия замедлял прирост сырой массы культуры на 20 сутки культивирования, влияя на рост отдельных клеток и их морфологию.

## Заочное участие

Размножение *in vitro* исчезающего лекарственного растения  
*Hyoscyamus muticus* L.

*In vitro* propagation of the endangered medicinal plant *Hyoscyamus muticus* L.

Абделмаксуд В.М.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, ул.  
Кремлевская, 18, Казань, Россия

+7 843 2337826, +7 843 2337814, wallamohamed68@gmail.com

Лекарственное растение из семейства Пасленовых – *Hyoscyamus muticus* L. (*H. muticus* L.) известно благодаря содержанию тропановых алкалоидов. *H. muticus* L. постепенно вырождается в Египте в современных условиях из-за быстрого развития индустриализации. Этот факт определяет наши попытки найти биотехнологические методы повышения эффективности размножения ценного растения в целях его сохранения.

Был разработан эффективный метод регенерации растений из прорастающих в лабораторных условиях семян *H. muticus* L. Семена были получены на сельскохозяйственном факультете университета Аль-Азхар (Египет). Для стерилизации семян *H. muticus* L. был применен NaOCl в различных концентрациях и с различной продолжительностью действия.

После стерилизации семена были высажены на твердую базовую среду солей и витаминов, с добавлением 100 мг/л миоинозитола и 30 г/л сахарозы с 2,5 г/л фитагеля. Далее побеги помещали на среду Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением кинетина (КН) в различных концентрациях, с целью исследования влияния КН на микроразмножение побегов после четырех пересевов. Побеги, образовавшиеся на этапе микроразмножения (длиной около 3-5 см), переносили на среды МС с солями и витаминами, с добавлением 30 г/л сахарозы и 2,7 г/л фитагеля, проводили обработку ауксинами индолил-3-масляной кислоты (ИМК),  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК) или двумя сразу, контролируя рост.

Вновь вырастающие части стебля помещали на среды МС, усиленные различными концентрациями 6-бензиладенина (1,0-3,0 мг/л) и КН (1,0-3,0 мг/л) отдельно или в сочетании с 2iP (0,5 мг/л). Это было вызвано стремлением оценить способность различных гормональных комбинаций стимулировать рост эксплантов *H. muticus* L. *in vitro*.

Самый высокий процент выживаемости (100%) был получен, при обработке эксплантов 1,5%-ным раствором NaOCl в течение 10 минут.

Максимальное количество побегов на экспланте (в среднем, 8,20 шт., со средней длиной 1,37 см) было получено при посеве на среду МС, содержащую 1,0 мг/л КН без других компонентов, через 4 недели. Количество побегов экспланта при пересевах на ту же среду постепенно возрастало, до четвертого пересева. Укоренение побегов было достигнуто на среде МС, дополненной 1,0 мг/л ИМК.

Таким образом, данные, полученные по итогам исследования, имеют важное значение для достижения максимально высокой регенерации исчезающего вида *H. muticus* L. при минимальной концентрации регуляторов роста.

## Перспективы использования клеточной культуры *Vaccinium* spp. Prospects using cell culture on the *Vacinium* spp.

Райян Г.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, ул.  
Кремлевская, 18, Казань, Россия

+7 843 2337826, +7 843 2337814, [gamil\\_raian306@yahoo.com](mailto:gamil_raian306@yahoo.com)

Голубика вид листопадных кустарников из рода Вакциниум (*Vaccinium* spp.) семейства Вересковые (*Ericaceae*) – ценная в пищевом и фармацевтическом отношении ягодная культура. Полезные свойства голубики не только издавна знакомы народным лекарям, но также признаны современной официальной медициной.

Обзор данных литературы показал, что голубика имеет много преимуществ и обладает антимикробным, противовирусным, противоопухолевым действием, полезна при диабете, фиброзе печени, эректильной дисфункции, эффективна при профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Вещества, содержащиеся в ягодах, помогают предупреждать развитие болезни Альцгеймера, способствуя улучшению передачи сигналов в клетках головного мозга, таким образом, предотвращая умственную недостаточность, имеют омолаживающие свойства, из-за стабилизации клеточной мембраны.

Голубика имеет высокую питательную ценность и является богатым источником антиоксидантов, таких как – фенолов, флавоноидов, антоцианов, проантоцианидинов, по этой причине на нее возрастает спрос на пищевых и фармацевтических рынках.

В последнее время возрастает спрос на посадочный материал. Повышенный интерес к выращиванию голубики объясняется не только ее большой пищевой и лекарственной ценностью, но и уменьшением объемов заготовок в результате сокращения площадей дикорастущих ягодников вследствие антропогенного воздействия. Одной из особенностей многих сортов *Vaccinium* spp. является их невысокая способность к воспроизводству при традиционных способах размножения и в связи с этим все большее значение приобретает использование для этих целей биотехнологических подходов. Известно, что использование современного метода клонального микроразмножения растений в культуре *in vitro* может служить цели получения высококачественного посадочного материала в большом количестве при возможности проведения работ круглый год и экономии площадей для выращивания.

Использование методов размножения голубики *in vitro* может иметь большое значение для крупномасштабного производства этой ягодной культуры.

Оценка возможности использования метода ускоренного старения семян для прогнозирования внутривидовых различий по длительности сохранения жизнеспособности семян проса

Evaluation of the possibility for using the method of accelerated seed ageing to predict differences in longevity in millet genetic diversity

Сафина Г.Ф.<sup>1</sup>, Филипенко Г.И.<sup>1</sup>, Силаева О.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И.Вавилова». Ул.Б.Морская, д.42, Санкт-Петербург, Россия

+7 812 314-77-14, [g.safina@mail.ru](mailto:g.safina@mail.ru)

<sup>2</sup> Филиал федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И.Вавилова» «Кубанский генетический банк семян». Пос. Ботаника, Гулькевичский р-н, Краснодарский край, Россия

[soi51.s@yandex.ru](mailto:soi51.s@yandex.ru)

Ускоренное старение семян представляет собой тест, позволяющий выявить различия в качестве образцов, даже если они имеют одинаковую всхожесть. Исходя из того, что семена лучшего качества должны лучше храниться, метод ускоренного старения используют для прогнозирования сравнительной долговечности образцов, закладываемых на хранение. Встречаются исследования, в которых на основании результатов ускоренного старения делаются выводы о генетически обусловленных различиях между образцами по способности к длительному хранению. Цель данной работы – оценить возможность использования метода ускоренного старения семян для прогнозирования внутривидовых различий по длительности сохранения жизнеспособности семян при хранении.

Материалом исследования служили образцы семян проса из коллекции ВИР, имеющие разное географическое происхождение. Сравнивали изменения всхожести образцов семян, выращенных в 1976 году на Устимовской опытной станции в Полтавской области и хранившихся длительное время в Кубанском хранилище ВИР, и тех же образцов семян проса из коллекции ВИР, выращенных на Екатерининской опытной станции в Тамбовской области в 2013 году и подвергнутых ускоренному старению.

Хранение семян осуществлялось в Кубанском хранилище ВИР (ныне Филиал «Кубанский генетический банк семян») при +4°C в герметично закрытой таре. Контроль всхожести в процессе хранения проводили в 1988, 1993 и в 2005 годах. Ускоренное старение семян состояло в их предварительном увлажнении до влажности, близкой к критической, и дальнейшей экспозиции в герметично закрытых пенициллиновых пузырьках объемом 10 мл (по 100 семян в каждом) в термостате при температуре 37°C. Определение всхожести проводили еженедельно.

При хранении в Кубанском хранилище у большинства образцов проса всхожесть семян в течение первых 20 лет сохранялась практически на исходном уровне. Однако в 2005 году (после почти 30 лет хранения) она резко упала. Причем наблюдались значительные различия между образцами – значения всхожести колебались от 0 до 42%. Это свидетельствует о внутривидовых различиях между образцами семян проса по способности к длительному хранению (возможно, связанных с их различным географическим происхождением), т.к. все остальные факторы, оказывающие существенное влияние на долговечность семян при хранении, были одинаковы. Семена были выращены в одном месте, имели близкие значения исходной влажности и всхожести, хранились в одинаковых условиях.

В опытах по ускоренному старению также были обнаружены значительные различия между образцами проса по скорости снижения всхожести. Однако дольше сохраняли высокие значения всхожести семян не те образцы, что лучше перенесли длительное хранение. С одной стороны, это, скорее всего, связано с тем, что образцы, хранившиеся в Кубанском хранилище, и образцы, подвергнутые ускоренному старению, были выращены в разных местах. С другой стороны, это ставит под вопрос правомочность прямого экстраполирования результатов ускоренного старения на длительное хранение. Подобное сомнение могло бы быть разрешено прямым экспериментом, когда одни и те же семена используют для ускоренного старения и закладывают на длительное хранение. Но такая работа требует преемственности поколений ученых.

В целом результаты исследования, проведенного на генетически разнообразных образцах семян проса из коллекции ВИР, позволяют заключить, что на основании одного только ускоренного старения нельзя прогнозировать внутривидовые различия по способности семян к длительному хранению.

Эффект условий восстановления роста и низкотемпературной иммобилизации на жизнеспособность инкапсулированных фрагментов бородачатых корней

Effect of regrowth conditions and low-temperature immobilization on viability of encapsulated hairy roots fragments

Соловьева А.И., Степанова А.Ю.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева Российской академии наук, 127276, ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия

+7 499 977-92-11, +7 499 977-80-18, [sljova.aleksandra@rambler.ru](mailto:sljova.aleksandra@rambler.ru)

В коллекции генетически трансформированных корней Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, созданной в 1999 г, в настоящий момент насчитывается 27 видов растений, относящихся к 11 семействам. Основную часть данной коллекции составляют корни ценных лекарственных растений, у которых биосинтез различных физиологически активных вторичных соединений происходит в подземной части. Такой растительный материал в условиях *in vitro* сохраняет способность к образованию корнеспецифичных низкомолекулярных метаболитов на уровне, сопоставимом с их содержанием в корнях целых растений. Важными преимуществами культуры генетически трансформированных корней перед суспензионными и каллусными культурами является их генетическая и биохимическая стабильность. Однако поддержание растущей коллекции связано с большими затратами труда и риском бактериальной контаминации с последующей гибелью ценных корневых культур. Одним из самых простых способов решения данной проблемы является заключение корней в альгинатные капсулы с получением, так называемых искусственных семян (ИС). Кроме того, инкапсулирование позволяет перевозить корневую культуру на дальние расстояния.

В нашей работе мы исследовали влияние инкапсулирования и хранения при 4°C фрагментов генетически трансформированных корней и условий «проращивания» и на жизнеспособность эксплантов. В качестве модельных объектов использовали корневые культуры *Sophora korolkowii* Dieck ex Koehne, *Rauvolfia serpentina* L. (Benth.), *Lupinus polyphyllus* L. и *Linum usitatissimum* L., принадлежащих к четырем различным семействам. Часть полученных ИС проращивали, другую выдерживали при 4°C в темноте в течение шести недель. «Проращивание» ИС проводили на среде Гамборга в темноте и на свету (уровень освещен ия 30-35μE/m<sup>2</sup>·с в области ФАР и фотопериодом 18/6 ч (свет/темнота)) при 25°C. Долю проросших «семян» учитывали каждые пять дней в течение шести недель.

ИС разных видов, не подвергавшиеся хранению при пониженной температуре, значительно отличались друг от друга по всхожести и темпам прорастания на свету и в темноте. Из четырех исследуемых культур максимальной всхожестью (до 98% в темноте) и темпами прорастания обладали «семена», полученные из корней *R. serpentina*. У ИС *S. korolkowii* всхожесть была несколько ниже и составила 82% при освещении, 71% - в темноте. Наибольшая



чувствительность к наличию света во время прорастания инкапсулированных фрагментов корней была отмечена у *L. usitatissimum*. В темноте оба показателя были существенно выше, всхожесть достигала 77% (в темноте - 50%). Самая низкая всхожесть была зарегистрирована у ИС *L. polyphyllus* (31%, как на свету, так и в темноте). Однако после иммобилизации ИС при 4°C у трех из четырех культур значительно падала жизнеспособность. В случае *L. polyphyllus* наблюдали стимуляцию прорастания в условиях отсутствия освещения. Вероятно, изменение состава альгинатной оболочки позволит повысить жизнеспособность корневых эксплантов *S. korolkowii*, *R. serpentina* и *L. usitatissimum* после низкотемпературной иммобилизации.

## Получение ультрасухих семян масличных культур, пригодных для длительного хранения

### Preparation of ultra-dry oilseeds suitable for long-term storage

Филипенко Г.И., Забегаева О.Н., Баранова Е.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И.Вавилова». Ул.Б.Морская, д.42, Санкт-Петербург, Россия

+7 812 314-77-14, [g.filipenko@vir.nw.ru](mailto:g.filipenko@vir.nw.ru)

Низкая влажность ортодоксальных семян является одним из основных условий их длительного хранения. Стандарты генбанков рекомендуют подсушивание семян перед низкотемпературным хранением в герметически закрытой таре до 3-7% в зависимости от культуры. Работы, направленные на получение еще более сухих (ультрасухих) семян, которые предположительно смогут долго храниться даже в комнатных условиях, без использования низкотемпературных хранилищ, представляют большой научный и практический интерес. Однако стоит помнить, что чрезмерная потеря воды может привести к деструктивным изменениям мембран, макромолекул и т.п. Для каждой культуры предел, до которого может быть снижена влажность семян без потери жизнеспособности, связан с их морфологическими особенностями и биохимическим составом. Кроме того, при работе с ультрасухими семенами важно учитывать, что они могут находиться в состоянии вторичного покоя, и перед проращиванием их надо вывести из этого состояния.

Целью данного исследования было изучить возможность подсушивания семян масличных культур (на примере рыжика) до ультранизких значений влажности без снижения их всхожести. В прошлые годы на зерновых культурах было показано, что подсушивание образцов в термостате при температуре 40°C до ультранизких значений влажности вело к падению всхожести семян. Гораздо более успешным было использование силикагеля в соотношении 10 объемов силикагеля на 1 объем семян, при этом для достижения результата хватало 7-ми недель. Поэтому было решено провести опыты по подсушиванию семян рыжика в течение 8-ми недель при соотношении семена: силикагель = 1:10, контролируя всхожесть в процессе подсушивания.

Объектом нашего исследования были семена рыжика (к-4134 и к-4177), полученные из отдела генетических ресурсов масличных и прядильных культур ВИР и имевшие влажность соответственно  $5,5 \pm 0,2\%$  и  $5,7 \pm 0,3\%$ . Семена были выращены на Екатерининской опытной станции ВИР в 2013 г. Перед подсушиванием силикагелем семена были расфасованы в марлевые мешочки по 100 семян в каждом. Мешочки положили в стеклянные банки объемом 0,1 л по четыре в каждую банку из расчета, что 200 семян пойдут на определение всхожести, а 200 семян – на определение влажности. Опыт проводили в двукратной повторности. Семена в банках засыпали

индикаторным силикагелем, затем банки герметично закрывали. Все операции по упаковке семян проводили в сушильной камере. Упакованные семена оставляли в помещении лаборатории при температуре около 18°C. Еженедельно в сушильной камере производилась замена использованного силикагеля в банках на свежий, хотя окраска силикагеля оставалась еще яркой. Как показали предыдущие опыты на зерновых культурах, если этого не делать, подсушивание идет значительно медленнее. Определения влажности и всхожести подсушиваемых семян проводили, используя стандартные методики, каждую неделю в течение двух месяцев. Перед определением всхожести семена рыжика 4 часа выдерживали открытыми в лабораторном помещении (температура воздуха 18°C, относительная влажность воздуха 60%). Этого оказалось достаточно, чтобы семена рыжика увлажнились, и предшествующее подсушивание не сказывалось на их всхожести, тогда как семенам зерновых культур в опытах прошлых лет для этого требовалось не менее суток экспонирования в лабораторных условиях.

В конце 7-й недели опыта влажность образцов семян рыжика к-4134 и к-4177 составляла соответственно  $1,3\% \pm 0,2$  и  $1,4\% \pm 0,2$  и в дальнейшем не снижалась. Видимо, это минимальные значения влажности семян рыжика, которые можно достичь при использованном довольно мягком режиме сушки. Поскольку многолетний опыт лаборатории длительного хранения генофонда растений ВИР свидетельствует о том, что равновесная влажность семян масличных культур при сушке в стандартных условиях (20°C и 12%-ная относительная влажность воздуха) колеблется от 3,3 до 5,8%, значения 1,3% и 1,4% смело могут быть отнесены к ультранизким.

Всхожесть образцов рыжика в процессе опыта не изменилась.

Таким образом, на примере рыжика было показано, что подсушивание семян масличных культур при помощи силикагеля (соотношение семена: силикагель = 1:10) в герметически закрытой таре при комнатной температуре в течение 7-ми недель, сопровождаемое еженедельной заменой силикагеля на свежий, позволяет снизить влажность семян до ультранизких значений без снижения их всхожести. Получение ультрасухих семян, обладающих высокой жизнеспособностью – первый шаг к изучению возможности использовать технологию хранения ультрасухих семян для сохранения генетических ресурсов растений.

## Фитохимический анализ фенольных соединений в надземных побегах зверобоя продырявленного

### Phytochemical analysis of phenolic compounds in the aerial shoots of *Hypericum perforatum*

Хуснетдинова Л.З., Дубровная С.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казань, Россия

+7 843 2337826, +7 843 2337814, husnetdinova.l@mail.ru

Зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.) – многолетнее травянистое растение. Зверобой применяется в традиционной и народной медицине, поскольку является ценным лекарственным растением, содержащим биологически активные вещества. Среди биологически активных веществ растительного происхождения особое место занимают фенольные соединения.

В Татарстане зверобой произрастает повсеместно, редко образуя большие заросли. Встречается по лугам, полянам и опушкам лесов. В целях рационального использования ресурсов лекарственного растения важно изучить влияние эколого-ценотических и климатических условий на образование и накопление биологически активных соединений в сырьевой фитомассе. В связи с этим, образцы надземных побегов *H. perforatum* были собраны в Бавлинском, Тукаевском и Дрожжановском районах лесостепной зоны Республики Татарстан в различных растительных сообществах: на остепененных лугах, опушках сосновых и широколиственных лесов.

Растительное сырье заготавливали в июле 2014 г. в фазу цветения растения в природных популяциях. Для исследования химического состава *H. perforatum* были использованы воздушно-сухие образцы надземных побегов.

Качественными анализами растительных экстрактов *H. perforatum* было подтверждено наличие компонентов фенольной природы – флавоноидов и антраценпроизводных.

Изучение количественного содержания флавоноидов и антраценпроизводных в сырье *H. perforatum* показало, что наибольшая концентрация соединений отмечается у растений, произрастающих в условиях открытых сообществ, на лугах различного режима увлажнения. Содержание флавоноидов колеблется от  $3,618 \pm 0,016\%$  до  $4,984 \pm 0,039\%$ , антраценпроизводных – от  $0,252 \pm 0,070\%$  до  $0,382 \pm 0,057\%$ , во всех исследованных районах – Бавлинском, Тукаевском и Дрожжановском.

Накопление фенольных соединений находилось в зависимости от района сбора сырья. Отмечено, что все проанализированные образцы, собранные в Бавлинском районе, во всех типах растительных сообществ значительно уступают по содержанию флавоноидов и антраценпроизводных в надземной части *H. perforatum* по сравнению с растениями из аналогичных типов растительных сообществ других районов лесостепной зоны Республики Татарстан.

Таким образом, показано, что накопление фенольных соединений в надземных побегах *H. perforatum*, произрастающего в растительных сообществах лесостепной зоны Республики Татарстан зависит от эколого-ценотических и климатических условий произрастания.

## Системный подход к проблеме сохранения генетических ресурсов растений

System approach to problem of plant genetic resources conservation

Шелухова Н.А.

ФГБНУ АФИ, 195220 Гражданский пр., 14, г. Санкт-Петербург, Россия  
+7 812 5341900, [nsheloukhova@agrophys.ru](mailto:nsheloukhova@agrophys.ru)

Активный поиск лучших парадигм природопользования захватывает разные области науки о растениях: физиологии, генетики, биотехнологии, биофизики, биохимии, давая начало экофизиологии, экологической генетике, агроэкологии, экологической анатомии растений. В селекции растений испытание генотипов напрямую связано с задачами экологии и её отраслями: аутоэкологией, демэкологией, синэкологией, биогеоценологией, биосферологией. Для дальнейшего развития растениеводства необходимы фундаментальные биологические исследования, ориентированные на разработку ресурсоэнергоэкономных, экологически безопасных и экономически оправданных технологий возделывания сельскохозяйственных культур путём мобилизации генетических ресурсов растений с помощью биотехнологических методов, новейших методов селекции, конструирования адаптивных агроэкосистем и агроландшафтов. В основе этих исследований лежат разработки теории и методологии создания новых технологий селекции сельскохозяйственных культур по количественным признакам продуктивности, устойчивости, качества продукции с учетом перспектив и последствий глобальных изменений климата. На этой базе создаются высокопродуктивные сорта и гибриды сельскохозяйственных растений, обладающих комплексной устойчивостью к вредителям и болезням, разрабатываются научные основы семеноводства сортов и гибридов нового поколения с комплексом ресурсосберегающих технологий выращивания высоких урожаев семян в процессе репродуцирования.

Имеются данные о снижении уровня адаптивности у интенсивных сортов, сильной вариабельности урожайности в производстве. А.А. Жученко (1980), Э.Д. Неттевич (1991), Д.А. Долгушин и др. (1989), E.J. Wibberley, (1989), Л.В. Березин (2000), Н.И. Терпугова и др. (2000) сообщают, что повышенный агрофон при селекции в ранних поколениях приводит к «оазисной» оценке селекционного материала. Разница между уровнем урожайности в ГСИ и на производстве значительна и имеет тенденции к росту. В связи с этим необходимо по-новому рассмотреть теорию сортоиспытания. Главной задачей сейчас является не столько дальнейшее повышение урожайности новых сортов, сколько достижение стабильности ее по годам за счет повышения уровня устойчивости сортов к любым стрессовым факторам внешней среды и совершенствования технологий их возделывания. Селекция на устойчивость к лимитирующим факторам среды рассматривается в мире в настоящее время и как один из основных путей снижения затрат при возделывании растений. В связи с указанными выше задачами совершенствования теории сортоиспытания необходимо по-новому рассматривать физиологию

онтогенеза, опираясь на системный подход в исследовании биологических объектов и мобилизацию доступных генетических ресурсов растений. Количественная биология занимает центральное место в исследованиях продукционного процесса. Для исследования количественных признаков растений необходимо учитывать действие среды, которая также характеризуется количественными показателями. Агрофизические методы позволяют охарактеризовать развитие системы «растение – среда» с помощью математических моделей, применения биофизических приборов и средств исследования. Материалом агрофизических исследований являются виды культурных растений или модельные объекты. Эксперименты проводят в полевых условиях и в регулируемой агроэкосистеме (РАЭС). Регулируемые условия используют как для решения задач экологической паспортизации генетических образцов растений, так и на первых этапах селекции. В процессе селекции генетический материал испытывают под воздействием экстремальной среды для определения генотипов наиболее устойчивых к этим воздействиям. Генотипы проходят испытания в селекционном питомнике, конкурсное (КСИ), производственное, экологическое (ЭСИ) и государственное (ГСИ). Такие приёмы способствуют объективной оценке генотипов в испытаниях, однако являются многолетними и дорогостоящими. До сих пор не удаётся сократить сроки испытаний. При переходе к ускоренным испытаниям необходимо обеспечить объективность оценки генотипов. Поиск для этой цели новых биометрико-математических методов с большей чувствительностью сопряжён с применимостью этих методов, во-первых, в ограниченном диапазоне условий, во-вторых, с необходимостью учитывать неполные матрицы данных, которые характерны для многолетних испытаний. Для успешного проведения оценки средней величины и стабильности хозяйственно-полезных признаков растений необходима оптимизация условий испытания в целом. Разрабатываются теория и методики полевых опытов и анализа опытных данных. В этих разработках учитываются комплексы действующих факторов среды и их взаимодействий. Одним из факторов, существенно влияющих на результирующую продуктивность растений, является качество диаспор: генеративных или вегетативных. Предварительный анализ проблемы сравнительных испытаний генотипов показал, что не только за счёт подбора биометрических методов может быть создана усовершенствованная концепция сравнительных испытаний генотипов. Предложены и теоретически обоснованы новые критерии качества семян, используемых для проведения ускоренного испытания генотипов (УИГ). Развитие новых технологий сохранения генетических ресурсов растений должно опираться на методы математического моделирования и анализа больших массивов количественных данных как сельскохозяйственно-ценных признаков растений, так и количественных характеристик среды, в которых эти признаки могут быть достижимыми. Только при таком подходе удастся обнаружить условия позволяющие достичь длительного сохранения семенами своего потенциала.

## Индекс авторов

Aleynova O.A. ....	120	Арефьева А.А. ....	426
Al-Hamadani H.N. ....	191	Артемьева А.М. ....	91, 98
Beckett R.P. ....	241	Архипов Д.В. ....	93, 123, 193
Bunce J.A. ....	310	Архипов М.В. ....	88
Chykun P. ....	224	Архипова Т.Н. ....	171
Demidchik V. ....	224	Астафурова Т.П. ....	264
Kolbanov D. ....	224	Ахиярова Г.Р. ....	153
Милковски К. ....	32	Бабак О.Г. ....	94, 146, 169
Nasirov M. ....	310	Бакирова Д.Р. ....	84
Sokolik A. ....	224	Балекин А.Ю. ....	393
Sosan A. ....	224	Балке Г.У. ....	32
Straltsova D. ....	224	Балнокин Ю.В. ....	243, 251, 293
Subramaniam S. ....	224	Банкин М.П. ....	55
Tadege M. ....	180	Баранова Е.А. ....	442
Zhabinskii V. ....	224	Баранова Е.Н. ....	341
Zhang F. ....	180	Баташева С.Н. ....	96
Zhmurko V.V. ....	191	Батова Ю.В. ....	285
Абделмаксуд В.М.А. ....	436	Бачурина Г.П. ....	155
Абдрахимов Ф.А. ....	96	Безрукова М.В. ....	185, 321
Авальбаев А.М. ....	150, 291, 317	Белозерская Т.А. ....	155
Аверчева О.В. ....	243	Беляев Д.В. ....	243, 293
Авксентьева О.А. ....	189	Бердичевец И.Н. ....	146
Агадуллина А.И. ....	52, 54	Бердникова О.С. ....	323, 331
Агеева М.В. ....	52, 54, 280, 370	Беренсен Ф.А. ....	98
Азрахш М. ....	122	Бёрнер А. ....	183
Азарин К.В. ....	261	Бессолицына Е.К. ....	138, 216
Азизов И.В. ....	325	Бибикова Т.Н. ....	233
Акулинкина Д.В. ....	319	Билова Т.Е. ....	32, 75, 207
Акулов А.Н. ....	179	Бинюков В.И. ....	274
Алейнова О.А. ....	111	Биркемайер К. ....	32
Алиева Г.П. ....	304	Битаришвили С.В. ....	100
Аллагулова Ч.Р. ....	150, 291, 317	Бободжанова Х.И. ....	412
Алпатьева Н.В. ....	76	Богданова Е.С. ....	300
Андреев Я.А. ....	252	Бойко Е.В. ....	157, 266, 434
Анисимов А.А. ....	160	Бойкова Н.В. ....	390
Анисимова И.Н. ....	76, 207	Бондурко И.А. ....	207
Антипина О.В. ....	304	Боронь А.К. ....	136
Антонова О.Ю. ....	417, 422	Борцова О.А. ....	392
Апаликова О.В. ....	417	Браух Д. ....	32



Бревин Н. ....	382	Воронков А.С. ....	199, 268
Бубякина В.В. ....	353, 358	Ву Вьет Зунг .....	35
Бударин С.Н. ....	33	Высоцкая Л.Б. ....	166, 181
Булычев А.А. ....	86, 233	Высоцкая О.Н. ....	393
Бургутин А.Б. ....	164	Гавриленко Т.А. ....	417, 422
Буренина А.А. ....	264	Гаврилова В.А. ....	76
Бурмистров Л.А. ....	207	Галибина Н.А. ....	37, 64, 125, 245
Бурмистрова Н.А. ....	83	Галин И.Р. ....	185
Буров А.М. ....	408	Галушко А.С. ....	392
Бурханова Г.Ф. ....	103	Ганчева М.С. ....	108
Бурыгин Г.Л. ....	395, 397, 408	Гарипова С.Р. ....	366, 378
Бухарина И.Л. ....	362	Гарифуллина Д.В. ....	366
Буцанец П.А. ....	327	Гасымова Ф.И. ....	325
Бушуева А.В. ....	311	Генерозова И.П. ....	327
Быстрова Е.И. ....	60	Гераськин С.А. ....	100, 229
Валиулина А.Ф. ....	364	Гесслер Н.Н. ....	155
Василиженко С.Б. ....	214	Гетман И.А. ....	130, 164
Васильева И.В. ....	353, 358	Гильманова Р.И. ....	317
Васильченко М.С. ....	189	Гнеушева И.А. ....	403
Вафина Г.Х. ....	41	Гобова А.Е. ....	129
Ведяшкина О.А. ....	102	Гоголев Ю.В. ....	39, 109, 138, 370
Венжик Ю.В. ....	227	Гоголева Н.Е. ....	39, 370
Вержук В.Г. ....	430	Голованова Т.И. ....	364
Вертебный В.Е. ....	392	Головацкая И.Ф. ....	157, 266, 434
Веселов Д.С. ....	159, 308	Головко Г.К. ....	384
Веселов С.Ю. ....	153, 159	Головко Т.К. ....	204
Веселова С.В. ....	103, 171, 388	Гончарова Э.А. ....	420
Вессйоханн Л.А. ....	32	Гончарук Е.А. ....	268, 283
Ветчинникова Л.В. ....	105	Горелкин П.В. ....	233
Видершпан А.Н. ....	157	Горина С.С. ....	109, 138, 216
Викторова Л.В. ....	241	Горчакова Ю.А. ....	268
Виссенберг К. ....	129, 136	Горшков В.Ю. ....	39, 370
Вишняков А.Э. ....	402	Горшков О.В. ....	179, 280
Власов П.В. ....	297	Горшкова Т.А. ....	30, 52, 54, 168, 280
Власова Н.С. ....	206	Градов О.В. ....	79
Воденеев В.А. ....	295	Грайфенхаген У. ....	32
Войцеховская О.В. ....	107, 121, 218, 220, 222	Гречкин А.Н. ....	46, 109, 113, 138
Волкова Л.А. ....	393	Гришина Т.В. ....	32
Волкова П.Ю. ....	100, 229	Гроза Н.В. ....	155
Волобуева О.Г. ....	428	Грошева Е.А. ....	349
Воробейков Г.А. ....	415	Губаев Р.Ф. ....	39, 370
Воробьев В.Н. ....	370	Гулевич А.А. ....	341
		Гурьянов О.П. ....	241

Гусакова Л.П. ....	88	Захарова Е.В. ....	199
Давыдова А.Н. ....	56	Захожий И.Г. ....	300, 384
Даминова А.Г. ....	39, 370	Звонарев С.Н. ....	220
Даминова А.И. ....	175	Зиновьева С.В. ....	278
Данилова Е.Д. ....	270	Зотикова А.П. ....	264
Данилова М.Н. ....	58, 276	Зубова М.Ю. ....	281
Демидчик В.В. ....	107, 218, 220, 222	Зуев Е.В. ....	88
Демина О.С. ....	372	Ибрагимова Н.Н. ....	52, 54, 280
Демченко К.Н. ....	115	Иваков А.А. ....	136
Дерябин А.Н. ....	329	Иванов В.Б. ....	60
Дзюбенко Е.А. ....	195	Иванов И.И. ....	153, 166
Дзюбенко Н.И. ....	195, 430	Иванов И.М. ....	142
Дидио А. ....	32	Иванов Р.С. ....	41
Добрякова К.С. ....	121	Иванов Ю.В. ....	162
Додуева И.Е. ....	108, 122, 402	Иванова К.А. ....	376, 382
Дорофеев В.Ю. ....	197	Иванова Т.В. ....	333, 343
Дорошенко А.С. ....	58, 276	Иванова Э.А. ....	41
Дреничев М.С. ....	130	Иванчина Н.В. ....	366
Дубровина А.С. ....	111, 120, 249	Игнатенко А.А. ....	227
Дубровная С.А. ....	444	Измайлов С.Ф. ....	414
Дунаева С.Е. ....	417, 422	Ильин А.С. ....	160
Душков В.Ю. ....	374	Ильина Е.Л. ....	115
Евкайкина А.И. ....	121	Ильина И.А. ....	68
Евсеева Н.В. ....	395, 408	Ильина Т.М. ....	46
Емельянов В.В. ....	145, 177, 259	Исламов Б.Р. ....	370
Епринцев А.Т. ....	50	Исламова Н.А. ....	362
Ермилова В.С. ....	113, 138, 216	Кабил Ф.Ф. ....	266
Ермилова Е.В. ....	226	Казакова А.С. ....	334
Ерофеев А.С. ....	233	Казакова Е.А. ....	229
Ершова А.Н. ....	323, 331	Казанцева В.В. ....	283
Ефимова М.В. ....	270, 272	Казнина Н.М. ....	285
Жернаков А.И. ....	386	Калашникова Е.А. ....	33
Жигалова Т.В. ....	243	Каменева И.А. ....	410
Жигачева И.В. ....	274	Канаш Е.В. ....	183
Жуков В.А. ....	386	Карабицина Ю.И. ....	76
Жуковская Н.В. ....	60	Караваева А.В. ....	61
Забегаетова О.Н. ....	442	Каргаполова К.Ю. ....	395, 397
Забродин Д.А. ....	276	Каримова Ф.Г. ....	317
Загоскина Н.В. ....	281, 283	Карначук Р.А. ....	197
Загуменникова Т.Н. ....	33	Карпец Ю.В. ....	337, 339
Зайко Л.Н. ....	33	Карташов А.В. ....	162
Залуцкая Ж.М. ....	226	Касаткин М.Ю. ....	117, 134
Зарудинова Р.Ф. ....	414	Килеева М.С. ....	302

Кильчевский А.В.....	94, 169	Кузнецова Н.Ф. ....	231
Кирисюк Ю.В. ....	220, 222	Кузнецова Э.И. ....	333, 343
Кирпичникова А.А. ....	119	Кулуев Б.Р. ....	308
Кирюшкин А.С. ....	115	Кумахова Т.Х. ....	86
Киселев К.В. ....	111, 120, 249, 256, 258	Кунакова Н.А. ....	33
Киселева Г.К. ....	61, 68	Куприянова В.В. ....	347
Кистол М.К. ....	63, 89	Курамшина З.М. ....	289, 426
Клименко Н.С. ....	43, 417	Куренина Л.В. ....	341
Климов В.В. ....	306	Кучаева Л.Н. ....	35
Климова Е.А. ....	121	Кучер Е.Н. ....	202, 214
Клушевская Е.С. ....	231	Лазарева Е.А. ....	237
Клюкова М.С. ....	386	Лайдинен Г.Ф. ....	285
Ковалева Л.В. ....	199	Ланцев В.Л. ....	201
Кожевникова А.Д. ....	287	Лапина Т.В. ....	226
Колачевская О.О. ....	164	Лапшин П.В. ....	281
Колбек И. ....	222	Ларикова Ю.С. ....	56, 372
Колесников Л.Е. ....	88	Ларская И.А. ....	168
Коломейчук Л.В. ....	270	Ласточкин В.В. ....	259
Колупаев Ю.Е. ....	337, 339	Лебедев В.Н. ....	415
Комарова А.В. ....	86, 233	Лебедева М.А. ....	122, 407
Кондратьев М.Н. ....	33, 56, 372	Лезжов А.А. ....	237
Кононенко Н.В. ....	341	Лемешева В.С. ....	81
Коробова А.В. ....	166	Лизунова И.Е. ....	33
Костина Е.Е. ....	395, 397	Литягина С.В. ....	127
Костина О.В. ....	66	Ловассер У. ....	183
Костылев П.И. ....	261	Ломин С.Н. ....	93, 123, 164, 193
Кочерина Н.В. ....	91, 183	Лоусон Т. ....	222
Кочкин Д.В. ....	142	Лубянова А.Р. ....	185, 321
Кравцова А.В. ....	183	Луговая А.А. ....	337
Красавина М.С. ....	83	Луговская А.А. ....	202
Креславский В.Д. ....	235, 239, 306	Лукаткин А.А. ....	102
Круглова Н.Н. ....	185	Лукаткин А.С. ....	102
Крыжко А.В. ....	398	Лукашева Е. ....	32
Крылова В.В. ....	414	Лунькова Н.Ф. ....	83
Кудоярова Г.Р. ....	153, 166, 181, 308	Лутова Л.А. ....	108, 122, 137, 180, 407
Кудрявцев Д.В. ....	392	Любимов В.Ю. ....	235, 239
Кудрякова Н.В. ....	58, 276	Макаренко М.С. ....	261
Кузнецов В.В. ....	58	Макеева И.Ю. ....	206
Кузнецов Вл.В. ....	272	Максимов И.В. ....	103, 171
Кузнецова А.П. ....	313	Максимов Т.Х. ....	356
Кузнецова Е.Б. ....	76	Малина Р.Б. ....	345
Кузнецова Л.Н. ....	398	Мальков С.А. ....	162
		Маракаев О.А. ....	400, 405

Маркина В.О.....	289	Нилова И.А.....	247
Маркова О.В.....	366, 378	Новикова Г.В.....	26, 140
Масленникова Д.Р.....	150, 291	Новицкая Л.Л.....	37, 125
Маслова С.П.....	204	Носов А.В.....	140
Маталин Д.А.....	293	Носов А.М.....	142
Матора Л.Ю.....	408	Нужная Т.В.....	103, 171
Мацкевич В.С.....	220	Нюкалова М.А.....	70
Медведев С.С.....	43, 55, 129, 132	Обручева Н.В.....	127
Медведева Ю.В.....	197	Огнева З.В.....	249, 256
Мертвищева М.Е.....	44	Огородникова А.В.....	46
Миль Е.М.....	274	Огороднова У.А.....	173
Минибаева Ф.В.....	241, 302	Одицова Т.И.....	252
Мирская Г.В.....	183	Орлова С.Ю.....	44
Митташ Ю.....	32	Ословский В.Е.....	130
Михайлов А.Л.....	347	Осмоловская Н.Г.....	32, 35
Михайлов С.Н.....	130	Остроухова М.В.....	226
Михайлова В.Б.....	360	Охлопкова Ж.М.....	210
Михайлова И.Д.....	102	Павлов А.В.....	430
Михайлова Ю.В.....	119, 145	Павловская Н.Е.....	403
Мокшина Н.Е.....	280	Паничкин Л.А.....	83
Морозов С.Ю.....	237	Панова Г.Г.....	392
Мотылева С.М.....	44	Панфилова О.Ф.....	71
Мошков И.Е.....	26, 304	Папонова С.А.....	402
Мощенская Ю.Л.....	37, 64, 125	Паудель Г.....	32
Мудрилов М.А.....	311	Паутов А.А.....	402
Муравник Л.Е.....	66	Пахомова В.М.....	175
Мухитова Ф.К.....	46	Пашковский П.П.....	162
Мухтарова Л.Ш.....	109, 113, 138	Пендинен Г.И.....	417, 424
Мягких Е.Ф.....	398	Перк А.А.....	353, 355, 358
Мякушина Ю.А.....	123, 164, 193	Петров К.А.....	355
Мясоедов Н.А.....	243, 333	Петрова Н.В.....	84, 317
Невмержицкая Ю.Ю.....	173, 347, 349	Петрова О.Е.....	39, 216, 370
Неделяева О.И.....	243	Пикуненко М.М.....	86
Некрашевич Н.А.....	94, 169, 432	Пильщикова Н.В.....	71
Ненько Н.И.....	61, 68	Пинаев А.Г.....	386
Нестеров В.Н.....	300	Плотников А.А.....	150, 291, 321
Нечаева Т.Л.....	281	Плотникова Ю.И.....	295
Никерова К.М.....	37, 125, 245	Пожванов Г.А.....	43, 55, 129
Никитинская Т.В.....	94, 169	Полякова М.А.....	403
Никиткин В.А.....	266	Пономарев А.Г.....	353, 358
Никиткина Э.Г.....	266	Пономарева Л.В.....	392
Никишина Т.В.....	393	Попов В.Н.....	304
Николаева Т.Н.....	351	Попова Л.Г.....	251, 293

Прияткин Н.С. ....	88	Словохотов И.Ю. ....	146
Прудникова О.Н. ....	297	Смирнова Е.А. ....	341
Пузанский Р.К. ....	48, 177	Смирнова Е.О. ....	109, 138, 216
Пузина Т.И. ....	201, 206	Смирнова Ю.В. ....	426
Рабаданова К.К. ....	107	Смоликова Г.Н. ....	55, 70, 132
Радченко Е.Е. ....	76, 207	Смолич И.И. ....	222
Райко М.П. ....	66	Соболева А. ....	32
Райян Г.А. ....	437	Соколик А.И. ....	220, 222
Ракитин В.Ю. ....	140, 297	Соловьев А.Г. ....	237
Ракитина Т.Я. ....	297	Соловьева А.Е. ....	91
Рахманкулова З.Ф. ....	58	Соловьева А.И. ....	440
Реденкова А. ....	403	Соловьёва А.И. ....	393
Репкина Н.С. ....	227, 285, 298	Сорокань А.В. ....	171
Рогожин Е.А. ....	73, 252	Сосан А. ....	222
Родькина М.В. ....	400	Софронова В.Е. ....	356
Розенцвет О.А. ....	300	Спивак С.Г. ....	146
Романов Г.А. 93, 123, 130, 164, 193		Спринчану Е.К. ....	393
Романюк Д.А. ....	145, 177	Стадничук И.Н. ....	73
Ромицына М.В. ....	405	Степанов С.А. ....	117, 134
Румянцева Н.И. ....	179	Степанова А.Ю. ....	440
Русakov Д.В. ....	183	Степанова Г.В. ....	388
Рябова Д.Н. ....	207	Стрельцова Д.Е. ....	222
Рябовол В.В. ....	302	Сулима А.С. ....	386
Савельева Е.М. ....	130	Сундырева М.А. ....	306
Савченко Т.В. ....	306	Супрун А.Р. ....	256
Сазанова К.В. ....	35	Сурова Л.М. ....	295, 311
Салмин С.А. ....	209	Суслов Д.В. ....	136
Самородова А.П. ....	407	Сухов В.С. ....	295, 311
Самохина В.В. ....	220	Схляхо Т.В. ....	68
Сафина Г.Ф. ....	438	Схат Х. ....	287
Свистуненко Д. ....	222	Табаленкова Г.Н. ....	300
Селиванов А.А. ....	304	Таланова В.В. ....	227, 298
Селиванова Н.В. ....	50	Тараканов И.Г. ....	160
Сельдими́рова О.А. ....	185	Тарасова Н.Б. ....	370
Серегин И.В. ....	287	Тараховская Е.Р. ....	32
Серова Т.А. ....	380	Тараховская Е.Р. ....	81
Сибгатуллина Г.В. ....	179	Татарина Т.Д. ....	353, 358
Сивцева С.В. ....	210	Творогова В.Е. ....	122, 137, 180, 407
Силаева О.И. ....	438	Терентьева Е.В. ....	408
Синькевич И.А. ....	127	Тимофеева Г.В. ....	199
Синькевич М.С. ....	254	Тимофеева О.А. ....	173, 347, 349
Славохотова А.А. ....	252	Титов А.Ф. ....	105, 227, 247, 285, 315
Слепцов Н.Н. ....	160	Титова Н.В. ....	212

Тихонов К.Г.	306	Хейнлейн М.	237
Тихонович И.А.	386	Хомяков Ю.В.	392
Ткаченко О.В.	395, 397, 408	Хрипач В.А.	272
Томилова С.В.	142	Христенко В.С.	111
Топоркова Я.Ю.	109, 113, 138, 216	Христин М.С.	306
Топчиева Л.В.	247, 285	Хуснетдинова Л.З.	444
Трифорова Т.В.	241	Цветкова Н.П.	392
Тропин И.В.	73	Цыганов В.Е.	28, 376, 380, 382
Трофимова О.И.	168	Цыганова А.В.	382
Трунова Т.И.	329	Цыдендамбаев В.Д.	333, 343
Тюнин А.П.	258	Часов А.В.	241
Тютерева Е.В.	107, 220	Черепко М.М.	417
Удалова Ж.В.	278	Чернов В.Е.	424
Ульяновская Е.В.	61	Чернова Т.Е.	52, 54
Уразбахтина Н.А.	366	Чесноков Ю.В.	91, 98, 183
Урманцева В.В.	393	Четвериков Ф.Е.	402
Усатов А.В.	261	Чигинцова А.Е.	434
Усманов А.Р.	233	Чиков В.И.	96, 144
Ухатова Ю.В.	417, 422	Чиркова Т.В.	259
Фархутдинов Р.Г.	159	Чичко А.А.	220
Фатеев Д.А.	183	Чмелева С.И.	202
Федина Е.О.	317	Чмелёва С.И.	214
Федоренко А.Г.	261	Чэнь Т.	119, 145
Федорин Д.Н.	50	Шаварда А.Л.	43, 48, 66
Федорина Я.В.	386	Шаймуллина Г.Х.	349
Федорова К.А.	150, 291, 317	Шакирова Ф.М.	150, 185, 291, 317, 321
Федорова Ю.А.	137, 180	Шарипова Г.В.	159, 308
Федяев В.В.	159	Шарова Е.И.	75
Феоктистова А.В.	166, 181	Швиденко Н.В.	339
Филипенко Г.И.	438, 442	Шелоухова Н.А.	446
Филиппович С.Ю.	155	Шелякин М.А.	384
Филиппьева Ю.А.	395	Шематорова Е.К.	146
Фогт Т.	32	Шерстнева О.Н.	295, 311
Фоменков А.А.	140	Шерудило Е.Г.	315
Фролов А.	32	Шестакова В.В.	313
Хайруллин Р.М.	366	Шеховцова Н.В.	400, 405
Хайруллина М.М.	386	Шибаета Т.Г.	315
Халилуев М.Р.	146	Широглазова О.В.	132
Хамидуллина Л.А.	96	Ширшикова Г.Н.	235
Ханды М.Т.	142	Шишкану Г.В.	345
Харитонашвили Е.В.	243	Шишова М.Ф.	26, 48, 119, 145, 177, 388
Харчук О.А.	63, 89		
Хасан А.К.	272		

Шмарев А.Н.....	235	Юлдашев Р.А.....	317
Шпаковский Г.В.....	146	Юрина Н.П.....	319
Шпаковский Д.Г.....	146	Юрков А.П.....	388
Штарк О.Ю.....	386	Юрченко А.А.....	293
Шубин Н.А.....	430	Яблонская Е.К.....	187
Шувалов А.В.....	293	Якоби Л.М.....	388
Шувалова А.Р.....	417	Якубовская А.И.....	410
Шувалова Л.Е.....	417, 422	Якушенкова Т.П.....	360
Шугаев А.Г.....	327	Ян Лин.....	148
Шулик В.В.....	189	Яныкин Д.В.....	306
Щеголев С.Ю.....	408	Ястреб Т.О.....	337, 339
Эрлих Н.Т.....	287	Яцевич К.К.....	169

Подписано в печать DD.MM.16

Формат 60x84/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman.

Печать офсетная. Усл. Печ. л. N

Тираж X экз. Заказ № NN. Издательство Санкт-Петербургского государственного университета. Отпечатано в типографии Издательства СПбГУ.

199004, Санкт-Петербург, 6 линия В.О., д.11 / Большой пр. В.О., д. 21.