



Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное агентство научных организаций
Федеральное агентство по рыболовству
Российская академия наук
ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет»
ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
Общество физиологов растений России



Годичное собрание Общества физиологов растений России
Международная научная конференция и школа молодых ученых

**«ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ - ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ОСНОВА
ИННОВАЦИОННЫХ АГРО- И ФИТОБИОТЕХНОЛОГИЙ»**



Annual meeting of Russian Society of Plant Physiologists
International scientific conference and School for young scientists

**«PLANT PHYSIOLOGY AS A THEORETICAL BASIS FOR
INNOVATIVE AGRICULTURE AND PHYTOBIOTECHNOLOGIES»**

Калининград
2014

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное агентство научных организаций
Федеральное агентство по рыболовству
Российская академия наук
ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет»
ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
Общество физиологов растений России

Годичное собрание Общества физиологов растений России

**Физиология растений – теоретическая
основа инновационных агро- и
фитобиотехнологий**

**Международная научная конференция
и школа молодых ученых**

**Материалы
Часть I**



Annual meeting of Russian Society of Plant Physiologists
**Plant Physiology as a Theoretical Basis
for Innovative Agriculture and
Phytobiotechnologies**

**International scientific conference
and School for young scientists**

**Proceedings
Volume I**

**Калининград - Kaliningrad
2014**

Международная научная конференция и школа молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Россия, Калининград, 2014): материалы: в 2-х ч. / под ред. Е.С. Роньжиной. – Калининград: Аксиос, 2014. – Ч. I. - 414 с.

International scientific conference and School for young scientists «Plant Physiology as a Theoretical Basis for Innovative Agriculture and Phytobiotechnologies» (Russia, Kaliningrad, 2014): Proceedings: in 2 vol. / ed. E.S. Ron'zhina. – Kaliningrad: Axios, 2014. – Vol. I. - 414 p.

В материалах Международной научной конференции «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» обсуждаются новые данные по молекулярно-физиологическим основам роста, развития и продуктивности на разных уровнях организации растительного организма, экологической физиологии растений; важное место в научной программе отведено вопросам, связанным с развитием агро- и фитобиотехнологий, научно-обоснованными подходами к повышению количества и улучшению качества урожая, современными и технологиями переработки продукции растениеводства. Часть I посвящена рассмотрению молекулярно-физиологических основ роста, развития и продуктивности растений, являющихся основами инновационных агро- и фитобиотехнологий.

Сборник материалов конференции предназначен для научных работников, преподавателей, студентов и аспирантов высших учебных заведений биологического и сельскохозяйственного профилей.

Ил. 109, табл. 56, список литературы – 824 наименования
Fig. 109, tab. 56, ref. 824.

Ответственный редактор - РОНЬЖИНА Елена Степановна
Edited by RON'ZHINA Elena S.

Издано при финансовой поддержке РФФИ, проект № 14-04-06045.

УДК 581.1(082)+63(082)
ББК 28.571я43+41я43
ISBN 978-5-9172-6074-7 (весь выпуск)
ISBN 978-5-9172-6075-4 (I том)

© Коллектив авторов, 2014 г.

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Калининградский государственный технический университет», 2014 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	
INTRODUCTION 12
ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ (ORGANIZING COMMITTEE) 13
НАУЧНЫЙ (ПРОГРАММНЫЙ) КОМИТЕТ SCIENTIFIC (PROGRAM) BOARD 14
Раздел 1. МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РОСТА, РАЗВИТИЯ И ПРОДУКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ	
Chapter 1. MOLECULAR-PHYSIOLOGICAL BASIS OF PLANT GROWTH, DEVELOPMENT AND PRODUCTIVITY 15
Андреев И.М., Крылова В.В., Зартдинова Р.Ф., Измайлов С.Ф. Активация кальмодулином Ca ²⁺ -проницаемого ионного канала в симбиосомной мембране корневых клубеньков бобов 16
Ахатова А.Р., Касимова Р.И., Яруллина Л.Г. Экспрессия генов патоген-индуцируемых белков в растениях пшеницы при обработке индукторами устойчивости и инфицировании возбудителем твердой головни <i>Tilletia caries</i> 19
Баик А.С., Синетова М.А., Миронов К.С., Пожидаева. Е.С. Пролиновые аминопептидазы вовлечены в биогенез белков у фотосинтезирующих организмов 22
Бакакина Ю.С., Колеснева Е.В., Содель Д.Л., Дубовская Л.В., Вологовский И.Д. Содержание циклического гуанозинмонофосфата в листьях как маркерный признак устойчивости растений к действию абиоти- ческих и биотических факторов 25
Быкова Е.А., Лабунская Е.А., Чуб В.В. Морфология и ультраструктура апикальной меристемы побега фасциированных мутантов гороха 28
Быстрова Е.И., Жуковская Н.В., Ракитин В.Ю., Иванов В.Б. Роль этилена в регуляции перехода клеток покоящегося центра к активным делениям в отрезанных корнях кукурузы 31
Виноградов Н.С., Данилова М.В., Кудрякова Н.В., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н. АБК-зависимая регуляция экспрессии генов-гомологов <i>aal</i> (<i>abscisic acid activated 1</i>) у мутантов <i>Arabidopsis thaliana</i> с нарушениями синтеза или трансдукции сигнала АБК 33
Войтенко Л.В., Мусатенко Л.И. Фитогормоны, контролирующие рост и развитие репродуктивной почки хвоща полевого 36
Гарипова С.Р., Валеева (Иванчина) Н.В., Сахабутдинова А.Р., Хайруллин Р.М. Фитогормональный ответ растений гороха на инокуляцию эндифитными бациллами и ризобиями 39
Гармаш Е.В., Грабельных О.И., Велегжанинов И.О., Боровик О.А., Коковкина Е.В., Далькэ И.В., Войников В.К., Головки Т.К. Световая регуляция нефосфорилирующих путей дыхания митохондрий в зеленеющих клетках листа пшеницы 42

Головацкая И.Ф. Зеленый свет регулирует жизнедеятельность растений	45
Головацкая И.Ф., Комарова У.А., Соловьева Е.В. Зависимость морфогенеза <i>Arabidopsis thaliana</i> от длины периода действия селективного света	47
Грушевская М.С., Стриж И.Г. Участие <i>clavata</i> генов в росте первичного корня <i>Arabidopsis</i>	49
Данилова М.Н., Кудрякова Н.В., Дорошенко А.С., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н. Рецептору цитокинина АНКЗ принадлежит ведущая роль в контроле экспрессии пластидных генов <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
Дубровина А.С., Киселев К.В., Христенко В.С., Алейнова О.А. Экспрессия сплайсированных вариантов мРНК генов <i>CDPK3a</i> и <i>CDPK9</i> в винограде амурском <i>Vitis amurensis</i> Rurp.: истинный и ложный альтернативный сплайсинг	55
Зорина А.А., Бедбенев В.С., Новикова Г.В., Паничкин В.Б., Лось Д.А. Участие серин-треониновых протеинкиназ в ответе на холодовой стресс цианобактерии <i>Synechocystis</i> sp. pcc 6803	58
Казахмедов Р.Э. Особенности роста и развития ягод винограда на ранних этапах эмбриогенеза	60
Киселев К.В., Дубровина А.С., Тюнин А.П., Огнева З.В. Исследование мутагенеза ДНК растений <i>Arabidopsis thaliana</i> в зависимости от возраста и стадии вегетации растения	63
Киселева Г.К., Ненько Н.И., Ульяновская Е.В., Каравеева А.В. Физиолого-биохимические критерии адаптационной устойчивости к засухе сортов яблони различной ploидности	66
Клименко (Сидоренко) Е.С., Харитонашвили Е.В. Нитрит – регулятор роста боковых корней <i>Zea mays</i> L.	69
Ковалева Л.В., Захарова Е.В., Тимофеева Г.В., Ракитин В.Ю. Фитогормоны, этилен и АБК, и полярный рост мужского гаметофита в прогамной фазе оплодотворения у петунии	72
Ларская И.А. Исследование процесса формирования адвентивных корней. Влияние эффекторов	75
Лысенко Е.А., Клаус А.А., Шибытко Н.Л., Кузнецов В.В. Поступление кадмия в хлоропласты растений и его влияние на экспрессию генов и активность фотосинтетического аппарата	78
Максимов Н.М., Брейгина М.А., Ермаков И.П. Мембранные эффекты пероксида водорода в субпротопластах из пыльцевых трубок <i>Nicotiana tabacum</i> L.	81
Медведев С.С., Тарасова О.В., Танкелюн О.В. Мембранный механизм функционирования фосфатидных кислот как вторичных посредников растительной клетки	84
Никитин А.В., Измайлов С.Ф. Действие нитрата на ферменты Диссимиляции сахарозы гороха посевного в раннем онтогенезе	86
Новикова Г.В. Передача сигналов фитогормонов и NO: диалог неизбежен	89
Огородникова А.В., Мухитова Ф.К., Гречкин А.Н. Биосинтез оксипиринов в плаунке <i>Selaginella martensii</i>	91

Подмарьков В. Г., Измайлов С.Ф. Действие нитрата на метаболизм крахмала в семядолях гороха посевного	94
Репкина Н.С., Таланова В.В., Титов А.Ф., Букарева И.В. Экспрессия гена глутатионсинтетазы и устойчивость растений пшеницы к действию низких температур и кадмия	97
Руденко Н.Н., Игнатова Л.К., Ветошкина Д.В., Федорчук Т.П., Иванов Б.Н. Влияние условий выращивания <i>Arabidopsis thaliana</i> на экспрессию генов карбоангидраз хлоропластов	99
Салмин С.А. Влияние регуляторов роста на ранние стадии формирования корневой системы у проростков кукурузы	102
Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю., Круглова Н.Н. Иммунолокализация цитокининов в клетках каллусов пшеницы на начальных этапах органогенеза <i>in vitro</i>	105
Синетова М.А., Червены Я., Валледор Л., Шерман, Л., Маркелова А.Г., Недбал Л. Циркадные и ультрадианные метаболические ритмы одноклеточной diaзотрофной цианобактерии <i>Cyanothece</i> sp. atcc 51142	108
Синькевич И.А., Литягина С.В., Обручева Н.В. Характеристика плазмалеммной H ⁺ -АТФазы в прорастающих семенах конского каштана	110
Соловьева Е.В., Головацкая И.Ф. Мелатонин–зависимый рост проростков <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Neunh. на селективном свете	113
Стадничук И.Н., Тропин И.В. Эволюционное происхождение хлоропластов	115
Трекозова А.В., Высоцкая Л.Б., Кудоярова Г.Р. Гормональная регуляция роста корней растений арабидопсиса при дефиците фосфора в питательном растворе	118
Трофимова О.И., Ларская И.А. Исследование видовой специфичности олигосахаридов клеточной стенки растений, обладающих ризогенным эффектом	120
Трутнев А.Ф. Новый взгляд на переход световой энергии в химическую в процессе фотосинтеза	123
Тюрин А.А., Мустафаев О., Бердичивец И.Н., Садовская Н.С., Павленко О.С., Фадеев В.С., Голденкова-Павлова И.В. Регуляторные коды эффективной трансляции и стабильности белков при гетерологичной экспрессии генов в растениях	126
Шерстнева О.Н., Сурова Л.М., Катичева Л.А., Гущина Е.В., Сухов В.С. Вход протонов как возможный механизм влияния переменного потенциала на фотосинтез высших растений	129
Часов А.В., Викторова Л.В., Миннибаева Ф.В. Предполагаемые механизмы образования АФК апопластными пероксидазами растений	132
Чень Т., Прокопьева Ю.П., Емельянов В.В., Шишова М.Ф. Регуляция активности протонных помп плазмалеммы и тонопласта на транскрипционном уровне	135
Чиков В.И., Баташева С.Н. Управление продукционными процессами растений через изменение активности апопластной инвертазы	137

Шишова М.Ф. Многообразие регуляции протонных помп плазмалеммы и тонопласта в ходе роста растяжением	140
Шуляковская Т.А., Ильинова М.К. Реакция мембранных липидов листьев <i>Betula pendula</i> Roth на удобрения	143
Якушенкова Т.П., Скачовски А.М., Рут Г.Р., Стрзалка К. Энергообмен у мутантных форм <i>Arabidopsis thaliana</i> по основным фоторецепторным белкам	146
Gieczewska K. Aggregation of LHCII Depends on Lipid Surrounding	149
Vashchenko V.F., Serkin N.V. Morphoses Induced by Ethylene for Adaptive Resistance Barley to Lodging and Productivity	153
Vedenicheva N.P. Cytokinin Seasonal Fluctuations in <i>Equisetum arvense</i> L. Organs	156
Раздел 2. АГРО- И ФИТОБИОТЕХНОЛОГИИ		
Chapter 2. AGRICULTURE AND PHYTOBIOTECHNOLOGIES	159
Агеева М.Н., Брилкина А.А. Влияние размера листового экспланта и соотношения фитогормонов в среде на органогенез гороха <i>in vitro</i>	160
Али-заде А.М., Шукюров Э.С., Джафарова А.Б., Алирзаева Э.Г., Ширвани Т.С. Потенциал галофитов для реабилитации маргинальных земель Кура-Аразской низменности	162
Алиева З.М. Протекторное действие эпибрасинолида на изолированные органы растений при действии хлорида натрия и сульфата меди	165
Андрюшечкина Г.В., Фатеева Е.В., Мокшин Е.В., Лукаткин А.С. Введение <i>Neottianthe cucullata</i> (L.) Schlechter в культуру <i>in vitro</i>	168
Баранова Е.Н., Халилуев М.Р., Данилова С.А., Куренина Л.В., Гулевич А.А., Юрьева Н.О., Ралдугина Г.Н. Цитологические эффекты функционирования гетерологичных генов в трансгенных растениях	170
Бободжанова Х.И., Абдулалишоева С.Ф., Бабаева С.Х., Ясаулова Ш.К. Размножение местных сортов винограда в культуре <i>in vitro</i>	172
Богданова Е.С., Розенцвет Ю.Е., Гребенкина Т.М., Нестеров В.Н. Фиторесурсный потенциал растений сем. <i>Plantaginaceae</i>	175
Бойкова Н.В., Ткаченко О.В., Евсеева Н.В., Матора Л.Ю., Бурьгин Г.Л., Авдеева Е.С., Щеголев С.Ю. Ассоциативное взаимодействие мериклонов картофеля и бактерий <i>Azospirillum brasilense</i> sp 245 в условиях <i>in vitro</i> и <i>ex vitro</i>	178
Буянкин Н.И., Краснопёров А.Г. Получение зеленого корма с высоким содержанием белка в позднеосенний период и сохранение плодородия почвы Калининградской области	181
Вагапова Т.И., Сидорова Т.Н., Долгов С.В. Разработка методов регенерации и трансформации растений персика подвоя «Bailey»	184
Володина Н.А., Головацкая И.Ф. Селенит натрия регулирует рост клеточной культуры <i>Saussurea orgaadayi</i>	187
Воробьев Н.В., Скаженник М.А., Ковалев В.С., Пшеницына Т.С. Продукционный процесс у сортов риса	189

Воротников Б.Ю. Синергетика янтаря как основа фитобиотехнологий	192
Великсар С.Г., Леманова Н.Б., Тудораке Г.Ф. Совместное использование ассоциаций ризосферных бактерий и микроэлементов в виноградном питомниководстве	194
Высоцкая О.Н. Методы криосохранения апикальных меристем и посткриогенное восстановление культуры земляники <i>in vitro</i>	197
Высоцкая Л.Б., Кузьмина Л.Ю., Рябова А.С., Габбасова И.М., Мелентьев А.И. Способность фосфатмобилизирующих бактерий продуцировать фитогормоны и их влияние на рост растений пшеницы	200
Головко Т.К., Далькэ И.В., Григорай Е.Е., Буткин А.В., Табаленкова Г.Н., Захожий И.Г. Световая регуляция фотосинтеза и эффективность запасаения энергии в моно- и многоярусных фитоценозах светокультуры овощных растений	203
Григорович Л.М., Проворова О.Н. Эффективность применения гербицидов в посевах кукурузы (<i>Zea mays</i> L. ssp. <i>mays</i>) на зерно в условиях Калининградской области	206
Гуревич А.С., Афанасьева К.С. Влияние правильной пирамиды на прорастание семян ячменя	208
Данилова С.А., Баранова Е.Н., Гулевич А.А., Кунакова Е.А., Ралдугина Г.Н. Ультраструктурная организация хлоропластов в транспластомных растениях табака	211
Дейнеко Е.В. Трансгенные растения – продуценты субъединичных кандидатных съедобных вакцин	214
Долгих Ю.И., Седов К.А., Соловьева А.И., Терешонок Д.В. Влияние ионов меди на геном культивируемых <i>in vitro</i> клеток <i>Arabidopsis</i>	216
Евдокимова О.В., Кабашникова Л.Ф., Савченко Г.Е. Содержание салициловой кислоты, активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов в листьях ячменя при обработке салицилатами	218
Жигачева И.В., Генерозова И.П., Бинюков В.И., Миль Е.М., Албантова А.А. Морфологические характеристики митохондрий проростков гороха в условиях сочетанного действия недостатка влаги, умеренного охлаждения и обработки препаратом мелафен	221
Казанцева В.В., Фесенко А.Н., Загоскина Н.В. Образование фенольных соединений в проростках диплоидного и тетраплоидного сортов гречихи (<i>Fagopyrum esculentum</i> L.)	224
Казахмедов Р.Э. Модели применения регуляторов роста в виноградарстве	227
Казахмедов Р.Э., Гаджимустапаева Е.Г., Пулатова К.Д. Влияние физиологически активных соединений гормональной природы на всхожесть семян старой репродукции растений рода <i>Brassica</i>	230
Карагезов Т.Г., Асадова С.Ш., Мамедова М.Г., Азизов И.В. Морфогенез и органогенез шафрана (<i>Crocus S.L.</i>) <i>in vitro</i>	232
Каташов Д.А., Хрянин В.Н. Влияние фитогормонов и селената натрия на активность ферментов антиоксидантной системы растений рапса (<i>Brassica napus</i>)	235

Киризий Д.А., Стасик О.О. Влияние карбоксилатного комплекса биогенных металлов, созданного с помощью нанотехнологий, на фотосинтез листьев пшеницы 238
Кириченко Е.В. Формирование урожая растениями сои при бинарной инокуляции семян 241
Клементьева А.А., Складар Ю.А., Пушин А.С., Тимербаев В.Р., Долгов С.В. Генетический анализ трансгенных растений яблони, содержащих шпилечную конструкцию комплиментарную второму экзону гена АСО яблони 244
Козаченко И.С., Григорович Л.М. Роль фунгицида карамба в повышении продуктивности агроценозов рапса (<i>Brassica napus</i> L.) в условиях Калининградской области 247
Колачевская О.О., Алексеева В.В., Сергеева Л.И., Ломин С.Н., Гетман И.А., Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И., Романов Г.А. Влияние гена биосинтеза ауксина <i>TMS1</i> на клубнеобразование картофеля <i>in vitro</i> 249
Кондрацкая И.П., Столепченко В.А., Нам И.Я., Васько П.П., Фоменко Т.И. Создание и идентификация высокопродуктивных форм кормовых злаковых трав с использованием геномной биотехнологии 252
Костюкова Ю.А., Румянцева Н.И. Ультраструктура клеток неморфогенного каллуса гречихи татарской 255
Кочетов А.А., Соловьева А.Е. Биологически активные вещества стевии (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) 258
Кравец А.В., Николаева Д.Л. Влияние гуминовых препаратов из торфа на фотосинтетическую деятельность, урожайность и качество ярового ячменя 261
Кривошеева А.Б., Юрьева Н.О., Беляев Д.В., Холодова В.П. Содержание ионов калия в картофеле со встройкой трансгена <i>HVNHX2</i> при повышенном уровне NaCl 264
Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Оценка статуса зародыша пшеницы для разработки фитобиотехнологий на основе каллусогенеза <i>in vitro</i> 267
Курылева А.Г., Курылев М.В. Урожайность и фотосинтетическая деятельность сортов яровой пшеницы в зависимости от сроков применения фунгицидов 270
Ладыгин В.Г. Физиолого-биохимическая характеристика мутанта – суперпродуцента ζ- каротина <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 273
Ломин С.Н., Кривошеев Д.М., Стеклов М.Ю., Архипов Д.В., Шмюллинг Т., Романов Г.А. Уточнение лиганд-связывающих свойств рецепторов цитокининов по данным, полученным в новой тест-системе с мембранами растений 276
Макеева И.Ю., Анিকেева А.Э. Влияние кофейной кислоты на ростовые показатели побегов возобновления <i>Solanum tuberosum</i> 279
Мамонов Л.К., Завадский В.А., Есенбаева Г.Л. Разработка новых биотехнологических подходов для создания БАД 282

Мамонов Л.К., Сарсенбаев Б.А., Карпенюк Т.А., Ахметова Д.Ш., Кустова Т.А., Мурсалиева В.К., Есенбаева Г.Л. Некоторые фитохимические и фитотерапевтические свойства <i>Chamaenerion angustifolium</i> (L.) Scop. и их практическое использование 285
Мацай Н.Ю. Изменение физиологических параметров растений <i>Hordeum vulgare</i> при использовании препарата на основе азотфиксирующих бактерий 288
Меледина Т.В., Борисова Е.В., Ибрагимов Р.С. Влияние осмоляльности питательной среды на синтез вторичных метаболитов дрожжами <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 291
Минич А.С., Минич И.Б., Пермязова Н.Л., Иваницкий А.Е., Буценко Е.С. Изменение урожайности <i>Cucumis sativus</i> в защищенном грунте под термическими полиэтиленовыми пленками 294
Мостякова А.А., Владимиров К.В., Владимиров В.П. Влияние регуляторов роста и расчетных доз удобрений на продуктивность картофеля в лесостепи среднего Поволжья 297
Муслимова З.Г., Фараджов М.Ф., Мамедли С.А. Влияние гуматов Na, K, Fe на активность антиоксидантной системы γ -облученных проростков пшеницы 300
Оганнисян В.Г., Меледина Т.В., Прохорчик И.П. Экспериментальная оценка эффективности работы варочного оборудования для минипивоварен 303
Панасин В.И., Долинина В.В., Рымаренко Д.А. Эффективность регулятора роста Ретацел на озимом рапсе 306
Панасин В.И., Долинина В.В., Рымаренко Д.А. Эффективность регулятора роста Мессидор на озимом ячмене 309
Прядехина Е.В., Юрьева Н.О., Дервягина М.Н., Голденкова-Павлова И.Н., Загоскина Н.В. Изменения в образовании фенольных соединений при действии <i>Phytophthora infestans</i> на растения картофеля, трансформированные геном $\Delta 12$ ацил-липидной десатуразы 312
Рейтер А.Е., Роньжина Е.С., Берников Л.Р. Ретарданты в системе защиты озимой пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.) 315
Русу М.М., Шишкану Г.В., Балмуш Г.Т. Машенко И.Е. Влияние мелангозида-о на пигментный комплекс и биологическую активность эндогенных регуляторов роста в листьях яблони 318
Рыбкина А.В., Григорович Л.М. Влияние фунгицидов-протравителей на развитие болезней озимой пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.) 321
Семенова А.С., Лукаткин А.С. Предобработка семян озимой ржи цитодефом снижает в растениях тяжесть окислительного стресса, индуцированного паракватом 324
Серпунина Л.Т., Сечко Н.В. Использование аронии в производстве творога 327
Сивцева С.В. Антибактериальная активность кедрового стланика северо-востока Якутии 330
Силкина О. В., Винокурова Р.И. Исследование влияния препарата диофур на содержание химических элементов в листьях салата (<i>Lactuca sativa</i> L.) 333

Слезина М.П., Коростылева Т.В., Истомина Е.А., Славохотова А.А., Рогожин Е.А., Пухальский В.А., Одинцова Т.И. Исследование антимикробных пептидов семейства <i>wamp</i> злаков 336
Соколянская Л.О., Глухова Л.Б., Плотников Е.В., Карначук О.В., Карначук Р.А. Зеленый свет влияет на рост и морфофизиологические параметры мицелия базидиальных грибов 339
Терещенко С.А., Сидачева Е.А. Влияние листовой подкормки препаратом Фертигрейн Фолиар на продуктивность растений кукурузы (<i>Zea mays</i> L.) 341
Туркин Н.И., Вульферт Е.А., Туркина О.Н. Некоторые проблемы использования субстратов при гидропонном выращивании растений 344
Соловьева А.И., Долгих Ю.И., Высоцкая О.Н. Криосохранение методом дегидратации и генетическая стабильность аспительного материала 346
Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Гаевский Н.А. Динамика фотосинтетической активности каллусных культур яровой мягкой пшеницы на селективных средах 349
Тараканов И.Г. Совершенствование технологий светокультуры растений: опыт применения светодиодных облучателей 352
Титова С.М., Митюшкина Т.Ю., Фирсов А.П., Долгов С.В. Оценка эффективности различных конструкций с геном белка оболочки вируса Б хризантем (CVB) для создания вирусоустойчивых растений 354
Титова Н.В., Шишкану Г.В. Исследование влияния натуральных стероидных гликозидов на продуктивность растений абрикоса 357
Третьяков В.О., Караушу Е.В., Воробей Н.А., Таран Н.Ю., Коць С.Я. Скрининг штаммов diaзотрофов для формирования эффективного бобово-ризобиального симбиоза <i>Glycine max</i> (L.) Merr. - <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 360
Фатеева Е.В., Андрюшечкина Г.В., Мокшин Е.В., Лукаткин А.С. Введение <i>Cypripedium calceolus</i> L. в культуру <i>in vitro</i> 363
Федураев П.В., Чупахина Г.Н., Скрыпник Л.Н. Выявление субстратных свойств салициловой кислоты при синтезе биофлавоноидов растений ржи посевной (<i>Secale cereale</i> L.) 365
Хайленко Н.А., Алтаева Н.А., Исакова А.Б., Терлецкая Н.В. Генетические основы создания форм пшеницы методами отдаленной гибридизации и эмбриокультуры 368
Чупахина Г.Н., Масленников П.В., Скрыпник Л.Н., Чупахина Н.Ю., Мальцева Е.Ю., Полтавская Р.Л., Федуреаев П.В. Растения – активные продуценты антиоксидантов как объекты биотехнологии 371
Шейко Е.А. Возможность сохранения редких видов растений в культуру <i>in vitro</i> 374
Шерудило Е.Г., Матвеева Е.М., Котова З.П. Технология предпосевной обработки семенного материала овощных культур с целью повышения их продуктивности в условиях севера 377

Широкова А.В., Лапшин П.В., Костяновский Р.Г., Крутиус О.Н., Загоскина Н.В. Изменения в образовании антоцианов в цветках петунии сорта «Snow ball» после действия мутагенов	380
Шуплецова О.Н., Широких И.Г. Клеточная селекция ячменя на устойчивость к токсичным металлам и осмотическому стрессу	382
Caus M., Dascalu A. Influence of Three Modifications of Natural Growth Regulator Reglalg on Cucumber Seeds Germination and Seedling Growth	385
Dobiesz M., Rydzyński D., Margas M., Ziółkowska A., Adomas B., Piotrowicz-Cieślak A.I. Protein in Long-Term Storage of Faba Bean (<i>Vicia faba</i> L.)	388
Fatih Er, Ahmet Sami Erol. Rhizospheric Phosphate Solubilizing <i>Pantoea agglomerans</i> LP1 Can Persist in Non-Sterile Materials in Long Term	392
Mehmet Öğüt. Wheat Growth is Dependent on the Type of Nitrogen Nutrition and Inoculation with <i>Bacillus sp.</i> #189	394
Rydzyński D., Margas M., Ziółkowska A., Dobiesz M., Adomas B., Piotrowicz-Cieślak A.I. Evaluation of Phytotoxic Activity of Ciprofloxacin towards Common Duckweed (<i>Lemna minor</i> L.) and Yellow Lupin (<i>Lupinus luteus</i> L.)	396
Rydzyński D., Margas M., Ziółkowska A., Dobiesz M., Adomas B., Piotrowicz-Cieślak A.I. The Effects of Tetracycline Concentration on Pea (<i>Pisum saivum</i> L.) and Lupin (<i>Lupinus luteus</i> L.) Seedlings	400
Ziółkowska A., Dobiesz M., Rydzyński D., Margas M., Adomas B., Piotrowicz-Cieślak A.I. Phytotoxicity of Sulfonamides Soil Pollutant to Lupin (<i>Lupinus luteus</i> L.) and Pea (<i>Pisum sativum</i> L.) Plant	404
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ ЧАСТИ I AUTHORS OF THE VOLUME I	408

ПРЕДИСЛОВИЕ INTRODUCTION

Международная научная конференция и школа молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро - и фитобиотехнологий» организована в рамках Годичного собрания общества физиологов растений России. Ее организаторами выступили Калининградский государственный технический университет, ставший радушным хозяином конференции, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, возглавляющий физиологию растений, координирующий и интегрирующий работу специалистов этого профиля в нашей стране, а также Общество физиологов растений России и его Калининградское отделение. В состав организационного и научного (программного) комитетов вошли ведущие ученые в области физиологии, биохимии, биофизики, молекулярной биологии, биотехнологии растений.

Конференция посвящена обсуждению фундаментальных проблем современной фитофизиологии и биотехнологии. Работа велась по трем секциям: секция 1 «Молекулярно-физиологические основы роста, развития и продуктивности растений», секция 2 «Экологическая физиология растений», секция 3 «Агро- и фитобиотехнологии».

В ходе работы этих секций рассмотрены новые данные по молекулярно-физиологическим основам роста, развития и продуктивности на разных уровнях организации растительного организма, экологической физиологии растений; важное место в научной программе отведено вопросам, связанным с развитием агро- и фитобиотехнологий, научно-обоснованными подходами к повышению количества и улучшению качества урожая, современными и технологиями переработки продукции растениеводства.

Научная программа включает пленарные и устные доклады, стендовые сессии, круглый стол, посвященные актуальным проблемам науки и образования, а также лекции ведущих ученых и мастер-класс по интерактивным формам и методам представления результатов научной и инновационной деятельности, проводимые в рамках школы молодых ученых. Всего в программу конференции включено порядка 50 устных докладов и лекций ведущих ученых и молодых специалистов, представляющих академические и университетские центры России, стран ближнего и дальнего зарубежья.

В настоящем сборнике материалов отражены представленные на конференции новые достижения в познании фундаментальных основ функционирования зеленого растения, инновационных фитобиотехнологий и использования этих знаний для решения глобальных проблем современности.

Конференция получила финансовую поддержку РФФИ, проект № 14-04-06045.

*Е.С. Роньжина,
ответственный редактор,
зам. председателя оргкомитета конференции*

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ

ORGANIZING COMMITTEE

Сопредседатели

Кузнецов Вл.В., д.б.н., чл.-корр. РАН, директор ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, президент Общества физиологов растений России, г. Москва, Российская Федерация

Волкогон В.А., к.э.н., ректор ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет», г. Калининград, Российская Федерация

Заместители председателя

Иванов А.В., д.э.н., проректор по научной работе ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет», г. Калининград, Российская Федерация

Романов Г.А., д.б.н., заведующий лабораторией ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Российская Федерация

Роньжина Е.С., д.б.н., заведующий кафедрой ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет», председатель Калининградского отделения Общества физиологов растений России, г. Калининград, Российская Федерация

Секретари

Гуревич А.С. (*ответственный секретарь*), к.б.н., доцент ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет», заместитель председателя Калининградского отделения Общества физиологов растений России, г. Калининград, Российская Федерация

Заринова Н.Р., к.б.н., научный сотрудник ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Российская Федерация

Гаврик А.П. (*технический секретарь*), г. Калининград, Российская Федерация

Члены

Ключко Н.Ю., к.т.н., г. Калининград, Российская Федерация

Недоступ А.А., к.т.н., г. Калининград, Российская Федерация

Петренко И.В., г. Калининград, Российская Федерация

Григорович Л.М., к.б.н., г. Калининград, Российская Федерация

Калинина Е.А., к.б.н., секретарь Калининградского отделения Общества физиологов растений России, г. Калининград, Российская Федерация

Коршикова Н.Г., к.б.н., г. Калининград, Российская Федерация

Терещенко С.А., к.б.н., г. Калининград, Российская Федерация

НАУЧНЫЙ (ПРОГРАММНЫЙ) КОМИТЕТ SCIENTIFIC (PROGRAM) BOARD

Председатель

Кузнецов Вл.В., д.б.н., чл.-корр. РАН, директор ИФР РАН, президент Общества физиологов растений России, г. Москва, Российская Федерация

Члены

Веселов А.П., д.б.н., г. Нижний Новгород, Российская Федерация

Волотовский И.Д., д.б.н., академик НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

Гамалей Ю.В., д.б.н., чл.-корр. РАН, г. С.-Петербург, Российская Федерация

Горшкова Т.А., д.б.н., г. Казань, Российская Федерация

Журавлев Ю.Н., д.б.н., академик РАН, г. Владивосток, Российская Федерация

Иванов В.Б., д.б.н., г. Москва, Российская Федерация

Кузнецов В.В., д.б.н., г. Москва, Российская Федерация

Кулаева О.Н., д.б.н., г. Москва, Российская Федерация

Ламан Н.А., д.б.н., академик НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

Лукаткин А.С., д.б.н., г. Саранск, Российская Федерация

Медведев С.С., д.б.н., г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Носов А.М., д.б.н., г. Москва, Российская Федерация

Панасин В.И., д.с.-х.н., г. Калининград, Российская Федерация

Романов Г.А., д.б.н., г. Москва, Российская Федерация

Роньжина Е.С., д.б.н., г. Калининград, Российская Федерация

Титов А.Ф., д.б.н., чл.-корр. РАН, г. Петрозаводск, Российская Федерация

Холодова В.П. к.б.н., в.н.с., г. Москва, Российская Федерация

Хрипач В.А., д.б.н., чл.-корр. НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

Хрянин В.Н., д.б.н., г. Пенза, Российская Федерация

Цыдендамбаев В.Д., к.б.н., г. Москва, Российская Федерация

Kaminski T., Prof., Dr. hab., г. Ольштын, Польша

Gruszecki W., Prof., Dr. hab., г. Люблин, Польша

Noga G., Prof. Dr., г. Бонн, Германия

Раздел 1

Молекулярно-физиологические основы роста, развития и продуктивности растений



Chapter 1

Molecular-Physiological Basis of Plant Growth, Development and Productivity

АКТИВАЦИЯ КАЛЬМОДУЛИНОМ Ca^{2+} -ПРОНИЦАЕМОГО ИОННОГО КАНАЛА В СИМБИОСОМНОЙ МЕМБРАНЕ КОРНЕВЫХ КЛУБЕНЬКОВ БОБОВ

Андреев И.М., Крылова В.В., Зартдинова Р.Ф., Измайлов С.Ф.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая 35,
г. Москва, 127276, Россия, E-mail: krylovavv@list.ru*Vicia faba*, кальмодулин, Ca^{2+} -каналы, симбиосомная мембрана**Введение**

Ионы Ca^{2+} способны включаться в трансдукцию различных сигналов, запускаемых в клетках эукариот в ответ на действие тех или иных стимулов. В роли сенсора таких сигналов может выступать кальмодулин (CaM), Ca^{2+} -связывающий белок, присутствующий как в животных, так и в растительных клетках [1, 2]. В растениях кальций участвует во многих физиологических процессах, в том числе симбиотической фиксации азота, протекающей в симбиосомах инфицированных клеток корневых клубеньков бобовых [3]. Согласно нашим результатам симбиосомы ведут себя в таких клетках как Ca^{2+} -депо, а их симбиосомная мембрана (СМ) снабжена рядом ионных транспортеров, в том числе Ca^{2+} -транслоцирующей АТФазой и верапамил-чувствительным Ca^{2+} -каналом [3]. Инфицированные клетки корневых клубеньков содержат также CaM и CaM-подобные белки, которые могут участвовать в передаче сигналов через СМ. В настоящее время, однако, функциональная роль таких белков во многом остается пока неясной. Как нами недавно обнаружено, CaM способен стимулировать активность Ca^{2+} -транслоцирующей АТФазы, функционирующей на СМ [3]. В то же время вопрос о том, является ли этот фермент единственной мишенью действия CaM в симбиосомах, остается открытым. Целью настоящей работы являлось исследование влияния CaM на активность пассивных ион-транспортирующих систем в рассматриваемой мембране симбиосом, выделенных их корневых клубеньков кормовых бобов.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на препаратах симбиосом, выделенных из корневых клубеньков кормовых бобов (*Vicia faba* L., сорт Русские чёрные), выращенных после инокуляции растений эффективным штаммом *Rhizobium leguminosarum* 501, любезно предоставленным доктором Классеном (Латвийский сельскохозяйственный университет, Елгава). Симбиосомы были выделены по методике, описанной нами ранее [3, 4]. За кинетикой кислотного сдвига рН внутри симбиосом следили по изменению дифференциальной абсорбции ($\Delta A_{492-540}$) проникающего через мембраны ΔpH -индикатора акридинового оранжевого (АО) [5]. Измерения проводили в 1-см стандартных кюветах без перемешивания в них образцов на спектрофотометре Hitachi 557 в двухволновом режиме работы прибора. За CaM-индуцированным поглощением Ca^{2+} симбиосомами следили по изменению дифференциальной абсорбции ($\Delta A_{650-700}$) арсеназо III, металлохромного Ca^{2+} -индикатора [6], проводя измерения на том же приборе. Среда инкубации симбиосом содержала 0,4 М сорбит, 20 мМ HEPES/ВТР (рН 7, 0), 2 мМ $MgSO_4$, примерно 100-200 мкг/мл общего симбиосомного белка, 12 мкМ АО или 22 мкМ арсеназо III. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [7].

Результаты и обсуждение

Первым этапом работы было изучение чувствительности к CaM пассивного кислотного сдвига рН внутри симбиосом, после помещения их в бескальциевую буферную среду. Снижение рН внутри симбиосом в данных условиях обусловлено электрогенным пассивным выходом из них ионов K^+ , приводящим к электрической поляризации СМ, то есть генерации на ней мембранного потенциала (минус внутри симбиосом), способного выступать в роли движущей силы, вызывающей движение ионов H^+ внутрь симбиосом [8]. Из данных рис. 1 видно, что добавление CaM к суспензии симбиосом в бескальциевой среде вызывает быструю

остановку процесса снижения в них рН, что предположительно свидетельствует о снятии СаМ протондвижущей силы на СМ или мембранного потенциала на мембране. Один из возможных механизмов такого действия СаМ состоит в открывании в СМ ионного канала, проницаемого для Ca^{2+} , и далее диссипации этим катионом электрической поляризации мембраны в результате его поступления внутрь симбиосом.



Рисунок 1 - Поглощение Ca^{2+} симбиосомами и блокирование его кальмодулином. Стрелками указано добавление 10 мкг/мл кальмодулина

Figure 1 - Ca^{2+} uptake by symbiosomes and blocking this process by CaM. Arrows indicate the addition of 10 $\mu\text{g/ml}$ CaM

Справедливость этой гипотезы была проверена нами в другой серии экспериментов, проведенных с использованием металлохромного Ca^{2+} -индикатора арсеназо III, позволяющего следить за изменением концентрации ионов Ca^{2+} в среде суспендирования симбиосом. Данные, представленные на рис. 2(2), свидетельствуют, что добавление СаМ к суспензии симбиосом в бескальциевой среде инициирует заметное снижение дифференциальной абсорбции арсеназо III, указывающее на СаМ-индуцированное поглощение Ca^{2+} симбиосомами. На рис. 2(1) можно также видеть, что кинетика процесса существенно замедляется после добавления к суспензии симбиосом ионов калия. Этот эффект может объясняться снижением трансмембранного градиента концентрации ионов K^+ через СМ и тем самым электрической поляризации мембраны как, предположительно, движущей силы для СаМ-индуцированного транспорта ионов кальция внутрь симбиосом.

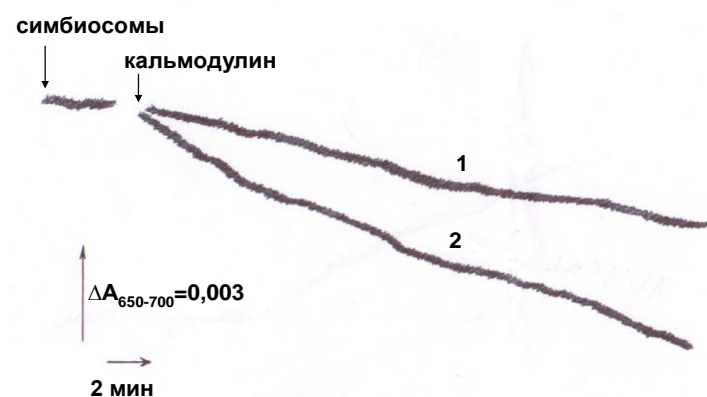


Рисунок 2 - Кинетика СаМ-индуцированного поглощения Ca^{2+} симбиосомами в присутствии (1) и в отсутствии (2) 20 мМ KNO_3 . Концентрация СаМ составляла 10 мкг/мл

Figure 2 - Kinetics of CaM-induced uptake of Ca^{2+} by symbiosomes in the presence (1) and in the absence of 20 mM KNO_3 (2). Concentration of CaM was 10 $\mu\text{g/ml}$

Заклучение

Полученные в работе результаты показывают, что CaM способен включаться в модуляцию уровня Ca^{2+} внутри симбиосом путем активации в SM Ca^{2+} -проницаемых ионных каналов. Это отражается в быстрой остановке CaM пассивного закисления симбиосом в бескальциевой среде и заметном поглощении ионов Ca^{2+} симбиосомами, чувствительным к уровню ионов калия в среде их суспендирования. Хотя функциональная роль такого действия CaM остается неясной, можно предположить, что, наряду с Ca^{2+} -транслоцирующей АТФазой, активность ионных каналов в SM также может регулироваться этим мультифункциональным трансдуктором или сенсором кальциевых сигналов. Это предположение находится в соответствии с известной ролью CaM в регуляции активности ионных каналов, функционирующих в клеточных мембранах в высших организмах [9].

Литература

1. Bush D.S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1995. 46: 95-122;
2. Snedden W.A., Fromm H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants // New Phytol. 2001. 151: 35-66;
3. Krylova V.V., Andreev I.M., Zartdinova R.F., Izmailov S.F. Biochemical characteristics of the Ca^{2+} pumping ATPase in the peribacteroid membrane from broad bean root nodules // Protoplasma. 2013. 250: 531-538;
4. Andreev I.M., Dubrovo P.N., Krylova V.V., Andreeva I.N., Koren'kov V.V., Sorokin E.M., Izmailov S.F. Characterization of ATP-hydrolyzing and ATP-driven proton-translocating activities associated with the peribacteroid membrane from root nodules of *Lupinus luteus* L // J. Plant Physiol. 1997. 151: 563-569;
5. Palmgren M.G. Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations. // Anal. Biochem. 1991. 192: 316-321;
6. Perez-Gordones M.C., Lugo M.R., Winkler M., Cervino V., Benaim G. Diacylglycerol regulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes by direct interaction // Arch. Biochem. Biophys. 2009. 489: 55-61;
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. 72: 248-254;
8. Andreev I.M., Krylova V.V., Dubrovo P.N., Izmailov S.F. Passive potassium transport by symbiosomes from broad bean root nodules // Plant Sci. 2005. 168: 1005-1010;
9. Kovalsaya N.V., Waterbeemd M., Bokhovchuk F.M, Bate N., Bindels R. J. M., Hoenderop J.G.J., Vuister G.W. Structural analysis of calmodulin binding to ion channels demonstrates the role of its plasticity in regulation // Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol. 2013. 465:1507-1519.

CALMODULIN-INDUCED ACTIVATION OF Ca^{2+} -PERMEABLE ION CHANNEL IN THE SYMBIOSOME MEMBRANE FROM BROAD BEAN ROOT NODULES

Andreev I.M., Krylova V.V., Zartdinova R.F., Izmailov S.F.

calmodulin - Ca^{2+} - channel - symbiosome membrane - Vicia faba

It was found that the addition of calmodulin (CaM) from bovine brain to isolated symbiosomes from broad bean root nodules undergoing passive acidification of their interior after placing them into the K^+ -free buffer medium containing ΔpH probe acridine orange resulted in fast stopping this process. This effect is suggested to be due to CaM-induced depolarization of the symbiosome membrane (SM) as a result of opening in it of Ca^{2+} -permeable ion channel and calcium influx into symbiosomes. This suggestion was shown to be supported by both CaM-induced uptake of Ca^{2+} by to concentration of K^+ in symbiosomes suspension. These findings provide evidence for an ability of CaM to be involved in the regulation of ion - channel activity in the SM.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПАТОГЕН - ИНДУЦИРУЕМЫХ БЕЛКОВ В РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ОБРАБОТКЕ ИНДУКТОРАМИ УСТОЙЧИВОСТИ И ИНФИЦИРОВАНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ТВЕРДОЙ ГОЛОВНИ *TILLETIA CARIES*

Ахатова А.Р.¹, Касимова Р.И.¹, Яруллина Л.Г.^{1,2}

¹ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Проспект Октября, 71, г. Уфа, 450054, Россия

²ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», ул. З. Валиди, 32, г. Уфа, 450074, Россия, E-mail: yarullina@bk.ru

Triticum aestivum, *Tilletia caries*, пероксидаза, оксалатоксидаза, ингибиторы протеиназ, индукторы устойчивости

Введение

В связи с ухудшающейся экологической обстановкой и снижением эффективности применяемых химических средств защиты пшеницы от головневых заболеваний, большую значимость в последнее время приобретает поиск препаратов, индуцирующих естественные защитные механизмы растений. Индукция защитного ответа в растениях осуществляется с помощью различных сигнальных систем, запуск которых осуществляется сигнальными молекулами. Такую роль могут выполнять салициловая (СК) и жасмоновая (ЖК) кислоты, перекись водорода и ряд других молекул [1]. В связи с открытием сигнальной роли перекиси водорода возрос интерес к ферментам, регулирующим ее уровень при патогенезе, таким как пероксидаза (ПО) и оксалатоксидаза (ОхО). Способность патогена к внедрению и развитию в растительном организме в значительной мере зависит от активности его внеклеточных гидролаз, в частности, протеиназ. В ответ на действие протеиназ в растении индуцируется синтез белковых ингибиторов, действие которых направлено на подавление активности этих ферментов [2]. Исследование воздействия СК и ЖК на формирование защитного ответа пшеницы с участием ингибиторов протеиназ (ИП) и ферментов про-/антиоксидантной системы (оксалатоксидазы, пероксидазы) при инфицировании *Tilletia caries* представляет научный и практический интерес.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы проростки пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Жница. Наклюнувшиеся семена опудривали сухими спорами патогена *Tilletia caries* из расчета 1 г спор на 100 семян [3]. СК и ЖК в соответствующих концентрациях (0,05мМ и 10⁻⁷М) использовали для замачивания семян пшеницы. Через 7 сут. после инокуляции оценивали уровень экспрессии генов ПО, ОхО, ИП и активность кодируемых ими ферментов в колеоптилях пшеницы. Активность пероксидазы и оксалатоксидазы определяли микрометодом по окислению её субстрата [1]. Активность протеиназ и их ингибиторов определяли по методике Эрлангера и Гофмана-Вайсбляя соответственно [3]. С помощью программы «Primer Select» (DNASar) были подобраны высокоспецифичные праймеры к генам оксалатоксидазы (AJ556991.1), анионной пероксидазы (TC 151917) и ингибитора протеиназы (EU 293132.1), фланкирующие фрагмент ДНК размером 410, 157 и 106 п.н. соответственно. Количественные данные обрабатывали статистически, на рисунках приведены стандартные отклонения.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что предобработка растений пшеницы СК и ЖК оказывает модулирующее действие на активность ферментов про-/антиоксидантной системы (рис. 1, 2, б) и усиливает экспрессию их генов (рис. 1, 2, а), что положительно коррелирует с формированием устойчивости к грибу. Причем, наибольшее возрастание уровня экспрессии генов оксидоредуктаз наблюдалось в инфицированных и предобработанных СК растениях по сравнению с остальными вариантами опыта.

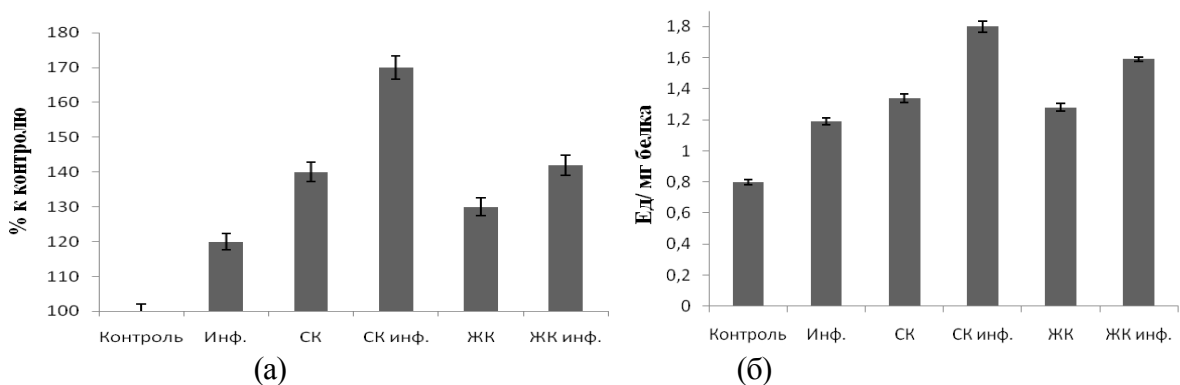


Рисунок 1 - Экспрессия гена оксалатоксидазы AJ556991.1 (а) и активность фермента (б) в coleoptiliaх пшеницы при инфицировании *T. caries* и обработке сигнальными молекулами

Figure 1 - Expression of the oxalate oxidase gene AJ556991.1 (a) and enzyme activity (b) in wheat coleoptiles infected with *T. caries* and treated by signaling molecules

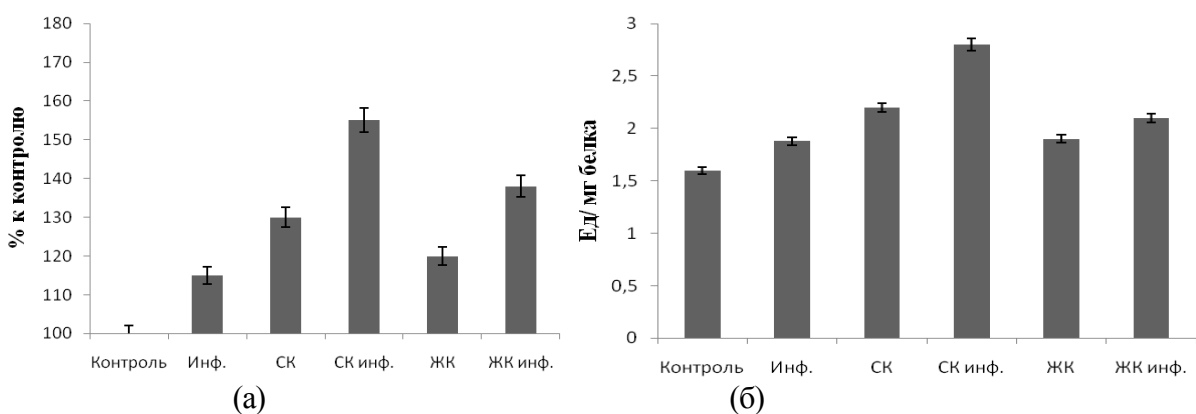


Рисунок 2 - Экспрессия гена пероксидазы TC 151917 (а) и активность фермента (б) в coleoptiliaх пшеницы при инфицировании *T. caries* и обработке сигнальными молекулами

Figure 2 - Expression of peroxidase gene TC 151917 (a) and enzyme activity (b) in wheat coleoptiles infected with *T. caries* and treated by signaling molecules

Основной функцией оксалатоксидазы является участие в деградации щавелевой кислоты, которая в патогенных системах работает в качестве эффективного фактора вирулентности. Активность фермента высока в молодых растениях, но, впоследствии, снижается и практически не обнаруживается в старых органах [4]. Однако она может экспрессироваться под влиянием инфицирования. Это предполагает участие оксалатоксидазы в регуляции модификации клеточной стенки при прорастании семян и защите в это время проростков от фитопатогенов.

Пероксидаза является одним из ферментов «двойного назначения», вовлеченных как в систему генерации, так и утилизации АФК. Основной функцией пероксидаз является защита растительного организма от вредного воздействия АФК и непосредственное участие в процессах дифференциации тканей и органов высших наземных растений. Эти функции пероксидаз тесно связаны с катализмом полимеризации фенольных мономеров в лигнин, суберин и кутин [5].

Основными механизмами патогенности микроорганизмов являются гидролазы, в частности протеиназы. Так, протеиназы грибов способны расщеплять антимикробные белки растений, а также играть активную роль в разрушении белков клеточной стенки [3]. Подавление активности гидролаз специфическими ингибиторами является одним из эффективных барьеров, стоящих на пути проникновения и распространения фитопатогенов в растениях [2]. Показано, что инфицирование *Tilletia caries* сопровождается повышением уровня активности протеиназ в растительных тканях. Можно предположить, что увеличение уровня гидролитических ферментов обусловлено интенсивным развитием патогена в растительных тканях. Предобработка сигнальными молекулами при инфицировании вызывает снижение активности гидролаз. Снижение протеолитической активности, вероятнее всего, связано с индуцирующим эффектом сигнальных молекул на экспрессию гена ингибитора

протеиназы. Причем, наибольшее усиление экспрессии гена наблюдается в варианте с предобработкой ЖК (рис. 3, а).

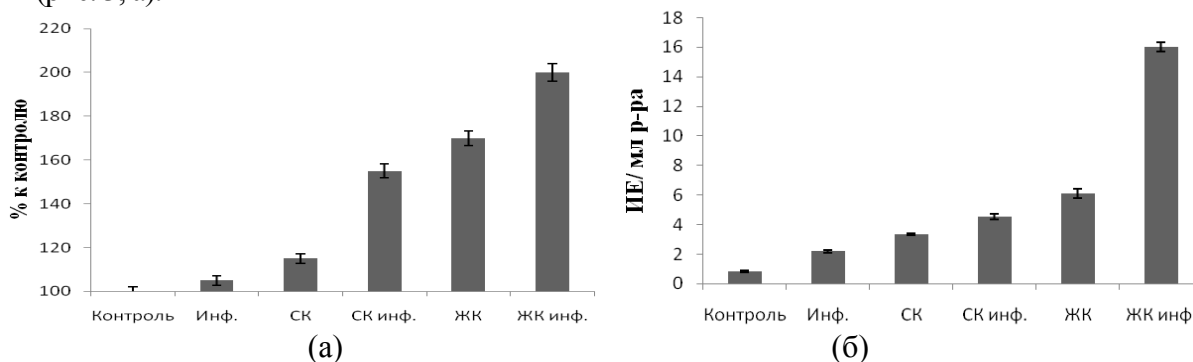


Рисунок 3 - Экспрессия гена ингибитора протеиназы EU 293132.1 (а) и активность фермента (б) в coleoptiles пшеницы при заражении *T. caries* и обработке сигнальными молекулами

Figure 3 - Expression of inhibitor of proteinases gene EU 293132.1 (a) and enzyme activity (b) in wheat coleoptiles infected with *T. caries* and treated by signaling molecules

Заклучение

Таким образом, предобработка семян пшеницы сигнальными молекулами оказывает индуцирующий эффект на уровень экспрессии генов AJ556991, TC 151917, EU 293132.1 при инфицировании *Tilletia caries*. В активации оксидоредуктаз максимальную эффективность оказывала СК. В отношении ингибиторов протеиназ, напротив, более значительным было влияние ЖК. Полученные данные свидетельствуют о различных путях индукции защитного ответа у пшеницы к *T. caries* под воздействием СК и ЖК.

Литература

1. Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И. Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным патогенам. - Уфа: Гилем, 2006. – 232 с.
2. Мосолов В.В., Валуева Т.А. Ингибиторы протеиназ и их функции у растений (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. - 2005. - Т.41, №3. - С. 261-282.
3. Ибрагимов Р.И., Яруллина Л.Г., Шпирная И.А. Устойчивость растений к патогенным организмам: методы исследований. Уфа: РИЦ БашГУ, 2010. – 114 с.
4. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про -антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Успехи современной биологии. - 2006. - Т. 126, № 3. - С. 250-261.
5. Jaspers P., Kangasjärvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling // Physiol. Plant. - 2010. - V. 138. - P. 405–413.

GENE EXPRESSION OF PATHOGEN-RELATED PROTEINS IN WHEAT PLANTS TREATED WITH RESISTANCE INDUCTORS AND INFECTED BY BUNT AGENT *TILLETIA CARIES*

Akhatova A.R., Kasimova R.I., Yarullina L.G.

Triticum aestivum, *Tilletia caries*, peroxidase, oxalate oxidase, proteinase inhibitors, resistance inductors

The effect of salicylic (SA) and jasmonic (JA) acids on gene expression of oxalate oxidase AJ556991, anionic peroxidase TC 151917, proteinase inhibitor EU 293132.1 and activity of their encoded enzymes in coleoptiles of wheat (*Triticum aestivum* L., cultivar Zhnitsa) infected by *Tilletia caries* was studied. SA provided maximum efficiency in activating oxidoreductases and JA increased protease inhibitors.

ПРОЛИНОВЫЕ АМИНОПЕПТИДАЗЫ ВОВЛЕЧЕНЫ В БИОГЕНЕЗ БЕЛКОВ У ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ

Баик А.С., Синетова М.А., Миронов К.С., Пожидаева Е.С.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, г. Москва,
127276, Россия, alenapoj@hotmail.com

Synechocystis, аминопептидаза, фикобилисомы

Введение

Протеазы играют ключевую роль в регуляции структурных и физиологических изменений, которые обеспечивают быстрое и оптимальное приспособление клетки к различным стрессам [1]. Однако механизмы и биологическая роль протеаз у большинства фотосинтезирующих организмов остается до конца не изученной. В N-концевой протеолиз белков вовлечены пептидазы, различающиеся по своим функциональным свойствам, в том числе белки семейства пролин-специфичных аминопептидаз [2]. Эта группа ферментов является важной составляющей избирательного протеолиза белков, поскольку гидролиз пептидной связи, образованной пролином, может осуществляться лишь небольшим числом ферментов. На сегодняшний день эти белки хорошо охарактеризованы в клетках животных и бактерий [3]. Однако у растений аминопептидаза Р экспериментально идентифицирована только в томатах *Lycopersicon esculentum* [1].

Вклад протеаз в молекулярные процессы можно оценить с использованием мутантных организмов с дефектными целевыми белками. Для изучения функции пролин-специфичных пептидаз в клетках цианобактерий нами был получен гомозиготный мутантный штамм *ΔperP* *Synechocystis* sp. PCC6803 (штамм GT), у которого инактивирован ген *sll0136*, кодирующий аминопептидазу Р. Мутант склонен к агрегации клеток, что, вероятно, обуславливает его более медленный рост, по сравнению со штаммом дикого типа (ДТ). После оптимизации условий экстракции растворимых белков для последующего анализа методом изофокусирования на амфолитах (2D/IEF) в сочетании с MALD-ToF анализом у мутанта показано сниженное количество линкерного полипептида мол. м. 32 кД, обеспечивающего связывание белков фикоцианина в лучах фикобилисом, а также фактора элонгации Tu, участвующего в синтезе белков.

Материалы и методы

Штаммы и условия культивирования. В работе использовали глюкозоустойчивый (GT) штамм дикого типа *Synechocystis* sp. PCC6803 из коллекции одноклеточных водорослей ИФР РАН. Инсерционный мутант *ΔperP* был получен в данной работе путем трансформации клеток ДТ рекомбинантной плазмидой pAL-TA, несущей фрагмент гена *sll0136* с встроенным в него геном устойчивости к канамицину. Штаммы выращивали в климатической камере фотоавтотрофно, как описано [4].

Приготовление образца для 2D/IEF электрофореза. Выделение белков *Synechocystis* проводили с использованием пресса French [5]. Для идентификации белков MALDI-TOF MS растворимые белки фракционировали в первом направлении на IPG Strips (длина 11 см, диапазон pH 4-7, Bio-Rad) согласно инструкции производителя. Во втором направлении проводили электрофорез в денатурирующих условиях в 12,5% ПААГ. Гели окрашивали Кумасси G-250 (Bio-Rad). Вырезанные из 2D/SDS-гелей полипептиды идентифицировали методом MALDI-TOF в центре “Постгеномные и нанотехнологические инновации (ПИННИ)”, Москва, Россия.

Электронная микроскопия. Приготовление образцов для электронной микроскопии проводили по известному методу [6]. Изображения получали на электронном микроскопе Libra 200 (Carl Zeiss, Germany).

Результаты и обсуждение

В процессе роста мутант *ΔperP* характеризовался замедленным ростом и адсорбированием клеток на стенках барбатера. Анализируя препараты клеток мутанта *ΔperP* с помощью электронной микроско-

пии, мы наблюдали наличие скоплений клеточных агрегатов в сравнении с преобладанием одиночных клеток у образцов ДТ. Подобное поведение, вероятно, обусловлено нарушением у мутанта заключительного этапа образования клеточной стенки (рис. 1). Одним из предположений является то, что у мутанта происходит отставание или дефект в созревании Z-кольца, которое стимулирует синтез пептидогликана в центре клетки, необходимого для образования перетяжки и разделения двух новых клеток. Также мы наблюдали в препаратах мутанта деструктивное расположение тилакоидов, в то время как у ДТ мембраны тилакоидов имели нормальную, упорядоченную периферийную локализацию (рис. 1).

После оптимизации и проведения 2D IEF электрофореза, где белки разделяются в зависимости от значения pI, были обнаружены различия в белковом профиле растворимой фракции мутанта от дикого типа (рис. 2). Белки, отсутствующие у *ΔpepP*, были проанализированы в образцах дикого типа с помощью MALDI-TOF анализа. Это позволило выявить отсутствие у мутанта линкерного белка мол. м. 32 кД, ассоциированного с фикобилисомами. Полученные результаты позволяют заключить, что у мутанта нарушена сборка лучевой области фикобилисом из-за отсутствия линкера 32 кД, который обеспечивает связывание дистальных блоков фикоцианина. Это согласуется с нашими предыдущими результатами, демонстрирующими у мутанта нарушения в сборке фикобилин-содержащих комплексов. В дальнейшем необходимо провести более детальный анализ структуры фикобилисом в клетках мутанта.

Также MALDI-TOF анализ показал отсутствие у мутанта фактора элонгации Tu. Ранее, мы продемонстрировали, что в клетках, лишенных белка PepP, наблюдаются изменения в уровне трансляции белков основных фотосинтетических комплексов [5]. Вероятно, это связано с нарушениями в синтезе или стабильности фактора элонгации Tu. Однако эти данные требуют дальнейшего анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №12-04-00049-а.

Литература

1. Sokolenko A., Pojidaeva E., Zinchenko V., Panichkin V., Glaser V.M., Herrmann R.G., Shestakov S.V. The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 and *Arabidopsis thaliana* chloroplasts // *Curr. Genet.* 2002. V. 41. P. 291-310.

2. Yaron A., Nader F. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1993. V. 28. P. 31-81.

3. Wilce M.C., Bond C.S., Dixon N.E., Freeman H.C., Guss J.M., Lilley P.E., Wilce J.A. Structure and mechanism of a proline-specific aminopeptidase from *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 3472-3477.

4. Пожидаева Е.С., Малтерер С., Баик А.С., Соколенко А.В. // Инактивация гена *sl10136* у *Synechocystis sp.* PCC 6803 приводит к нарушению биогенеза белков фотосинтетических комплексов. *Физиология растений*, 2013, том 60, № 4, с. 541–548.

5. Пожидаева Е.С. Комплексный подход при исследовании мультибелковых растворимых комплексов в клетках цианобактерий // *Физиология растений*, 2014, том 61, № 2, с. 283–290.

6. Синетова М., Маркелова А.Г., Лось Д.А. Влияние азотного голодания на ультраструктуру и пигментный состав хлоропластов ацидотермофильной микроводоросли *Galdieria sulphuraria* // *Физиология растений*, 2006, том 53, №2, с. 172-181.

PROLIN-SPECIFIC AMINOPEPTIDASES INVOLVED IN BIOGENESIS OF PROTEINS IN PHOTOSYNTHESIZING ORGANISMS

Baik A.S., Sinetova M.A., Mironov K.S., Pojidaeva E.S.

Synechocystis, aminopeptidase, phycobilisome

The N-terminal proteolysis of proteins involved peptidase differ in their functional properties, including the proline-specific aminopeptidases. Our results demonstrate an important role of the proline aminopeptidase PepP in the biogenesis of photosynthetic proteins in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC6803. We have shown that in the PepP-deficient cells dramatically reduced the amount of Tu elongation factor, involved in protein synthesis and 32 kDa phycocyanin associated linker protein of phycobilisome.

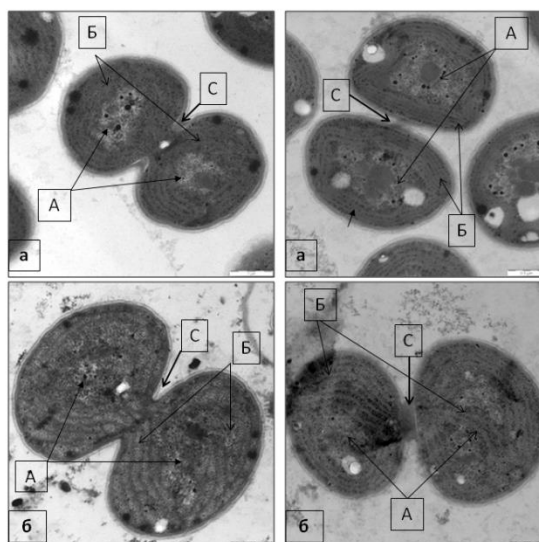


Рисунок 1 - Результаты электронной микроскопии клеток цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 к 5-м сут. инкубации при 32° C, 70 мкмоль фотон/(м² с), 1.6 % CO₂ в контроле: а – штамм PCC6803; б – штамм *ΔperP*; А – зона нуклеоида; Б – тилакоиды; С – зона образования перегородки (клеточной стенки). Масштаб: а-б – 0,5 мкм

Figure 1 - The electron micrographs of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 after 5 days incubation at 32° C, 70 μmol photon/(m² s), 1.6 % CO₂ in control cells: a – the strain PCC6803; b - - mutant strain *ΔperP*; A – nucleoid; B – thylakoids; C- zone of septa formation. Scale: a, b – 0,5 μm

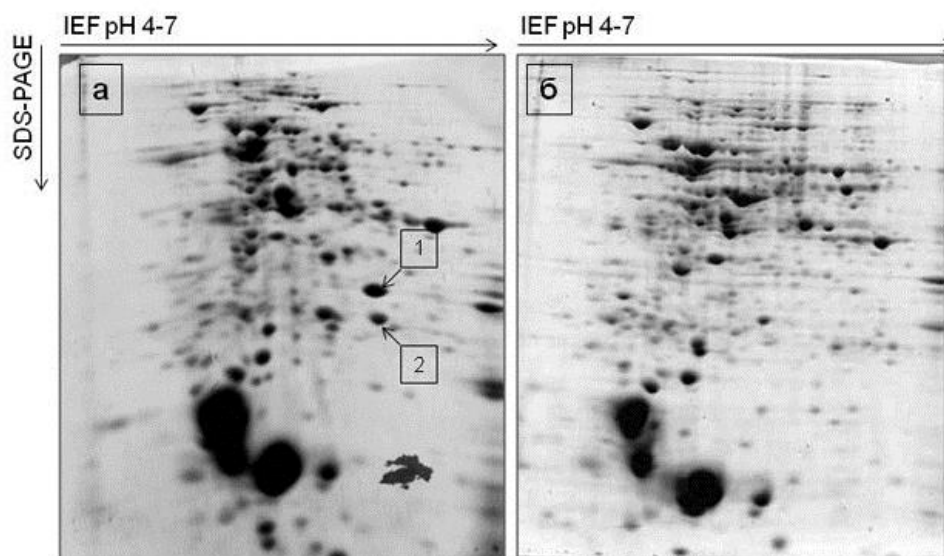


Рисунок 2 - Результаты двумерного (2D/IEF) электрофореза белков растворимой фракции, выделенной из клеток ДТ (а) и *ΔperP* (б) *Synechocystis* sp. PCC6803. Позиции белков, идентифицированных с помощью Maldi-tof анализа указаны (1) – линкерный белок мол. м. 32 кД, (2) – фактор элонгации Tu

Figure 2 - The results of 2D/IEF gel electrophoresis of soluble proteins extracted from the wild-type strain (a) and *ΔperP* (b) *Synechocystis* sp. PCC6803. The position of proteins identified using Maldi-tof analysis is indicated as (1) – 32 kDa linker protein; (2) – Tu elongation factor

СОДЕРЖАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКОГО ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА В ЛИСТЯХ КАК МАРКЕРНЫЙ ПРИЗНАК УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Бакакина Ю.С., Колеснева Е.В., Содель Д.Л., Дубовская Л.В., Волотовский И.Д.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Беларусь, E-mail: bakakinay@mail.ru

томаты, ячмень, цГМФ, устойчивость, абиотический и биотический стресс

Введение

Поиск способов снижения потерь урожая и повышения продуктивности растений в настоящее время является актуальной задачей для сельского хозяйства, в связи с чем возникает необходимость в поиске маркеров устойчивости растений к действию абиотических и биотических факторов.

Известно, что в клетках животных ключевую роль в регуляции метаболизма выполняет гуанилатциклазная система, основной сигнальной молекулой в которой является циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ). Установлено, что в растениях цГМФ участвует в регуляции физиологических процессов [1] и стрессовых ответов. Ранее нами была выявлена медиаторная роль цГМФ в передаче световых и фитогормональных сигналов в проростках овса [2–4]. Показано, что цГМФ играет ключевую сигнальную роль в реализации стрессовых воздействий в клетках растений: в трансдукции окислительного сигнала в клетках растений табака [5] и температурного [6, 7] – в проростках арабидопсиса. Кратковременное увеличение содержания цГМФ в проростках арабидопсиса наблюдалось и при АБК-индуцированных сигнальных процессах, приводящих к быстрому закрыванию устьиц в замыкающих клетках [8]. В литературе имеются данные об участии цГМФ в реализации действия биотических стрессоров [9, 10]. Совокупность проведенных исследований позволяет предположить, что параметры гуанилатциклазной системы могут выступать в качестве маркерного признака устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды.

Поэтому целью данной работы было провести сравнительный анализ содержания цГМФ в контрастных по устойчивости к патогенам и абиотическим факторам сортах овощных (томаты) и зерновых (ячмень) культурных растений.

Материалы и методы

В работе использовали листья 45-дневных растений томата (*Lycopersicon esculentum* L.) двух сортов, контрастно различающихся по чувствительности к действию патогена *Phytophthora infestans*, а также 7-дневные проростки ячменя (*Hordeum vulgare* L.), контрастно различающихся по устойчивости к засухе и низким температурам. Измерение количества цГМФ проводили методом иммуноферментного анализа с помощью набора реактивов «cGMP Enzyme Immunoassay kit» (фирмы «Sigma», США).

Результаты и обсуждение

Устойчивый к патогену *Phytophthora infestans* сорт *OttaWa 30* имеет балл поражаемости «1», а восприимчивый сорт *Доходный* – балл поражаемости «6».

Обнаружено, что в клетках растений томата устойчивого сорта *OttaWa 30* содержание цГМФ составило $1,08 \pm 0,03$ пмоль/г ткани, в то время как клетках растений томата восприимчивого сорта *Доходный* – $1,88 \pm 0,19$ пмоль/г ткани (рис. 1). Таким образом, в растениях томата устойчивого сорта концентрация цГМФ в 1,7 раза ниже по сравнению с растениями восприимчивого сорта.

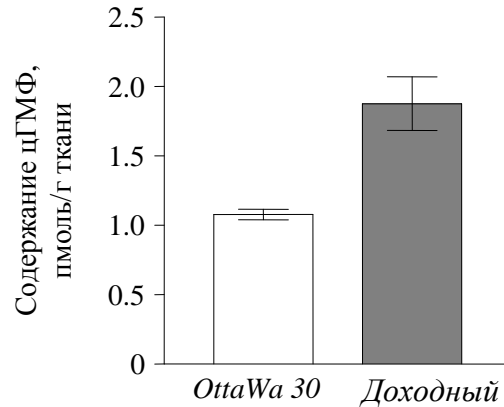


Рисунок 1 - Содержание цГМФ в сортах растений томата, отличающихся по устойчивости к патогену *Phytophthora infestans*

Figure 1 - Endogenous cGMP levels in tomato plants with contrast resistance to *Phytophthora infestans*

В другой серии экспериментов был проведен сравнительный анализ содержания цГМФ в проростках ячменя, контрастно отличающихся по устойчивости к засухе (*Бровар* и *Якуб*) и низким температурам (*Вакула* и *Талер*). Растения ячменя *Бровар* и *Вакула* относятся к засухо- и морозоустойчивым сортам, соответственно. Сорта *Якуб* и *Талер* обладают низкой устойчивостью к засухе и низким температурам, соответственно.

Как видно из рис. 2, в ячмене сортов *Бровар* и *Вакула* концентрация цГМФ составила $0,86 \pm 0,059$ пмоль/г ткани и $1,01 \pm 0,11$ пмоль/г ткани, соответственно. Тогда как в растениях сортов *Якуб* и *Талер*, восприимчивых к данным абиотическим факторам, содержание цГМФ было в 1,7 и 1,4 раза выше и составляло $1,53 \pm 0,16$ пмоль/г ткани и $1,41 \pm 0,10$ пмоль/г ткани, соответственно. Следовательно, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии обратной зависимости между устойчивостью к засухе и низким температурам и уровнем содержания цГМФ в растениях ячменя.

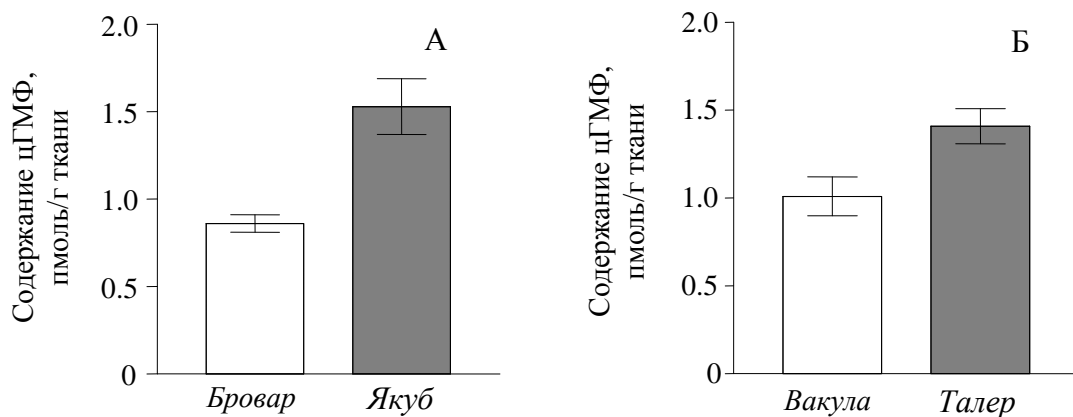


Рисунок 2 - Содержание цГМФ в сортах растений ячменя, контрастно отличающихся по устойчивости к засухе (А) и низким температурам (Б)

Figure 2 - Endogenous cGMP levels in barley plants with contrast resistance to drought (А) and low temperatures (Б)

Заключение

Полученные результаты указывают на то, что в клетках растений овощных (томаты) и зерновых (ячмень) культур устойчивых сортов содержание цГМФ ниже, чем в клетках растений восприимчивых сортов. Таким образом, изменение уровня содержания цГМФ в клетках может выступать дополнительным критерием при отборе растений, устойчивых к патогенам и абиотическим факторам.

Литература

1. Meier S. and Gehring C. Emerging roles in plant biotechnology for the second messenger cGMP – guanosine 3',5'-cyclic monophosphate // *Afr. J. Biotech.* 2006. 5. 1687–1692.
2. Дубовская Л.В. и др. Фоторегуляция эндогенного содержания цГМФ в проростках овса // *Физиол. раст.* 2001. 48. 26–29.
3. Volotovski I.D. et al. Photoreceptor phytochrome regulates the cGMP synthesis in *Avena sativa* L. cells // *Bulg. J. Plant Physiol.* 2003. 29. 3–12.
4. Молчан О.В. и др. Фитогормональная регуляция уровня цГМФ и цАМФ в проростках овса (*Avena sativa* L.) // *Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук.* 2003. 1. 47–50.
5. Колеснева Е.В. и др. Влияние оксида азота на фрагментацию тотальной ДНК в растениях табака при окислительном стрессе // *Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук.* 2006. 3. 61–64.
6. Бакакина Ю.С. и др. Влияние холодового стресса на внутриклеточную концентрацию NO и эндогенное содержание цГМФ в проростках *Arabidopsis thaliana* // *Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук.* 2009. 3. 43–46.
7. Бакакина Ю.С. и др. Влияние высокотемпературного стресса на внутриклеточную концентрацию NO и эндогенное содержание цГМФ в проростках *Arabidopsis thaliana* // *Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук.* 2009. 4. 34–39.
8. Dubovskaya L.V. et al. cGMP-dependent ABA-induced stomatal closure in the ABA-insensitive *Arabidopsis* mutant *abi1-1* // 2011. *New Phytol.* 191. 57–69.
9. Meier S. et al. Deciphering cGMP signatures and cGMP-dependent pathways in plant defence // *Plant Signal. Behav.* 2009. 4. 307–309.
10. Pasqualini S. et al. Ozone and nitric oxide induce cGMP-dependent and -independent transcription of defence genes in tobacco // *New Phytol.* 2009. 181. 860–870.

ENDOGENOUS CONTENT OF CYCLIC GUANOSINE 3',5'-MONOPHOSPHATE IN LEAVES AS A MARKER OF PLANT RESISTANCE TO ABIOTIC AND BIOTIC STRESSES

Bakakina Y.S., Kolesneva E.V., Sodel D.L., Dubovskaya L.V., Volotovski I.D.

tomato, barley, cGMP, resistance, abiotic and biotic stress

Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) is a well-established intracellular molecule that takes part in diverse physiological processes, biotic and abiotic stress responses in higher plants. It was demonstrated that endogenous cGMP content in abiotic and biotic stress-tolerant crops were lower than in stress-sensitive ones. Thus, cGMP level could be an additional criterion for the selection of resistant to pathogens and abiotic stresses crop plants.

МОРФОЛОГИЯ И УЛЬТРАСТРУКТУРА АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ ПОБЕГА ФАСЦИИРОВАННЫХ МУТАНТОВ ГОРОХА

Быкова Е.А., Лабунская Е.А., Чуб В.В.

ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
Ленинские горы, д. 1, стр. 12, 119234, г. Москва, Россия, E-mail: katebykova.90@mail.ru

Pisum sativum, фасциация, побеговая апикальная меристема (ПАМ)

Введение

Фасциация – это явление, при котором меристема увеличивается в объеме (в некоторых случаях - в 1000 и более раз). Часто этот процесс происходит за счет увеличения пула меристематических клеток в центральной зоне. Скорость деления клеток в центральной зоне зависит от потоков сигнальных веществ между *gib*-зоной и слоями тунки. Подробный ультраструктурный анализ позволяет оценить состояние клеток в центральной и *gib*-зонах.

В своей работе мы использовали две изогенные линии проростков гороха (*Pisum sativum* L.): фасциированный мутант "Штамбовый" и дикий тип "Немчиновский". Исследования проводились на ранних стадиях развития (4-й день прорастания).

Материалы и методы

Для изучения ультраструктуры материал фиксировали в 2,5% ГА в фосфатном буфере 0,1М, при pH 7,2, постфиксация в 1% тетроксиде осмия (OsO₄) и 2% уранилацетате (УА) в 70% этаноле. Затем кусочки были обезвожены в возрастающих концентрациях этанола и ацетона и залиты в эпоксидную смолу. Заключали в смесь эпонов следующего состава: 13 частей Epon 812, 8 частей DDSA, 7 частей MNA и 1 часть катализатора, ускоряющего процесс полимеризации [1].

Изготовленные алмазным ножом на ультратоме LKB Ultratome V и смонтированные на медных сеточках ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу [1]. Образцы исследовали с помощью электронного трансмиссионного микроскопа JEM – 100B (Jeol) в межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ.

Для сканирующей электронной микроскопии образцы фиксировали 70% этиловым спиртом, дегидратировали в смесях спиртов и ацетона возрастающей концентрации и высушивали методом “критической точки». После этого проводили напыление металлами. Образцы клеили на столики при помощи лака или двустороннего скотча. Столики с образцами напыляли сплавом платины и палладия в ионно-распылительной установке (Eiko IB-3 ION COATER). Напыленные образцы были изучены с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) HITACHI S-405A и Stereoscan S-2 (Cambridge Instruments) в лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ.

Результаты и обсуждение

Ультраструктура клеток фасциированных мутантов демонстрирует отличия от растений дикого типа: в тунике наблюдается существенная вакуолизация, часто сопровождающаяся отхождением плазматической мембраны от клеточной стенки. В ряде случаев этому сопутствовало утончение или разрыв клеточной стенки, а также объединение нескольких клеток в единую полость. Внутри клеток также наблюдались признаки деградации. У растений сорта «Немчиновский» (дикий тип) также наблюдалась вакуолизация в *rib*-зоне (рис.4), что связано с формированием полости в центральном цилиндре и является характерным признаком данного вида. Однако вакуолизации клеток тунки замечено не было.

Сканирующая электронная микроскопия подтверждает изменения формы апикальной меристемы побега фасциированного мутанта «Штамбового» в отличие от сорта «Немчиновский» (дикого типа). Известно, что при фасциации объем меристемы увеличивается, мери-

стема может принимать различные формы, вплоть до кольцевой [2]. В случае нашего объекта меристема фасцирована вдоль определенной плоскости, имеет уплощенную форму (рис. 3).

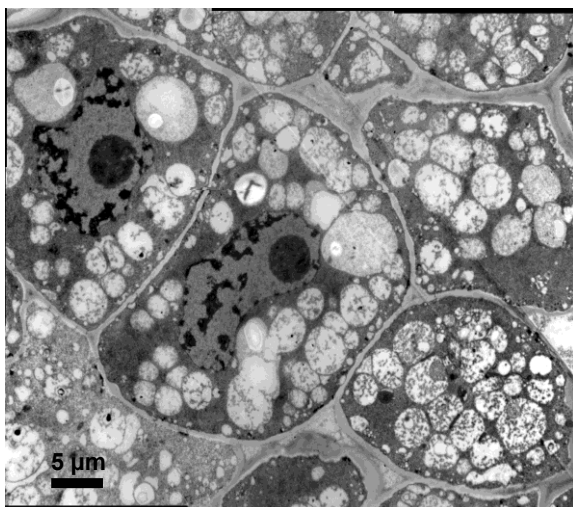


Рисунок 1 - Центральная зона "Штамбового"
Figure 1 - Central zone of "Shtambovoj"

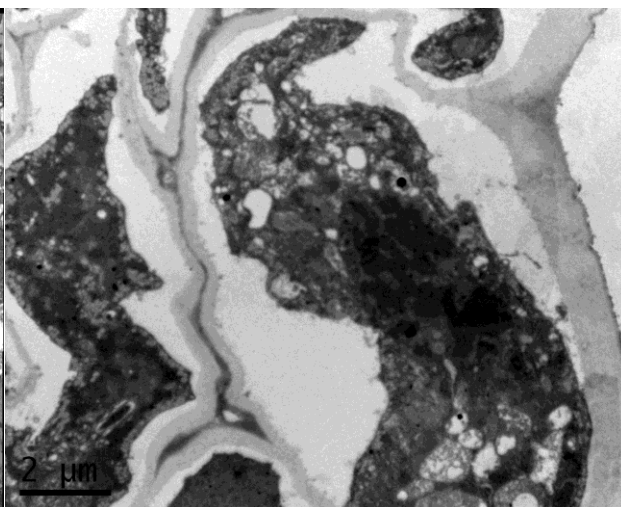


Рисунок 2 - Туника "Немчиновского"
Figure 2 - Tunica of "Shtambovoj"

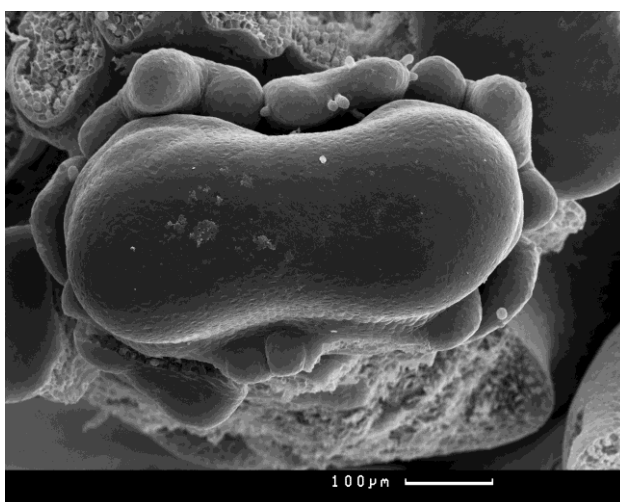


Рисунок 3 - Форма меристемы у "Штамбового"
Figure 3 - The meristematic shape of "Shtambovoj"

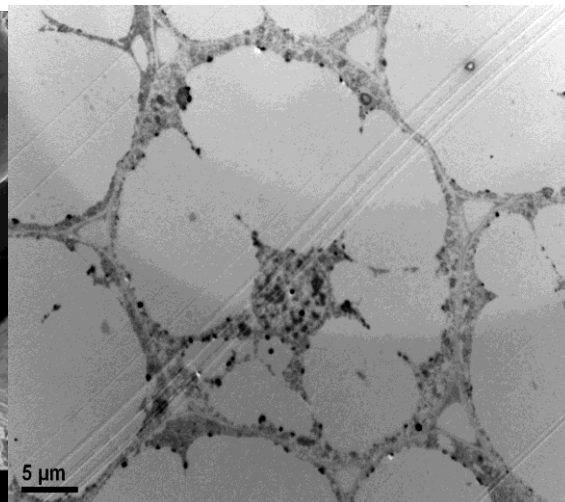


Рисунок 4 - Rib-зона "Немчиновского"
Figure 4 - Rib-zone of "Nemchinovskij"

Заключение

Из приведенных данных можно заключить, что мутации, дающие такое морфологическое изменение, как фасциация, влияют на ультраструктуру клеток апикальной меристемы побега. Интерпретация выявленных изменений может быть проведена с нескольких альтернативных позиций. Во-первых, следует отметить изменения, затрагивающие клеточную стенку – изменения ее толщины, а также разрывы. Можно предположить, что это связано с деформациями клеточных стенок и возникающими дополнительными натяжениями в них. С другой стороны, фасцированный фенотип может возникать в силу разных причин. Так, известны мутанты *main* и *mdo1* у *Arabidopsis thaliana*, у которых наблюдается деградация клеток апикальной меристемы побега, повышенная чувствительность к агентам, повреждающим

ДНК, и – на фоне этого - фасциация побега [3,4]. Таким образом, дальнейшая работа может быть направлена в сторону изучения феномена фасциации и ультраструктуры клеток апикальной меристемы побега на других мутантах, для которых точно известна функция поврежденного гена.

Литература

1. Уикли И.Б. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975. 324 с.
2. Чуб В., Синюшин А. Фасциация цветка и побега: от феноменологии к построению моделей преобразования апикальной меристемы // Физиология растений. 2012. Т. 59, № 4. С. 574–590.
3. Wenig U., Meyer S., Stadler R., Fischer S., Werner D., Lauter A., Melzer M., Hoth S., Weingartner M. and Sauer N. Identification of MAIN, a factor involved in genome stability in the meristems of *Arabidopsis thaliana* // The Plant Journal. 2013. Т. 75, С. 469–483.
4. Hashimura Y. and Ueguchi C. The Arabidopsis MERISTEM DISORGANIZATION 1 gene is required for the maintenance of stem cells through the reduction of DNA damage // The Plant Journal. 2011. Т. 68, С. 657–669.

MORPHOLOGY AND ULTRASTUCTURE OF THE SHOOT APICAL MERISTEM FASCIATED *PISUM SATIVUM* L. MUTANTS

Bykova E.A., Labunskaya E.A., Choob V.V.

Pisum sativum, fasciation, shoot apical meristem (SAM)

Fasciation is phenomenon in which the meristem increases in volume (in some cases - in 1000 and more). Often this process occurs by increasing the pool of stem cells in central zone. The rate of cell division in central zone depends on cross-talking between the rib-zone and layers of tunica. The detailed ultrastructural analysis allows us to estimate the state of central and rib-zone cells.

In our work we used two isogenic lines of pea seedlings (*Pisum sativum* L.): fasciated mutant "Shtambovyj" and wild type "Nemchinovskij." Studies realized on early stages of development (1st, 4th and 9th day of germination).

РОЛЬ ЭТИЛЕНА В РЕГУЛЯЦИИ ПЕРЕХОДА КЛЕТОК ПОКОЯЩЕГОСЯ ЦЕНТРА К АКТИВНЫМ ДЕЛЕНИЯМ В ОТРЕЗАННЫХ КОРНЯХ КУКУРУЗЫ

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

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35,
г. Москва, 127276, Россия, ivanov_vb@mail.ru*корень, меристема корня, покоящийся центр, ствольные клетки, этилен, пролиферация***Введение**

В кончиках подавляющего большинства корней есть небольшая группа клеток, называемая покоящимся центром, которые при нормальных условиях делятся в 6 – 10 раз реже остальных клеток меристемы [3]. Известно также, что они более устойчивы к облучению или охлаждению. Функциональное значение клеток покоящегося центра далеко не полностью изучено. Существуют два мнения: либо эти клетки являются ствольными клетками корня, либо они, не являясь таковыми, ингибируют переход к дифференцировке окружающих клеток, которые, в свою очередь и выполняют роль ствольных клеток [1, 4, 7, 8]. Для выяснения функциональной роли покоящегося центра представляет интерес выявить, как меняется рост и деления клеток покоящегося центра при разных воздействиях.

Работая в этом направлении, мы обнаружили интересное явление – активацию делений клеток покоящегося центра в отрезанных кончиках корней проростков кукурузы, выдерживаемых во влажной среде, хотя деление основной части клеток меристемы прекращалось. При этом структура меристемы перестраивалась из закрытой в открытую. Такая активация делений наблюдалась у проростков четырех сортов и не наблюдалась у проростков восьми сортов. Не была она обнаружена и у отрезанных кончиков корней арабидопсиса [2]. До сих пор механизмы поддержания покоящегося состояния клеток покоящегося центра корней и активации их делений при некоторых воздействиях остаются малопонятными.

Ortega-Martinez et. al. [5] показали, что этилен может быть одним из регуляторов, вызывающих переход клеток покоящегося центра к активным делениям в корнях арабидопсиса.

В связи с этим представляло интерес проверить, какова роль этилена при активации делений клеток покоящегося центра в отрезанных корнях кукурузы. Известно, что отрезание является одним из факторов, который может стимулировать синтез этилена.

С этой целью было изучено действие ингибиторов синтеза и действия этилена на деление клеток покоящегося центра в отрезанных корнях кукурузы.

Материалы и методы

Опыты проводили с проростками кукурузы сорта Интеркрас-375. Сухие семена стерилизовали 1% раствором формалина и проращивали на влажной фильтровальной бумаге в темноте при 27⁰ С. У 3-х суточных проростков отрезали кончики длиной 1 см и помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой или растворами ингибиторов, и ставили в темный термостат при 27⁰ С на 24 ч.

В опытах с циклопропеном вначале интактные проростки на 3-4 ч помещали в атмосферу смеси изомеров циклопропена, затем отрезали кончики корней, которые помещали в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу и ставили в термостат. В части опытов отрезанные кончики выдерживали 24 ч в среде с циклопропеном, помещая чашки в пятилитровые сосуды, в которые вводился циклопропен (50 нл/л). Через 24 ч кончики корней фиксировали по Бродскому и заливали в парафин. Далее 10 мкм срезы окрашивали по ШИК-методу с последующей подкраской 0,15% раствором проционового яркоголубого 4RS в 0,2% растворе Na₂CO₃ в течение 30 – 40 мин. при комнатной температуре или по методу Фельгена с последующей подкраской 0,1% раствором алцианового синего 8GS в 3% уксусной кислоте в течение 30 мин. при комнатной температуре.

Результаты и обсуждение

У контрольных проростков из 30 отрезанных корней в 21 наблюдалось четкое открывание меристемы. При этом в отдельных корнях картина распределения делений клеток покоящегося центра варьировала, что и наблюдалось нами ранее [2]. Все использованные ингибиторы предотвращали открывание меристемы в большинстве корней. При этом они ингибировали рост корней интактных проростков за 24 ч не более 40% (часто меньше).

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что ингибиторы синтеза (L- α -(2-аминоэтоксивинил)глицин-HCl (AVG), 10^{-4} М) или действия этилена (AgNO₃, $0,5 \times 10^{-5}$ М, циклопропен, 50нм/л) резко уменьшают активацию делений клеток покоящегося центра в отрезанных корнях [9].

Очень сходные картины открывания меристемы описаны в работе [6], в которой изучали изменения структуры меристемы при преодолении корнем механических препятствий (рост через тонкие трубочки с диаметром меньше диаметра корня). Известно, что преодоление механических препятствий также может стимулировать синтез этилена. Поэтому вполне возможно, что и в этом случае открывание меристемы связано с действием этилена. Представляет большой интерес, как в этом случае действуют ингибиторы синтеза или действия этилена.

Литература

1. Иванов В.Б. Стволовые клетки в корне и проблема стволовых клеток у растений // Онтогенез. 2007. Т. 38. С. 406 – 419.
2. Иванов В.Б., Быстрова Е.И., Месенко М.М., Котова Л.М., Котов А.А. Стимуляция делений клеток покоящегося центра в отрезанных кончиках корней // Онтогенез. 2011. Т. 42. С. 357 – 362.
3. Clowes F.A.L. The quiescent center // The development and function of roots / Eds Torrey J.D. and Clarkson D.T. L.: Acad. Press. 1975. P. 3 – 19.
4. Laux T. The stem cells concept in plants: A matter of debate // Cell. 2003. V. 113. P. 261–263.
5. Ortega-Martinez O., Pemas M., Carol R.J., Dolan L. Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root // Science. 2007. V. 317. P. 507 – 510.
6. Potocka I., Szymanowska-Pułka J., Karczewski J., Nakielski J. Effect of mechanical stress on *Zea* root apex. I. Mechanical stress leads to the switch from closed to open meristem organization // J. Exp. Bot. 2011. V. 62 (13). P. 4583 – 4593.
7. Scheres B. Stem cells: a plant biology perspective // Cell. 2005. V.122. P. 499 – 504.
8. Scheres B. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms // Nature reviews. Molecular cell biology. 2007. V. 8. P. 345 – 354.
9. Sisler E.C., Serek M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiologia plantarum*. 1997. V.100. P.577 – 582.

THE ROLE OF ETHYLENE IN REGULATION OF TRANSITION OF QUIESCENT CENTER CELLS TO ACTIVE DIVISIONS IN EXCISED MAIZE ROOTS

Bystrova E.I., Zhukovskaya N.V., Rakitin V.J., Ivanov V.B.

root, root meristem, quiescent center, stem cells, ethylene, proliferation

The aim of this work was to elucidate how root growth and cell divisions in quiescent center are changed under different exposures. The effects of inhibitors of ethylene biosynthesis and ethylene action on cell divisions in quiescent center were studied in excised maize roots. The experiments showed that the ethylene biosynthesis inhibitor (L- α -(2-аминоэтоксивинил)глицин-HCl (AVG) and ethylene action inhibitors (AgNO₃, cyclopropene) reduce the activation of cell divisions in quiescent center of excised roots.

АБК-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-ГОМОЛОГОВ *AA1* (ABSCISIC ACID ACTIVATED 1) У МУТАНТОВ *ARABIDOPSIS THALIANA* С НАРУШЕНИЯМИ СИНТЕЗА ИЛИ ТРАНСДУКЦИИ СИГНАЛА АБК
Виноградов Н.С., Данилова М.В., Кудрякова Н.В., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35,
г. Москва, Россия, 127276, E-mail: nkudryakova@rambler.ru

Arabidopsis thaliana, абсцизовая кислота, регуляция экспрессии генов

Введение

Хотя системы восприятия, передачи и реализации гормональных сигналов представляют собой одну из наиболее активно изучаемых проблем науки о растениях, модель трансдукции сигнала АБК находится в стадии становления. Различными исследователями было идентифицировано более десяти АБК-связывающих белков, кандидатов в рецепторы этого фитогормона. Такое многообразие возможных рецепторных белков АБК позволяет предполагать существование в растительной клетке не одного линейного пути передачи сигнала этого гормона, а наличие целой регуляторной сети, которая способна формировать различные физиологические ответы. В связи с этим представляет интерес поиск новых рецепторов АБК и АБК-регулируемых компонентов сигнальных сетей. Особое значение при этом имеют АБК-связывающие белки. Одним из них является семейство АБК-активируемых белков, содержащих ToIВ-подобный бета-пропеллерный домен (построенный на базе PD40-повторов), и С-концевой домен, гомологичный дипептидилпептидазе IV типа (DPP IV). У *A. thaliana* белки этого семейства кодируются генами-гомологами, в промоторной области которых обнаружены регуляторные элементы, в том числе цис-элементы, с которыми могут связываться АБК-зависимые транс-факторы. Два гена-гомолога *At1g21670* и *At1g21680* экспрессируются преимущественно в листьях, а третий *At4g01870* – в корнях. При этом уровень транскриптов всех трех генов резко повышается в ходе прорастания семян. Физиологические эффекты, вызванные инактивацией генов-гомологов, позволяют предполагать, что кодируемые ими белки могут функционировать по типу отрицательных регуляторов сигналинга АБК, однако конкретные молекулярные механизмы их действия и место в сложных сетях формирования ответа на гормон не ясны. Возможно, что белки исследуемой группы, учитывая их АБК-связывающие свойства, способны к индукции гормон-зависимой сборки белковых комплексов, либо к участию в гормон-зависимой посттрансляционной модификации белков, что приводит к выполнению определенной функции в цепи передачи гормонального сигнала. В данном исследовании изучали возможное влияние различных мутаций по генам синтеза или сигналинга АБК на регуляцию экспрессии генов-гомологов *AA1* при обычных условиях произрастания и под воздействием АБК.

Материалы и методы

В работе использовали мутанты *Arabidopsis*, дефектные по генам синтеза (*aba 2-1*) или сигналинга АБК (*abi-1-1*, *abi-5-1*, *gun 5-1* и *gcr1*) и исходные экотипы *Col 0* и *Ler 0*. Соответствующие мутантные семена были получены из ABRC (биологический центр ресурсов *Arabidopsis*, университет Огайо, США). Проростки, выращенные на жидкой среде MS в климатической камере при температуре 23°C, освещенности 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ и световом периоде 16ч/8ч, переносили в возрасте трех дней на среду MS с добавлением АБК в концентрации 5×10^{-5} М и экспонировали еще 24 часа. Изучение содержания транскриптов генов-гомологов *AA1*, а также гена первичного ответа на АБК *RAB18* проводили методом ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции (ПЦР-РВ). В качестве референсного гена использовали ген *UBQ10*.

Результаты и обсуждение

Эффект мутаций по генам синтеза или рецепции АБК на изменение чувствительности к эндогенному гормону оценивали по уровню накопления продуктов гена дегидрина *RAB18*, который одновременно используется в качестве маркера действия абсцизовой кислоты (рис. 1а). Наименьшая экспрессии этого гена наблюдалось у нечувствительного к действию гормона мутанта по гену *abi-1*, кодирующего серинтреониновую фосфатазу типа 2С, которая является одним из компонентов цепи сигналинга, инициируемого рецепторами АБК PYR/PYL/RCAR, а также у мутанта *aba2-1* с пониженным уровнем биосинтеза гормона. В ответ на обработку экзогенной АБК (5×10^{-5} М) уровень накопления мРНК гена *RAB18* возрастал у всех исследованных генотипов, за исключением мутанта *abi-1*. Анализ накопления мРНК генов-гомологов *AA1* продемонстрировал разнонаправленное изменение их уровней под воздействием АБК. Через 24 ч экспонирования на среде MS с гормоном наблюдалось резкое увеличение содержания транскриптов гена *At4g01870* у всех генотипов, за исключением *gun 5-1* и *abi-5-1*, где АБК-зависимая активация экспрессии *At4g01870* отсутствовала (рис. 1г). Экспрессия двух других генов-гомологов - *At1g21670* и *At1g21680* подавлялась в присутствии АБК у всех изученных образцов кроме мутантов *aba2-1*, *gun 5-1* и *abi-5-1*, где она или не изменялась, или умеренно активировалась (рис. 1б,в).

Различия в профиле экспрессии трех генов-гомологов под действием АБК позволяют предположить, что, несмотря на высокое сходство нуклеотидных последовательностей ДНК, гены-гомологи обладают выраженной спецификой гормон-индуцируемой регуляции и, по-видимому, осуществляют различные функции в процессе прорастания семян. Активная пролиферативная деятельность в подземных органах, направленная на обеспечение выноса надземных органов на поверхность и переход от скотоморфогенеза к фотоморфогенезу, сопряжена, в свою очередь, со сложными взаимодействиями различных фитогормонов: АБК, этилена, гиббереллина, цитокинина и брассиностероидов, которые могут вызывать как положительную, так и отрицательную регуляцию трансдукции гормональных сигналов. Заметим также, что на вегетативной стадии, согласно данным ДНК-чипов, для дублированных генов первой хромосомы *At1g21670* и *At1g21680* было характерно накопление матрицы в надземных органах, а для гена из четвертой хромосомы *At4g01870* – в корнях, причем при переходе к репродуктивной стадии в соцветиях активно экспрессировался и ген *At4g01870*.

Сходная динамика ответа на экзогенную АБК у проростков дикого типа (Col 0 и Ler 0) и мутантов *abi-1-1* и *gcr1* (усиление экспрессии *At4g01870* и ингибирование *At1g21670* и *At1g21680*) позволяет предполагать, что гены-гомологи *AA1* непосредственно не связаны с путями трансдукции сигнала АБК, участниками которых являются ABI1 и GCR1. Вместе с тем отсутствие выраженной

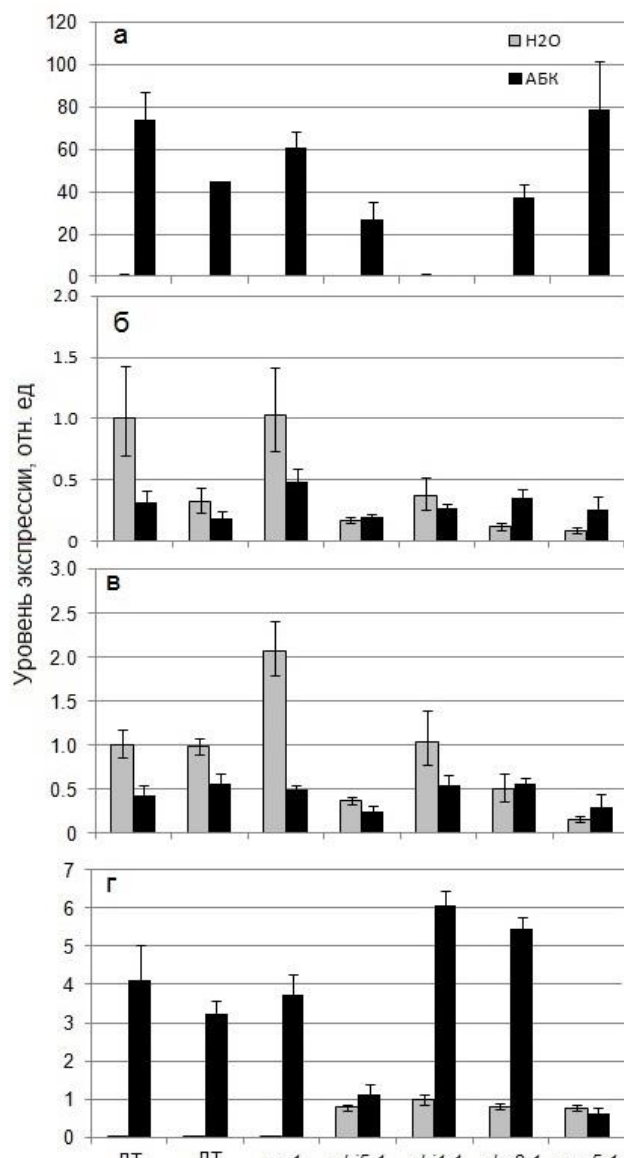


Рисунок 1 – АБК-зависимая экспрессия генов: а. *RAB18*; б. *At1g21670*; в. *At1g21680*; г. *At4g01870*

Figure 1 – ABA-dependent regulation of gene expression: а. *RAB18*; б. *At1g21670*; в. *At1g21680*; г. *At4g01870*

АБК-зависимой регуляции экспрессии генов *AA1* у мутантов *abi-5-1* и *gun 5-1* указывает на возможное участие в контроле накопления матрицы этих генов рецептора CHLH/ABAR/GUN5. Известно, что ген *Gun5* кодирует Н субъединицу гетеротримерного Mg- хелатазного комплекса из *A. thaliana* (ABAR/CHLH/GUN5) (Shang et al., 2010). В ответ на сигнал АБК GUN5 вызывает перемещение транскрипционного фактора WRKY40 из ядра в цитозоль, что приводит к разблокированию гена ответа на АБК транскрипционного фактора ABI5, экспрессию которого подавляет WRKY40. Таким образом, при передаче сигнала АБК Н субъединица Mg-хелатазы выступает в качестве антагониста транскрипционных репрессоров семейства WRKY и снимает ингибирование генов ответа на АБК. Предложенная модель, однако, не исключает вовлечение в данную систему трансдукции сигнала АБК дополнительных стадий, например, неизвестно, каким образом АБК обеспечивает перемещение WRKY из ядра в цитозоль или каким образом подавляется экспрессия WRKY. Исследуемые нами гены-гомологи могут представлять недостающие компоненты данной цепи передачи сигнала АБК или ориентированные на нее гены ответа на гормон.

Заключение и выводы

Различия в АБК-зависимой экспрессии генов гомологов *AA1* у проростков *A. thaliana* свидетельствуют в пользу выраженной специфичности восприятия ими гормонального сигнала, наряду с частичной генетической избыточностью дублированных генов первой хромосомы *At1g21670* и *At1g21680*. Особенности регуляции экспрессии трех генов у мутантов *abi-5-1* и *gun 5-1*, с инактивированными генами, компонентами цепи трансдукции сигнала АБК ABAR/CHLH/GUN5, позволяют предполагать вовлечение в эту систему белков *AA1* в качестве участников сигнального пути или связанных с ним генов ответа.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ, грант №14-04-00818.

Литература

1. Shang Y, Yan L, Liu ZQ, Cao Z, Mei C, Xin Q, Wu FQ, Wang XF, Du SY, Jiang T, Zhang XF, Zhao R, Sun HL, Liu R, Yu YT, Zhang DP. The Mg-chelatase H subunit of Arabidopsis antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition // *Plant Cell*. 2010 V. 22. P. 1909-1935.

ABA-DEPENDENT REGULATION OF AA1 HOMOLOGOUS GENE EXPRESSION IN ARABIDOPSIS THALIANA MUTANTS WITH THE IMPAIRED SYNTHESIS OR TRANSDUCTION OF ABA SIGNAL

Vinogradov N.V., Danilova M.N., Kudryakova N.V., Kusnetsov V.V., Kulaeva O.N.

Arabidopsis thaliana, abscisic acid, regulation of gene expression

Different patterns of ABA-dependent regulation of the *AA1* gene expression in *A. thaliana* seedlings confirm their specificity in perception of hormonal signal, along with partial genetic redundancy of duplicated genes *At1g21670* and *At1g21680*. Lack of the pronounced ABA-dependent regulation of expression of the three homologous *AA1* genes in the *abi-5-1* and *gun 5-1* mutants, with inactivated genes, components of ABA signaling pathway ABAR/CHLH/GUN5 suggests that *AA1* genes are either involved in ABAR/CHLH/GUN5 signal transduction chain or act as its downstream ABA-responsive genes.

ФИТОГОРМОНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ РОСТ И РАЗВИТИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ПОЧКИ ХВОЩА ПОЛЕВОГО

Войтенко Л.В., Мусатенко Л.И.

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, г. Киев, 01601, Украина, E-mail: Lesya_voytenko@ukr.net

Equisetum arvense, рост, развитие, репродуктивная почка, фитогормоны

Введение

Изучение регуляторных систем, и в первую очередь гормональной, обеспечивающей рост, развитие и репродукцию растительных организмов является одной из важнейших проблем современной фитобиологии. Эти генетически запрограммированные процессы и их регуляция исследованы главным образом у представителей высших растений. Информация о роли фитогормонов в процессах роста и развития споровых растений немногочисленна и ограничена лишь данными об их идентификации или влиянии на развитие в культуре *in vitro* [Dathe W., Miersch O., Schmidt J., 1989; Johri M.M., 2008; Poli D.B., 2005; Stirk W.A., van Staden J., 2003]. Появляются публикации, в которых авторы обращают внимание на эволюционные аспекты формирования и функционирования регуляторных систем у разных представителей растительного мира – от простейших споровых и до низших и высших сосудистых [Cooke T.J., Poli D.B., Cohen J.D., 2004; Ross, Reid, 2010; Szein A.E., Cohen J.D., Cooke T.J., 2000; Hartung W., 2010]. Для понимания роли фитогормонов в регуляции различных морфо-физиологических процессов у представителей низших сосудистых растений прежде всего необходимы исследования связанные с их локализацией, концентрацией и динамикой в репродуктивных и вегетативных органах в течении жизненного цикла и на фоне различной интенсивности ростовых процессов [Davies, 2004; Веселов Д.С. и др., 2007].

Целью работы было изучение закономерностей изменения содержания, соотношения и состава индоллил-3-уксусной (ИУК) и абсцизовой (АБК) кислот в процессе развития репродуктивной почки и побега хвоща полевого – *Equisetum arvense* L.

Материалы и методы

Объектом исследования были сформировавшиеся репродуктивные почки, которые перешли в состояние покоя (осенне-зимний период) и находились на начальном этапе прорастания (весенний период), а также их органы (междоузлия, стробилы, корневища с клубеньками).

Экстракцию, очищение и элюирование ИУК и АБК проведено в соответствии с [Методические рекомендации, 1988]. Качественный и количественный анализ фитогормонов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном хроматографе Agilent 1200 LC с диодно-матричным детектором G 1315 B (США), на колонке Eclipse XDB-C 18 с параметрами 4,6 x 150 мм, размер частичек – 5 мкм. ИУК элюировали в системе растворителей метанол: вода: уксусная кислота (59 :40 :1), АБК – хлороформ: этилацетат: ледяная уксусная кислота (70 :30 :5) в режиме *online*. Хроматограммы анализировали с помощью программного обеспечения Chem Station (версия В.03.01) в режиме *offline*. Цифровой материал обрабатывали статистически при помощи программ MS Excel 2002 и Origin 6.0. Достоверность различия оценивали по критерию Стьюдента, используя 5% уровень значения ($P \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Репродуктивные почки хвоща полевого состоят из последовательно чередующихся 6-7 укороченных междоузлий, длина которых в ходе прорастания (весенний этап) изменялась от 1–5 мм до 5–14 мм, и узлов, в которых развиваются сросшиеся у основания в трубчатое влагалище бурые листья. Их длина в апреле изменялась в процессе роста, развития и прораста-

ния репродуктивного побега и составляла от 11–19 до 11–23 мм. В осенне-зимний период почки переходят в состояние покоя и, перезимовав, прорастают в безхлорофильные репродуктивные весенние побеги розоватого цвета со стробилом на верхушке.

Наши исследования показали, что формирование, развитие и начальный этап прорастания зачаточной репродуктивной почки у хвоща полевого сопровождается качественными и количественными изменениями фитогормонов. Так, на протяжении всего периода исследования содержание ИУК (обеих форм) в корневищах постепенно уменьшалось и в период прорастания почки (апрель) достигало следовых количеств. Интенсивное прорастание надземных органов репродуктивной почки происходило на фоне высокого содержания ИУК, в основном за счет её конъюгированной формы, и составляло 59,6 нг/г массы сырого вещества. В дальнейшем наблюдалось уменьшение суммарного количества обеих форм ИУК в два раза. При этом ИУК в основном была сконцентрирована в междоузлиях, где количественно превалировала свободная форма гормона. В зачаточном стробиле на этом этапе развития происходило накопление связанной ИУК. Очевидно, ИУК, на начальных этапах прорастания почки и развития репродуктивного побега хвоща, контролирует процессы деления и растяжения клеток междоузлий, которые начинают интенсивно вытягиваться, аналогично таким же процессам у высших растений [Del Pozo et al., 2005]. Содержание обеих форм АБК в репродуктивной почке и корневище было одинаково низким при переходе в состояние вынужденного покоя (осенне-зимний период). Прорастание (начало апреля) было сопряжено с увеличением количества АБК как в корневище, так и в органах надземной части побега (в 2 раза). При этом в корневище количественно преобладала свободная форма гормона, а в надземных органах – связанная. Следует отметить, что в начальный период интенсивного роста надземных органов (середина апреля), а именно – удлинение междоузлий, резко уменьшилось содержание АБК в корневище (до следовых количеств) и в междоузлиях, тогда как в стробиле происходило накопление свободной формы гормона. Возможно, высокое содержание связанной АБК в надземных органах хвоща при прорастании является результатом её повышенного синтеза в стробилах, а в ходе её деградации до свободных форм на более поздних этапах роста и развития репродуктивного побега будет выполнять роль стресс-гормона, регулируя работу устьичного аппарата. Таким образом, в период весенних колебаний температур при нехватке влаги именно АБК регулирует процессы потери влаги клетками хвоща, аналогично таковым у высших растений [Веселов Д.С. и др., 2007; Agarwal P.K., Jha V., 2010].

Заключение

Нами впервые определены эндогенное содержание, локализация и динамика ИУК и АБК в надземных и подземных органах репродуктивной почки и побега хвоща полевого в осенне-зимний и весенний периоды. Выявлено прямую зависимость между интенсивностью роста и развития надземной (междоузлия с кольцами листьев, стробилы) и обратную – подземной (корневище) частей репродуктивной почки хвоща полевого в период покоя и её интенсивного прорастания с уровнем в них исследуемых фитогормонов. Следует отметить специфичность в содержании ИУК и АБК в надземных органах, особенно связанных форм, на раннем этапе прорастания репродуктивной почки хвоща. В целом же наши исследования подтверждают предположение о том, что фитогормоны у сосудистых споровых растений на ранних этапах их прорастания, роста и развития функционируют так же, как и у высших растений.

Литература

1. Dathe W., Miersch O., Schmidt J. Occurrence of jasmonic acid, related compounds and abscisic acid in fertile and sterile fronds of three Equisetum species // *Biochemie und Physiologie der Pflanze*. – 1989. – 185, № 1-2. – P. 83-92.
2. Johri M.M. Hormonal regulation in green plant lineage families // *Physiology and Molecular Biology of Plants*. – 2008. – 14, № 1-2. – P. 23-38.

3. Poli D.B. The role of auxin on the evolution of embryo development and axis formation in land plants // Abstract of Dissertation Doctor of Philosophy, University of Maryland College Park, Maryland, 2005. – 202 p.
4. Stirk W.A., van Staden J. Occurrence of cytokinin-like compounds in two aquatic ferns and their exudates // Environmental and experimental botany. – 2003. – 49, № 1. – P. 77-85.
5. Cooke T.J., Poli D.B., Cohen J.D. Did auxin play a crucial role in the evolution of novel body plants during the late Silurian – early Devonian radiation of land plants? // In A. R. Hemsley and I. Poole (eds.), Evolution of plant physiology. – Elsevier Academic Press: Amsterdam, 2004. – P. 85-107.
6. Ross J.J., Reid J.B. Evolution of growth-promoting plant hormones // Functional Plant Biology. – 37. – 2010. – P. 795-805.
7. Sztein A.E., Cohen J.D., Cooke T.J. Evolutionary patterns in the auxin metabolism of green plants // Int. J. Plant Sci. – 2000. – 161, № 6. – P. 849-859.
8. Hartung W. The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen // Functional Plant Biology. – 2010. - 37, № 9. – P. 795-805.
9. Davies P.J. Regulatory Factors in Hormone Action: Level, Location and Signal Transduction // Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action / Ed. Davies P.J. Dordrecht: Kluwer, 2004. – P. 15–35.
10. Веселов Д.С., Веселов С.Ю., Высоцкая Л.Б., Кудоярова Г.Р., Фархутдинов Р.Г. Гормоны растений: регуляция концентрации, связь с ростом и водным обменом. – М.: Наука, 2007. – 158 с.
11. Методические рекомендации по определению фитогормонов. – К.: Наук. думка, 1988. – 78 с.
12. Del Pozo J.C., Lopez Matas M.A., Ramirez-Parra E., Gutierrez C. Hormonal control of the plant cell cycle // Physiol. Plant. – 2005. – 123. – P. 173–183.
13. Hager A. Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new Aspects // J. Plant Res. – 2003. – 116. – P. 483–505.
14. Agarwal P.K., Jha B. Transcription Factors in Plants and ABA Depended and independed abiotic stress signaling // Biol. Plant – 2010. – 54. – P. 201 – 212.

PHYTOHORMONE CONTROL THE GROWTH AND DEVELOPMENT IN THE REPRODUCTIVE BUD OF HORSETAIL

Voytenko L.V., Musatenko L.I.

Equisetum arvense, growth, development, reproductive bud, phytohormones

The content, ratio and composition of IAA and ABA in the reproductive bud of horsetail (*Equisetum arvense* L.) during its development and growth were studied. A direct dependence between the development and growth intensity of aboveground part bud and their phytohormone content was shown. The study results confirm the assumption that phytohormones in vascular spore plants like in higher plants are growth regulators.

ФИТОГОРМОНАЛЬНЫЙ ОТВЕТ РАСТЕНИЙ ГОРОХА НА ИНОКУЛЯЦИЮ ЭНДОФИТНЫМИ БАЦИЛЛАМИ И РИЗОБИЯМИ

Гарипова С.Р.¹, Валеева (Иванчина) Н.В.¹, Сахабутдинова А.Р.², Хайруллин Р.М.²

¹ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», ул. З. Валиди, 32, г. Уфа, 450076, Россия

²ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, пр. Октября, 71, г. Уфа, 450054, Россия, E-mail: garisveta@rambler.ru, krm62@mail.ru

ризобии, бациллы, горох, фитогормоны, ИУК, цитокинины, гиббереллины, эндофиты

Введение

Эндофитные бактерии (ЭБ), формирующие тесный мутуалистический симбиоз с растением, в последнее время вызывают повышенный интерес. Это связано не только с открывающимися перспективами их использования в практике растениеводства и фиторемедиации (Гарипова, 2012; 2014), но и с решением фундаментальных вопросов функционирования растительно-микробных взаимоотношений (Zamioudis et al., 2013; Brader et al., 2014). Интригующим является поиск сигнальных систем, посредством которых осуществляется диалог партнеров, приводящий к формированию и регуляции «дружественных» отношений симбионтов. Взаимодействие растения с ЭБ стало предметом изучения сравнительно недавно. Известны работы по оценке салицилат-жасмонатной гормональной системы растения в ответ на внедрение ЭБ на картофеле (Максимов с соавт., 2014) и анализу индолилуксусной кислоты (ИУК), абсцизовой кислоты (АБК), цитокининов (ЦК), гиббереллинов (ГК) на пшенице (Егоршина и др., 2012). В представляемой работе изучали реакции растений гороха при взаимодействии с эндофитными бациллами и ризобиями при автономной и комбинированной инокуляции семян. Были поставлены задачи определить: влияние численности микробных клеток в инокулюме на рост растений; способность ЭБ продуцировать фитогормоны; гормональный баланс в корнях растений гороха при инокуляции семян эндофитными бактериями.

Материалы и методы

Объектами исследования были растения *Pisum sativum* L. сорта Чишминский 95. Для инокуляции семян использовали 10 штаммов *Bacillus subtilis*, выделенных из растений пшеницы в лаборатории биотехнологии Башкирского ГАУ; штамм *B. subtilis* 11В был предоставлен ООО НПП «Биофорт»; *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* штамм 1078 получен из Всероссийской коллекции непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ВНИИСХМ. Для инокуляции растений семена стерилизовали 9%-м гипохлоритом натрия, плотность бацилл и ризобий составила 10^5 и 10^7 клеток/семя, в комбинированной обработке ризобии вносили в плотности 10^7 клеток/семя. Семена проращивали 5 сут. в темноте при 20°C. Продукцию бактериальных индолов измеряли при помощи реактива Сальковского. Продукцию ГК штаммами *B. subtilis* и *Rh. leguminosarum* 1078 оценивали методом Роя и Смита по изменению активности амилазы инокулированных проростков пшеницы. Продукцию ЦК-подобных веществ бациллами и ризобиями определяли на отрезках стареющих листьев ячменя. Содержание ИУК, АБК и ЦК в корнях гороха оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием специфичных к ИУК, АБК и зеатинрибозиду кроличьих сывороток и антикроличьих антител, меченых пероксидазой (Shakirova et al., 2003).

Результаты и обсуждение.

Ростстимулирующие штаммы бацилл, выделенные из растений пшеницы, ускоряли рост корней трех- и пятисуточных растений гороха при обработке в дозе 10^5 клеток/семя, но в дозе 10^7 клеток/семя большинство штаммов подавляло рост. Возникло предположение, что бактериальные штаммы продуцируют ИУК, которая оказывает дифференцированное доза-зависимое действие на однодольные и двудольные растения и в высокой концентрации тормозит рост корня последних. В модельном эксперименте по обработке семян гороха экзогенной ИУК были определены критические концентрации ауксина: в количестве 10^{-8} - 10^{-6} моль/л ИУК способствовала увеличению длины

корней трехсуточных растений до 44% по отношению к контролю, в концентрациях 10^{-5} - 10^{-4} моль/л – ингибировала рост корней от 59% до 86% в сравнении с контрольными растениями, а в концентрации 10^{-3} моль/л полностью подавляла прорастания семян.

Проверка способности бацилл к продукции фитогормон-подобных веществ показала, что штаммы бактерий синтезировали индолы в диапазоне 1.6-5.2 мкг/мл (10^{-6} – 5×10^{-5} моль/л), находящемся на границе концентрации с эффектом «стимуляция – ингибирование роста». Следовательно, при повышении плотности клеток в инокулюме с 10^5 до 10^7 клеток/семя ингибирование роста проростков гороха, вероятно, было вызвано увеличением концентрации индольных соединений. Для всех штаммов с помощью биотестов была выявлена продукция веществ с ЦК- и ГК-подобной активностью. Для оценки вклада фитогормон-подобных веществ бактерий в механизмы рострегулирующей активности по отношению к растениям были выбраны три штамма 11ВМ, 161РН, 811РН, контрастные по продукции индолов и ЦК-подобных соединений и дифференцированно влияющие на рост корней в комбинации с *Rh. leguminosarum* 1078 по сравнению с автономной инокуляцией бациллами. Если принять продукцию фитогормон-подобных веществ ризобиями за единицу, то продукция *in vitro* ИУК : ГК : ЦК для штамма *B. subtilis* 11ВМ составила 4 : 1.4 : 4.5, для штамма 161РН – 2 : 1.5 : 2.8, для штамма 811РН – 3 : 1.5 : 2.

При обработке семян клубеньковыми бактериями растение реагировало незначительным увеличением ИУК (115% к контролю) и существенным повышением содержания ЦК (160% к контролю без инокуляции). По-видимому, активация синтеза ЦК в корнях была вызвана сигнальным фактором ризобий, так как ЦК-подобная активность самих бактерий была невысока. Повышение плотности бактерий в инокулюме до 10^7 клеток/семя сопровождалось снижением содержания в растении ИУК и ЦК на 10% и АБК – на 20% относительно плотности 10^5 клеток/семя. При этом отмечено торможение роста корня.

Бациллы в отличие от ризобий обладали более высокой фитогормон-подобной активностью. Штамм 11ВМ характеризовался самой высокой продукцией индолов, четырехкратно превышающей уровень продукции их ризобиями. В ответ на обработку семян клетками этого штамма параллельно с повышением плотности клеток увеличивалось эндогенное содержание ИУК, АБК, незначительно (не выше контрольных значений) усиливался и рост корня. Добавление к бациллам ризобий вызвало увеличение уровня АБК (на 70% к контролю) в корнях проростков, что одновременно проявлялось ингибированием роста корня на 16%. Можно полагать, что продукция бактериями ИУК-подобных веществ находилась на таком уровне, при котором стимулирующий эффект сменялся ингибированием роста, а увеличение АБК в растениях выступило регулятором повышенного содержания ИУК.

Другие штаммы *B. subtilis* 161РН и 811РН при автономной обработке семян в дозе 10^5 клеток/семя снижали содержание эндогенной ИУК в корнях на 20% от контроля. Длина корней при этом также была незначительно меньше контрольных проростков. С ростом концентрации клеток бацилл от 10^5 до 10^7 клеток/семя, содержание растительной ИУК увеличивалось до 50% относительно варианта с небольшой плотностью клеток в инокулюме. Это сопровождалось увеличением роста корней 5-суточных проростков гороха на 6-20%. Уровень эндогенной ИУК в данном случае (соответствовал молярной концентрации 10^{-7} моль/л) не превышал порогового значения, при котором стимулирующий эффект ауксинов меняется на ингибирующий. Комбинированная обработка семян бактериями *B. subtilis* как штаммом 161РН, так и 811РН с бактериями *Rh. leguminosarum* 1078 приводила к увеличению концентрации ИУК в корнях на 30-50% к контролю и на 16-76% относительно автономной инокуляции семян бациллами. Уровень АБК был значительно ниже, чем в ингибирующем рост сочетании *B. subtilis* 11ВМ + *Rh. leguminosarum* 1078. Рост корней при этом также увеличивался на 20-25% относительно контроля.

Увеличение содержания ЦК в корнях проростков гороха при инокуляции ризобиями вероятно, связано с органогенезом клубеньков. Обработки семян отдельно штаммом *B. subtilis* 811РН и в комбинации с *Rh. leguminosarum* 1078 также способствовали повышению концентрации ЦК в корнях на 43-53% к контролю. Клетки *B. subtilis* 811РН отличались наименьшей продукцией ЦК-подобных веществ, но в ответ на обработку семян этим штаммом в корнях содержание этого гормона повышалось так же, как и при инокуляции ризобиями. Возможно, штамм 811РН обладал сигнальным фак-

тором, аналогичным продуцируемому ризобиям. Напротив, штаммы *B. subtilis* 11ВМ и 161РН, продуцирующие в 4.5 и в 3 раза больше ЦК-подобных веществ, по сравнению с *Rh. leguminosarum* 1078, не приводили к увеличению количества ЦК в корнях гороха в комбинированной обработке.

Заключение

При взаимодействии эндофитных бактерий с растениями гороха установлен доза-зависимый эффект влияния на рост, связанный с уровнем продукции бактериями веществ с ауксин-подобной активностью. Высокая индол-продуцирующая активность бактерий, равно как и более высокая плотность бактериальных клеток в инокулюме, обусловили повышение уровня АБК в корнях, что в результате привело к торможению роста проростков гороха. Уровень ЦК-подобной активности бактерий не совпадал с характером изменения эндогенного количества цитокининов в корнях проростков при взаимодействии растений с эндофитами.

Литература

1. Гарипова С.Р. Экологическая роль эндофитных бактерий в симбиозе с бобовыми растениями и их применение в растениеводстве // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132. № 5. С. 493-505.
2. Гарипова С.Р. Перспективы использования эндофитных бактерий в биоремедиации почв агроэкосистем от пестицидов и других ксенобиотиков // Успехи современной биологии. 2014. Т. 134. № 1. С. 35-47.
3. Максимов И.В., Абизгильдина Р.Р., Сорокань А.В., Бурханова А.В. Регуляция пероксидазной активности под влиянием сигнальных молекул и *Bacillus subtilis* 26D в инфицированных *Phytophthora infestans* растениях картофеля // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 2. С. 197-202.
4. Егоршина А.А., Хайруллин Р.М., Сахабутдинова А.Р., Лукьянцев М.А. Участие фитогормонов в формировании взаимоотношений проростков пшеницы с эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* 11 ВМ // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 1. С. 148-154.
5. Shakirova F.M., Sahabutdinova A.R., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A., Fatkhutdinova D.R. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity // Plant Sci., 2003. V. 164. № 3. P. 317-322.
6. Brader G., Compant S., Mitter B., Trognitz F., Sessitsch A. Metabolic potential of endophytic bacteria // Current Opinion in Biotechnology. 2014. V. 27. P. 30-37.
7. Zamioudis C., Mastranesti P., Dhonukshe P., Blilou I., Pieterse C.M.J. Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria // Plant Physiology. 2013. V. 162. P. 304-318.

PHYTOHORMONAL RESPONSE OF PEA PLANTS TO INOCULATION BY ENDOPHYTIC *BACILLUS* AND *RHIZOBIUM*

Garipova S.R., Valeyeva (Ivanchina) N.V., Sahabutdinova A.R., Khayrullin R.M.

Rhizobium, Bacillus, pea, phytohormones, IAA, cytokinins, gibberellins, endophytes

The dose-dependent effect of exogenous IAA on the growth of pea roots was determined. High auxine-like bacterial activity, as well as higher density of such bacteria for pea seeds treatment induced the regulatory action of ABA leading to the growth roots inhibition. The bacterial production of cytokinins-like substances (CC) and the content of endogenous CC in the plant roots under the interaction with the «CC-producing» and «not producing CC» strains did not coincide.

**СВЕТОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ НЕФОСФОРИЛИРУЮЩИХ ПУТЕЙ ДЫХАНИЯ
МИТОХОНДРИЙ В ЗЕЛЕНЕЮЩИХ КЛЕТКАХ ЛИСТА ПШЕНИЦЫ**Гармаш Е.В.¹, Грабельных О.И.², Велегжанинов И.О.¹, Боровик О.А.², Коковкина Е.В.¹,
Далькэ И.В.¹, Войников В.К.², Головкин Т.К.¹¹ФГБУН Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, 167983, Россия,
E-mail: garmash@ib.komisc.ru²ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, 664033, Россия*Triticum aestivum*, лист, митохондрии, электрон-транспортная цепь, нефосфорилирующие пути, альтернативная оксидаза, деэтиоляция

Наряду с фотопротекторной системой хлоропластов, в защите клетки от фотодеструкции и создании оптимальных условий для протекания фотосинтеза может участвовать электрон-транспортная цепь митохондрий (ЭТЦ). В растительных митохондриях помимо основного цитохромного пути, ЭТЦ содержит альтернативные нефосфорилирующие пути (НФП). Перенос электронов по НФП не связан с генерацией протонного градиента, необходимого для синтеза АТФ. Основными переносчиками электронов по НФП являются альтернативная оксидаза (АОХ), альтернативные внешняя и внутренняя НАДН-дегидрогеназы (НАДН-ДГ). К системам, рассеивающим протонный градиент, образуемый в ходе реакций ЭТЦ, относятся разобщающие белки (UCP). Благодаря активации НФП цепь способна диссипировать избыток восстановителей, в том числе, экспортируемых из хлоропластов [1]. Вместе с тем, вопросы прямых и опосредованных механизмов регуляции светом активности дыхательных компонентов являются слабо изученными [2, 3].

Целью работы было выявить закономерности вовлечения и функционирования НФП митохондрий (от экспрессии генов до проявления активностей) в процессе становления фотосинтетической функции листа при деэтиоляции проростков яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L., с. Иргина) на непрерывном свете (190 мкмоль/м² с) в течение 48 ч [4]. Деэтиоляция как светоиндуцируемый процесс биогенеза пластид и формирования тилакоидной системы хлоропластов, является удобной моделью для оценки роли дыхания в поддержании и оптимизации фотосинтетического процесса.

В процессе зеленения листа пшеницы установлена связь дыхания со степенью развития фотосинтетического аппарата. Максимальная скорость дыхания, измеренная по скорости выделения СО₂ и поглощения О₂, обнаружена на более поздних этапах деэтиоляции (4-12 ч освещения), когда проламеллярные тела реорганизованы в тилакоиды, но фотосинтетический аппарат полностью не развит [4]. Повышение скорости дыхания сопровождалось индукцией альтернативного пути (АП). Доля АП возрастала и достигала наибольшего значения (50% общего дыхания листа) в период от 4 до 6 ч зеленения. После 12 ч экспозиции проростков к свету скорость дыхания снижалась в 1.5 раза и поддерживалась на этом уровне до конца эксперимента. Положительная линейная связь между скоростью тепловыделения и альтернативного дыхания свидетельствовала об участии АП в диссипации энергии.

Митохондрии в первые 6 ч деэтиоляции характеризовались преимущественным окислением малата перед сукцинатом и возрастанием вклада АП при использовании малата как дыхательного субстрата. Включение механизма увода менее активной малатдегидрогеназы (МДГ) от конкуренции с более активной сукцинатдегидрогеназой (СДГ) [5] было, по видимому, направлено на стимуляцию работы малатного челнока, обеспечивающего обмен НАДН между хлоропластами, цитозолем и митохондриями [6]. Этому также могло способствовать частичное ингибирование СДГ на свету [7].

После 6 ч деэтиоляции максимальные величины скорости дыхания митохондрий обнаружены в присутствии экзогенного НАДН, что свидетельствовало об активном функционировании внешней НАДН-ДГ в связи с усилением фотосинтетической активности. Скорость окисления глицина, отражающая активность внутренней НАДН-ДГ, и вовлечение АО в присутствии данного субстрата усиливались после 24 ч зеленения. Это коррелировало с динамикой развития фотодыхательной активности. В этот период регистрировали наличие достоверного послесветового выброса CO_2 .

Вовлечение АОХ, внешней и внутренней НАДН-ДГ достигалось за счет усиленной экспрессии генов. Экспрессия *AOX1a* имела четкий светозависимый характер и совпадала с динамикой активности АП. Экспрессия второго идентифицированного в листе пшеницы гена, кодирующего АОХ - *AOX1c* происходила комплементарно, т.е. в дополняющей к *AOX1a* манере. Экспрессия генов, кодирующих белки внутренней и внешней НАДН-ДГ (*NDA2* и *NDB2* соответственно), усиливалась в процессе деэтиоляции и имела схожий, но несколько запаздывающий характер по сравнению с экспрессией *AOX1a*. Изменение относительного количества транскриптов разобщающих белков (*UCP1a*, *UCP1b*) не имело в процессе деэтиоляции определенной временной динамики.

Обнаружено отсутствие явной корреляции между экспрессией *AOX1a* и количеством АОХ. После 24 ч экспрессия *AOX1a* и вклад АП в дыхание листа снижались, а количество АОХ возрастало. Это указывает на существование в клетке дополнительных механизмов регуляции активности фермента. Анализ субстратной регуляции вовлечения АОХ показал, что одной из основных причин снижения активности АП при увеличении количества белка АОХ в этот период было ограничение доступности субстрата (растворимых углеводов) [8]. Это могло отразиться на посттрансляционной модификации белка.

Важной функцией АП дыхания является предотвращение перевосстановления ЭТЦ и избыточной генерации АФК [9]. Обнаружено, что количество супероксида мало изменялось в процессе деэтиоляции. Анализ изоформ СОД выявил усиление в первые 6 ч деэтиоляции количества и активности митохондриальной Mn-СОД, что коррелировало с уровнем вовлечения АОХ. После 12 ч деэтиоляции повышенному образованию O_2^- препятствовали Cu/Zn-изоформы СОД, которые преимущественно локализованы в хлоропластах и цитозоле. Стабилизация структуры фотосинтетического аппарата, развитие в хлоропластах собственных систем диссипации световой энергии [4] и антиоксидантной защиты после 24 ч зеленения привело к снижению концентрации H_2O_2 и уровня ПОЛ. Эти данные указывают на эффективность работы клеточных систем защиты от окислительного стресса, частью которых является АОХ, в контроле уровня H_2O_2 [10]. Возможно, уменьшение количества H_2O_2 было причиной ослабления экспрессии *AOX1a* после 24 ч деэтиоляции.

Таким образом, выявлен дифференциальный характер вовлечения НФП в процессе деэтиоляции листа пшеницы. Свет напрямую индуцировал экспрессию *AOX1a*, совпадающую с динамикой активности альтернативного дыхания. Вовлечение АОХ создавало дополнительную возможность неконкурентного функционирования МДГ, влияющей на работу малатного челнока для переноса восстановителей. Экспрессия генов внешних и внутренних НАДН-ДГ имела запаздывающий по сравнению с *AOX1a* характер, что свидетельствует о роли АОХ в регуляции экспрессии генов других белков, участвующих в поддержании гомеостаза зеленеющей клетки. Активация альтернативных НАДН-ДГ на более позднем этапе деэтиоляции указывает на увеличение поставок в митохондриальную ЭТЦ восстановителей фотосинтетического и фотодыхательного происхождения. Полученные данные свидетельствуют об участии H_2O_2 в контроле уровня экспрессии *AOX1a* по принципу обратной связи.

Работа поддержана грантом Уральского отделения РАН № 12-У-4-1008.

Литература

1. Noguchi K., Yoshida K. Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves // *Mitochondrion*. 2008. V 8. P. 887–99.

2. Rasmusson A.G., Escobar M.A. Light and diurnal regulation of plant respiratory gene expression // *Physiol. Plant.* 2007. V. 129. P. 57-67.
3. Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Popov V.N. Phytochrome-mediated regulation of plant respiration and photorespiration // *Plant Cell Environ.* 2013. doi: 10.1111/pce.12155.
4. Garmash E.V., Dymova O.V., Malyshev R.V., Plyusnina S.N., Golovko T.K. Developmental changes in energy dissipation in etiolated wheat seedlings during the greening process // *Photosynthetica.* 2013. V. 51. P. 497-508.
5. Абдрахимова Й.Р., Хохлова Л.П., Абрахимов Ф.А. Особенности дыхания и морфологии митохондрий узлов кущения озимой пшеницы при действии низких температур и картолина // *Физиология растений.* 1998. Т. 45. С. 253-261.
6. Dinakar C., Raghavendra A.S., Padmasree K. Importance of AOX pathway in optimizing photosynthesis under high light stress: Role of pyruvate and malate in activating of AOX // *Physiol. Plant.* 2010. V. 139. P. 13-26.
7. Popov V.N., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Igamberdiev A.U. Succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* is regulated by light via phytochrome A // *FEBS Letters.* 2010. V. 584. P. 199–202.
8. Гармаш Е. В., Малышев Р. В., Шелякин М. А., Головко Т. К. Активность дыхательных путей и фонд неструктурных углеводов в листе зеленеющих проростков яровой пшеницы // *Физиология растений.* 2014. Т. 61. С. 177-186.
9. Maxwell D.P., Wang Y., McIntosh L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 8271–8276.
10. Juszczuk I.M., Szal B., Rychter A.M. Oxidation–reduction and reactive oxygen species homeostasis in mutant plants with respiratory chain complex I dysfunction // *Plant Cell Environ.* 2012. V. 35. P. 296–307.

LIGHT REGULATION OF MITOCHONDRIAL NON-PHOSPHORYLATING PATHWAYS IN GREENING CELLS OF WHEAT LEAF

Garmash E.V., Gabelnykh O.I., Velegzhaninov I.O., Borovik O.A., Kokovkina E.V., Dalke I.V., Voinikov V.K., Golovko T.K.

Triticum aestivum, leaf, mitochondria, electron-transport chain, non-phosphorylating pathways, alternative oxidase, de-etiolation

Engagement and functioning of the non-phosphorylating pathways (alternative oxidase, AOX, external and internal dehydrogenases, NDex and NDin, and uncoupling proteins) in mitochondria during de-etiolation of spring wheat (*Triticum aestivum* L., var. Irgina) seedlings was studied. Differential character of genes encoding the enzymes was revealed. *AOX1a* expression was up-regulated by light and was likely responsible for induction of the other respiratory genes. Induction of the electron flow through the NDex and NDin at the later period of de-etiolation was rather connected with oxidation of reductants generated during photosynthesis and photorespiration. The data obtained are according to the idea that the antioxidant systems involving AOX are very effective in controlling tissue H₂O₂.

ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»,
пр. Ленина, 36, г. Томск, 634050, Россия, E-mail: golovatskaya.irina@mail.ru

зеленый свет, фитохромы, криптохромы, фототропины, Zeitlupe, гелиохром, родопсин, фитогормоны, морфогенез, фотосинтез, цветение

Зеленый свет (ЗС) наряду с другими участками видимой области электромагнитного излучения несет информацию об окружающей среде растений [1] и действует на все процессы их жизнедеятельности. И если энергетическая роль ЗС в фотосинтезе наземных растений оспаривается, то для водорослей в водной среде на глубинах имеет она большое значение. Кроме этого установлена регуляторная роль ЗС в жизнедеятельности растений и изучена по многим аспектам. Доля ЗС в световом потоке (изменение соотношения ведущих фотосинтетически активных диапазонов солнечной радиации) свидетельствует об определенном времени суток, фильтрации солнечного излучения листвой или толщей воды («зеленая тень»). Выполняя регуляторную роль, ЗС изменяет функционирование систем эндогенной регуляции, включая сенсорные фоторецепторы, вторичные посредники, гормональный баланс, геном. Показано большое число рецепторов, которые могут быть активированы и/или инактивированы ЗС (криптохромы *cry1–3*, фототропины *phot1–2*, *ZTL/FKF1/LKP2* и фитохромы *phyA–E*) [2–4]. В литературе обсуждаются рецепторы: гелиохром, родопсин и *GCR1*. Все многообразие рецепторов обеспечивает адекватную реакцию растений на условия освещения, реализуя соответствующие подпрограммы развития (деэтиоляцию, фотоморфогенез, фотопериодизм, фототропизм, избегание тени).

ЗС регулирует уровень Ca^{2+} , содержание фитогормонов, активность хлоропластных генов [5–7]. Изменяя процессы в растении, ЗС регулирует морфологию клеток, тканей и органов, контролирует все этапы их развития [5, 8–10], регулирует движение устьиц [11].

На начальных этапах онтогенеза растений ЗС стимулирует процессы, сопровождающие деэтиоляцию проростков растений. Он ускоряет формирование мембранной системы пластид до ламеллярного типа включительно, формирование крист митохондрий, индуцирует стимуляцию роста колеоптилей и синтеза пигментов фотосинтеза [7, 12, 13].

При длительном культивировании растений ЗС оказывает неоднозначное действие на многие процессы. Специфичность действия ЗС определяется генотипом и продолжительностью онтогенеза растений. Медленно растущие виды формируют меньшую листовую поверхность на ЗС по сравнению с белым, красным (КС) и синим (СС) светом, тогда как у более активно растущих видов поверхность листа сопоставима с таковой на КС [6, 8]. Возрастная специфика действия ЗС на гормональный статус листа в онтогенезе растений обусловлена замедлением синтеза, транспорта и/или разрушением фитогормонов [13]. Общая закономерность в регуляторном действии ЗС на морфогенез растений связана с регуляцией роста клеток и их плотности упаковки в мезофилле, уменьшением общего числа хлоропластов в единице поверхности листа, определяющего низкую интенсивность фотосинтеза [6, 8]. Спектр действия накопления пигментов (хлорофилла, антоцианов) в проростках, рост и развитие проростков и растений меняется в зависимости от интенсивности ЗС. Действие ЗС низкой интенсивности ингибирует удлинение генеративного побега, увеличивает продолжительность вегетативной стадии развития и замедляют переход растений к цветению по сравнению с действием СС [13, 14].

В заключение следует отметить, что одновременное поглощение ЗС несколькими регуляторными и нерегуляторными фоторецепторами, неодинаково активированными светом и взаимодействующими между собой, определяет разное направление и уровень ответных реакций растений на действие ЗС.

Литература

1. Клешнин А.Ф. Растение и свет. М.: Наука, 1954. 456 с.
2. Карначук Р.А., Постовалова В.М., Беленькая Е.В., Жуланова С.Г. Фитохромный контроль метаболизма ^{14}C -углеводов в растениях // Физиология растений. 1978. Т. 25. С. 268–271.
3. Головацкая И.Ф. Роль криптохрома 1 и фитохромов в регуляции фотоморфогенетических реакций растений на зеленом свете // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 822–829.
4. Folta K.M., Maruhnich S.A. Green light: a signal to slow down or stop // J. Exp. Bot. 2007. P. 1–13.
5. Карначук Р.А., Негрецкий В.А., Головацкая И.Ф. Гормональный баланс листа растений на свете разного спектрального состава // Физиология растений. 1990. Т. 37, вып. 3. С. 527–534.
6. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф. Гормональный статус, рост и фотосинтез растений, выращенных на свете разного спектрального состава // Физиология растений. 1998. Т. 45, вып. 6. С. 925–934.
7. Ефимова М.В., Карначук Р.А., Кузнецов В.В., Кузнецов Вл.В. Зеленый свет регулирует транскрипцию пластидных генов и стимулирует накопление фотосинтетических пигментов в растениях // Докл. РАН. 2013. Т. 451, № 6. С. 703–706.
8. Карначук Р.А. Регуляторное влияние зеленого света на рост и фотосинтез листьев // Физиология растений. 1987. Т. 34, вып. 4. С. 765–773.
9. Тихомиров А.А., Лисовский Г.М., Сидько Ф.Я. Спектральный состав света и продуктивность растений. Новосибирск: Наука Сиб. Отд-ние, 1991. 168 с.
10. Мошков Б.С. Выращивание растений на искусственном освещении. М.-Л.: Сельхозиздат, 1953. 96с.
11. Talbott L.D., Hammad J.W., Harn L.C. et al. Reversal by green light of blue light-stimulated stomatal opening in intact, attached leaves of *Arabidopsis* operates only in the potassium-dependent, morning phase of movement // Plant Cell Physiol. 2006. V. 47(3). P. 332–339.
12. Шахов А.А. Фотоэнергетика растений и урожай. М.: Наука, 1993. 411 с.
13. Golovatskaya I.F. Brassinosteroids and light – regulatory factors of growth and development of plants // Brassinosteroids: a class of plant hormone. Eds. S. Hayat and A. Ahmad, Springer. 2011. P. 119–143.
14. Константинова Т.Н., Баврина Т.В., Аксенова Н.П. Особенности фоторегуляции генеративного морфогенеза *in vivo* и *in vitro* // Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений / Под ред. А.Л. Курсанова, Н.П. Воскресенской. М.: Наука, 1975. С. 186–198.

GREEN LIGHT REGULATES LIFE OF PLANTS

Golovatskaya I.F.

green light, phytochromes, cryptochromes, phototropins, Zeitiupe, geliochrome, rodopsin, phytohormones, photomorphogenesis, photosynthesis, flowering

Green light (GL) plays energy and regulatory role in life activity of plants. GL transforms functioning systems of an endogenic regulation, including sensory photoreceptors, secondary messengers, hormonal balance and genome. At the initial stages of an ontogenesis of plants GL stimulates the processes accompanying deetiolation of plants seedlings. The action GL is defined by a genotype and duration of an ontogenesis of plants, by intensity of light. General legitimacy in regulating action GL on a morphogenesis of plants is connected with a regulation of cells growth.

ЗАВИСИМОСТЬ МОРФОГЕНЕЗА *ARABIDOPSIS THALIANA* ОТ ДЛИНЫ ПЕРИОДА ДЕЙСТВИЯ СЕЛЕКТИВНОГО СВЕТА

Головацкая И.Ф., Комарова У.А., Соловьева Е.В.

ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»,
пр. Ленина, 36, г. Томск, 634050, Россия, E-mail: golovatskaya.irina@mail.ru*Arabidopsis thaliana*, синий свет, зеленый свет, красный свет, фитохромы, криптохромы, фотоморфогенез, фотопериодизм

Периодичность действия светового фактора на растение устанавливает периодичность процессов его жизнедеятельности, в том числе цветения [1]. Переход к репродуктивной стадии определяется интенсивностью ростовых процессов. В регуляции роста и развития растительного организма участвуют регуляторные фоторецепторы, которые обеспечивают его чувствительность к селективному свету разной интенсивности. Так фитохромы и криптохромы участвуют в регуляции процессов жизнедеятельности соответственно на красном (КС) и синем (СС) свете. В настоящее время недостаточно данных о реакциях растений в ответ на действие разного по продолжительности фотопериода селективного света, и прежде всего зеленого света (ЗС), что имеет существенное значение для регулирования искусственных фотосинтезирующих биосистем. В связи с этим целью исследований было изучение влияния разных фотопериодов СС, ЗС и КС в течение сут. на морфогенез проростков *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.).

Объектом исследования служили 5-дневные проростки длиннодневного растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа Landsberg *erecta* (*Ler*) и его мутантов *hy4* и *hy3*, дефектных соответственно по фоторецептору СС/УФ-А *cry1* и КС/дальнего красного света *phyB*. Проростки культивировали в асептических условиях на СС, ЗС и КС (125 мкмоль фотонов/м²с), полученном от люминесцентных ламп фирмы «Philips» с 8-ми (короткий день – КД) и 16-ти (длинный день – ДД) часовым фотопериодом. Культивирование осуществляли на 50%-ной агаризованной питательной среде MS с добавлением DMSO. Проростки были зафиксированы 50%-ным раствором этилового спирта, их ростовые параметры были измерены с привлечением программы Moticam 2300 (Испания) на фотографиях.

В ходе эксперимента установили, что размеры проростков арабидопсиса зависели от генотипа, качества света и продолжительности светового периода в течение суток. При культивировании проростков мутантов на КД СС показаны отличия их ростовых реакций от таковых исходной линии. У *hy4* отменялось ингибирующее действие СС на растяжение гипокотилия, который в этом случае удлинялся. Такое действие СС могло быть связано с отсутствием фоторецептора *cry1* и/или функционированием других поглощающих СС фоторецепторов фототропинов и ZTL/FKF1/LKP2, участвующих в регулировании циркадных ритмов [2]. В то же время у *hy3* в отсутствие *phyB* отметили ингибирование роста гипокотилия на СС. С увеличением продолжительности световой экспозиции эффект СС увеличился, что, по-видимому, демонстрировало снятие антагонистического взаимодействия между *cry1* и *phyB* при трансдукции сигнала СС, наблюдаемого у дикого типа.

Действие ДК ЗС и КС на проростки *hy3* увеличило растяжение гипокотилия по сравнению с исходной линией, свидетельствуя о важной роли *phyB* в регуляции фотоморфогенеза на этих участках ФАР. При этом на ДД эффект КС частично снимался, что было связано с включением в регуляцию роста другого рецептора КС *phyA*, контролирующего высокоэнергетические реакции.

Сравнение эффектов селективного света в условиях КД на морфогенез показало увеличение продольного растяжения гипокотилия в ответ на действие ЗС и КС по сравнению с действием СС. Активность СС в торможении роста связывают с аддитивным действием фитохромов и криптохромов, специализирующихся в реакциях на низкое и высокое излучение [3]. В условиях КД влияние ЗС и КС на растяжение осевого органа *Ler* и мутанта *hy4* было одинаковым, тогда как в условиях

ДД эффективность в удлинении hypocotyle *hy4* снижалась, что отражало роль *cry1* в циркадных ритмах.

На ДД ЗС и КС вклад *cry1* в регуляцию морфогенеза hypocotyle был выше на 33 и 46%, чем на КД, поскольку этот фоторецептор регулировал высокоэнергетические реакции. Однако наибольшее влияние оказал *phyB*, поскольку различия размеров hypocotyle *hy3* и *Ler* на КД составили 50%, а на ДД – 85–100%.

Основная функция зародышевого стебля проростков – hypocotyle – состоит в выносе семядоли на свет, поэтому следует ожидать, что в процессе их фотоморфогенеза, чем больше света поступает к проростку или чем дольше проросток находится на свету, тем короче hypocotyle. Увеличение продолжительности фотопериода селективного света с 8 до 16 ч в течение 24-часовых сут. привело к уменьшению линейных размеров осевого органа *A. thaliana*. Экстраполирование полученных данных на процессы фотоморфогенеза показывает, что увеличением продолжительности светового потока в течение сут. можно усилить степень его проявления. Однако, при длительном культивировании растений на свету следует ожидать усиление энергетической роли света и соответственно этому усложнение взаимодействия фоторегуляторных и фотосинтетических процессов.

Световая регуляция роста проростков, изменяя длину hypocotyle, приводила к соответствующим фотоморфогенетическим изменениям площади семядолей: формирование длинных hypocotyle сопровождалось формированием меньшей поверхности семядолей.

Таким образом, полученные данные свидетельствовали о специфичности ростовых реакций проростков *A. thaliana* в ответ на действие селективного света короткого и длинного фотопериода, связанной с функционированием *cry1* и *phyB* и их взаимодействием.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№ 11-04-98090-р_сибирь_a).

Литература

1. Константинова Т.Н., Аксенова Н.П., Никитина А.А. Влияние спектрального состава света на развитие рудбекии и периллы в условиях длинного и короткого дня // Физиология растений. 1968. Т. 15, № 2. С. 363–366.
2. Ito S., Song Y.H., Imaizumi T. LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in *Arabidopsis* // *Molecular Plant*. 2012. P. 1–10.
3. Golovatskaya I.F. Brassinosteroids and light – regulatory factors of growth and development of plants // *Brassinosteroids: a class of plant hormone.* / Eds. S. Hayat and A. Ahmad. – Springer. 2011. P. 119–143. DOI 10.1007/978-94-007-0189-2_5.

MORPHOGENESIS OF *ARABIDOPSIS THALIANA* DEPENDS ON PERIOD LENGTH OF SELECTIVE LIGHT ACTION

Golovatskaya I.F., Komarova U.A., Solovyeva E.V.

Arabidopsis thaliana, blue light, green light, red light, phytochromes, cryptochromes, photomorphogenesis, photoperiodism

We investigated the growth of seedling of mutant of long-day plant *Arabidopsis thaliana* (L). Heynh. ecotype Landsberg *erecta hy4* and *hy3*. We showed specific growth reactions of hypocotyle and cotyledons in reply to action of blue, green and red light in conditions of a short and long photoperiod which are connected with functioning *cry1* and *phyB* and their interaction.

ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,
Ленинские горы, д. 1, стр. 12, г. Москва, 119234, Россия, E-mail: irina.strizh@mail.ru

Arabidopsis thaliana, первичный корень, *CLAVATA*

Введение

Участие продуктов генов *CLAVATA* в регуляции роста и развития растений общеизвестно в связи с их неоспоримой ролью в поддержании апикальной меристемы побега, а также благодаря наличию большого числа гомологичных пептидов, обладающих физиологической активностью [1,2]. Относительно недавно, было обнаружено важное значение пептидов семейства CLE (*CLAVATA/ESR* – related) в регуляции роста и развития корня [3]. В последнее десятилетие установлено, что некоторые продукты генов семейства CLE активно участвуют в росте первичного корня *Arabidopsis*. Белки CLV1 и CLV2, формируют рецепторные комплексы не только для пептида, являющегося продуктом протеолиза белка, кодируемого геном *CLV3*, но и для других пептидов CLE семейства. Можно предположить, что эти рецепторы необходимы для осуществления эффективной координации ростовых процессов как в апикальной меристеме побега, но и в корне. Было установлено изменение в росте корня *Arabidopsis* в растениях с нарушенной функцией вышеупомянутых генов на этапах развития корня более 14 дней [4]. Вместе с тем, участие генов *CLV1*, *CLV2* и *CLV3* в регуляции роста первичного корня на ранних этапах роста *Arabidopsis* мало изучено.

Материалы и методы

Для проведения исследования использовали растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh экотипа Landsberg erecta (Ler) урожая 2012 года и растения мутантов по генам *CLAVATA* (*clv1*, *clv2-2*, *clv3-2*). Перед посадкой семена стерилизовали в 1 % растворе перекиси водорода в 70 % этиловом спирте в течение 3 минут. Семена высаживали в стерильных условиях на поверхность твердой агаризованной среды (0,8 % агара) с половинным содержанием солей и сахарозы от разработанной Мурасиге и Скугом [5] без добавления витаминов, в чашки Петри. После посадки семена стратифицировали в течение 3 дней при температуре 2°C. Далее растения выращивали в вертикальной ориентации, в условиях 16-часового светового дня при температуре 25°C и освещенности 70 мкЕ/м²с⁻¹. Сравнение длин корней контрольных растений и мутантов по генам *CLAVATA* проводили на 4, 7 и 8 дни. В указанные выше дни была произведена фотосъемка проростков с разрешением 5 МП, 2592*1944 и полученные фотографии были обработаны в программе ImageJ 1.37v (“Wayne Rasband”, США). Анализировали, в среднем, по 40-60 растений. Статистическую обработку данных для определения значимости различий между средними значениями сравниваемых выборок проводили с учетом доверительного интервала в программе Microsoft® Office Excel® 2010, а также с помощью ANOVA теста.

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены значения длины корней всех опытных групп растений на 4, 7 и 8 дни. Исходя из полученных результатов, можно утверждать, что средняя длина корней 4х дневных проростков растений дикого типа достоверно больше, чем у всех мутантных растений по генам *CLV*. Вместе с тем, после 8 дней выращивания растения дикого типа начинают существенно отставать от мутантов по генам *CLAVATA* по длине первичного корня. Это может свидетельствовать о том, что на ранних этапах формирования первичного корня продукты генов *clv1*, *clv2-2* и *clv3-2* выполняют противоположные функции, чем на более поздних этапах. Еще одним объяснением может быть вовлечение дистанционного влияния апекса

побега, развитие которого регулируется вышеупомянутой системой *clv1-clv3*, на рост первичного корня.

По данным Fiers с сотрудниками, трансмембранная лейцин-обогащенная киназа CLV2 участвует в передаче сигнала от пептида CLE40, аналога пептида CLV3, что в свою очередь тормозит действие транскрипционного фактора WOX5 на инициали апикальной меристемы корня [4]. На 7 и 8 дни мы наблюдали достоверное отличие длин корней растений дикого типа от мутантов *clv2-2* и *clv3-2*, причем эти растения опережали дикий тип по длине корня. Вместе с тем, мы обнаружили существенное превышение длины корня мутантов *clv1* по сравнению с диким типом (рис.1). Одним из возможных объяснений может быть тот факт, что пептид CLE40, гомолог пептида CLV3, может осуществлять свое действие на WOX5 также через гомо и гетеродимерные рецепторные комплексы, включающие в свой состав CLV1 [6], что тоже может приводить к замедлению роста первичного корня.

При анализе динамики роста корня мутантов *clv3-2* нам удалось обнаружить, что CLV3 тоже задействован в процессе роста первичного корня *Arabidopsis*. Эти результаты интересны тем, что, согласно данным литературы, ген CLV3 не экспрессируется в корне. Можно предположить, что его влияние осуществляется дистанционно и, возможно, через рецептор CLV2, поскольку у растений мутантов по этим генам схожи длины корней.

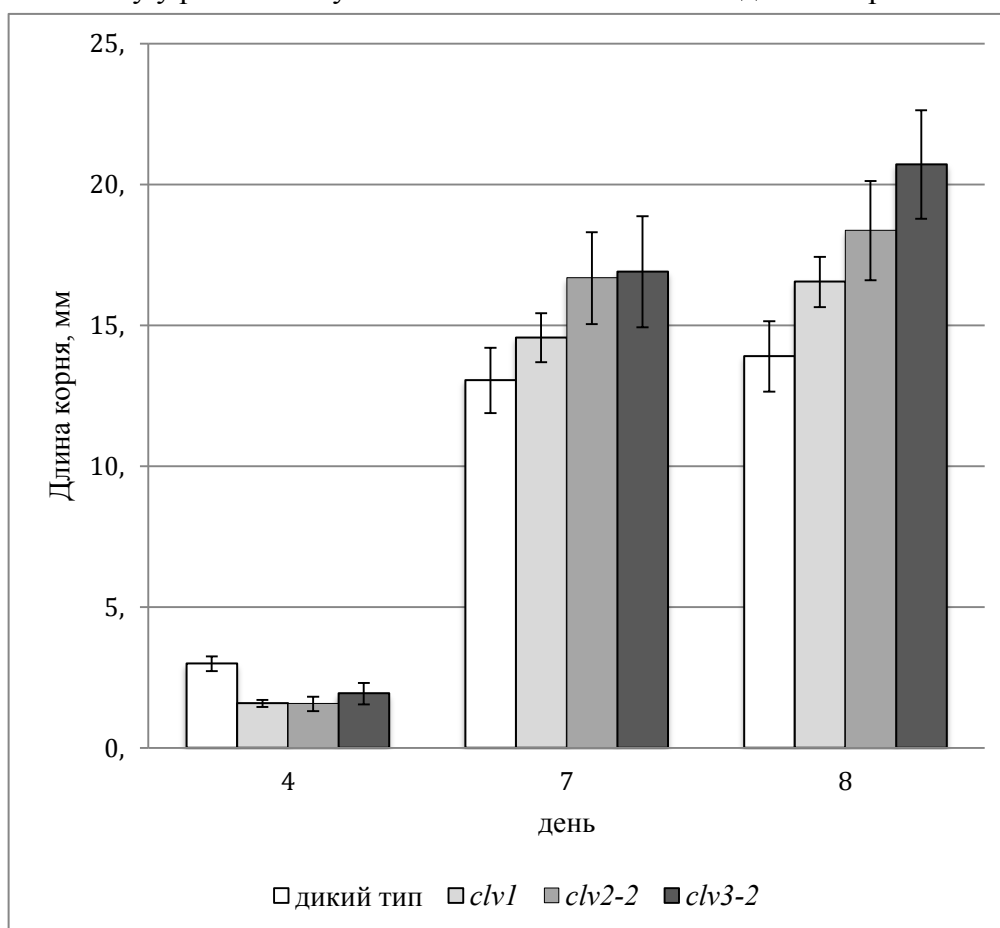


Рисунок 1 – динамика роста первичного корня мутантов по генам *clavata b lbrjuj nbgf Arabidopsis* (белый – wt, светло-серый - *clv1*, серый – *clv2-2*, темно-серый – *clv3-2*)

Figure 1 - Growth dynamics of the *Arabidopsis* primary root (white – wt, light grey- *clv1*, middle grey – *clv2-2*, dark grey– *clv3-2*)

Заключение

В настоящее время, наиболее хорошо охарактеризованными и описанными в учебниках, сигнальными и регуляторными молекулами в растениях являются фитогормоны, по-

движные факторы транскрипции и некодируемые РНК [7]. Вместе с тем, за последние годы было открыто множество пептидов, выполняющих разнообразные функции и принимающие участие в координации процессов роста и развития растений. Работы последних лет раскрывают функциональную роль коротких пептидов в таких процессах развития корня, как, например, поддержание меристемы, гравитропизм, развитие боковых корней, дифференцировка протиксилемы [3]. Первичный корень *Arabidopsis* является удобным и общепринятым объектом для тестирования физиологической активности различных соединений. Мы обнаружили, что влияние продуктов генов *CLAVATA* на рост первичного корня *Arabidopsis* наблюдается уже на ранних этапах развития проростка. Дальнейшее исследование механизмов рецепции и трансдукции пептидного сигналинга представляется актуальной проблемой современной физиологии растений.

Литература

1. Cock JM, McCormick S. A large family of genes that share homology with *CLAVATA3* // *Plant Physiology*, 2001, 126, 3, 939-942.
2. Lindsey K, Casson S, Chilley P. Peptides: new signaling molecules in plants // *TRENDS in Plant science*, 2002, 7, 2, 78-83.
3. Delay C, Imin N, Djordjevic MA. Regulation of *Arabidopsis* root development by signaling peptides // *Frontiers in Plant Science*, 2013, 6, 4, 352-358
4. Fiers M, Golemiac E, Xu J, van der Geest L, Heidstra R, Stiekema W, Liu C-M. The 14-Amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a *CLAVATA2*-dependent pathway // *Plant Cell*, 2005, 17, 2542-2553
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. // *Physiologia Plantarum*, 1962, 15, 473-497
6. Stahl Y, Simon R. Peptides and receptors controlling root development // *Philosophical Transactions of the royal society*, 2012, 367, 1595, 1453-1460
7. Van Norman JM., Benfey P. *Arabidopsis thaliana* as a model organism in systems biology // *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2009, 1, 3, 372-379
8. Lindsey K, Casson S, Chilley P. Peptides: new signalling molecules in plants // *TRENDS in Plant Science*, 2002, 7, 2, 78-83

THE ROLE OF THE *CLAVATA* GENES IN *ARABIDOPSIS* PRIMARY ROOT GROWTH

Grushevskaya M.S., Strizh I.G.

Arabidopsis thaliana, primary root, *CLAVATA*

Products of the *CLAVATA* genes are well known as the essential proteins in cell-to-cell communication in plants. In spite of their importance in shoot apical meristem maintenance, the role in the root apical meristem is not so clear. We have analyzed the primary root growth of the *clv1*, *clv2* and *clv3* mutants on the early growth stage.

РЕЦЕПТОРУ ЦИТОКИНИНА АНК3 ПРИНАДЛЕЖИТ ВЕДУЩАЯ РОЛЬ В КОНТРОЛЕ ЭКСПРЕССИИ ПЛАСТИДНЫХ ГЕНОВ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Данилова М.Н., Кудрякова Н.В., Дорошенко А.С., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35,
г. Москва, 127276, Россия, Email: mariadaniлова86@yandex.ru*Arabidopsis thaliana*, хлоропласты, цитокинины, рецепторные гистидинкиназы, двукомпонентная система, регуляция экспрессии генов**Введение**

Цитокинины (ЦК), растительные гормоны, контролирующие разнообразные процессы роста и развития растений. Эти фитогормоны регулируют экспрессию генов растений с участием двукомпонентной системы трансдукции сигнала: связываясь с мембранными рецепторами, они запускают фосфатный каскад передачи сигнала, приводящий к изменению экспрессии специфических цитокинин-чувствительных генов. В настоящее время у *Arabidopsis thaliana* известны три рецептора цитокинина - АНК2, АНК3 и АНК4, которые представляют собой мембранные сенсорные гистидинкиназы. Согласно литературным данным ЦК оказывают многостороннее влияние на пластиды, активируя их структурную и биохимическую дифференцировку. Кроме того, ЦК активирует накопление транскриптов хлоропластных белков, кодируемых ядерным и хлоропластным геномами (Brenner et al., 2005), и индуцируют формирование хлоропластов в темноте (Chory et al., 1994). Показано также, что ЦК стимулируют транскрипцию ряда хлоропластных генов (Zubo et al., 2008). Несмотря на многочисленные данные, согласно которым цитокинины способны регулировать экспрессию генов пластома, механизм передачи цитокининового сигнала в хлоропласты до сих пор остается не изученным. В связи с этим значительный интерес представляло выяснение функции каждого из рецепторов в ЦК-зависимой регуляции экспрессии хлоропластных генов. Различная роль рецепторов ЦК в регуляции биогенеза хлоропластов представляется весьма вероятной, поскольку их функция в различных биологических процессах не идентична (Riefler et al., 2005). Следовательно, можно было ожидать, что рецепторы ЦК могут играть различную роль в цитокинин-зависимой регуляции экспрессии генов пластома.

Материалы и методы

Для выяснения роли рецепторов ЦК в регуляции экспрессии хлоропластных генов использовали одинарные и двойные инсерционные мутанты *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh с инактивированными генами, кодирующими мембранные рецепторы ЦК. Семена любезно предоставлены профессором С. Nishimura (университет Нагойи, Япония). Растения выращивали в климатической камере в почве при температуре 23°C и освещенности 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Продолжительность светового периода составляла 16 ч. Исследование относительного уровня экспрессии гена первичного ответа на ЦК *ARR5* и некоторых хлоропластных генов проводили на листьях трехнедельных растений методом ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции (ПЦР РВ). Для анализа были выбраны гены пластома, кодирующие полипептиды, входящие в состав различных функциональных белковых комплексов тилакоидных мембран хлоропластов. В качестве референсного гена использовали ген *UBQ10*. Калибратором служил образец дикого типа.

Результаты и обсуждение

Для выяснения чувствительности мутантов по рецепторам цитокинина к эндогенным цитокининам исследовали экспрессию гена первичного ответа на цитокинин - *ARR5*, который принято считать маркером действия цитокинина. Анализ показал, что инактивация генов рецепторов ЦК приводила к снижению экспрессии гена *ARR5*, что, по-видимому, отражает снижение чувствительности к эндогенным ЦК. Наибольшее ингибирующее действие на экспрессию этого гена оказывало отсутствие в интактных растениях рецептора АНК3, который принято считать основным рецептором ЦК в листьях.

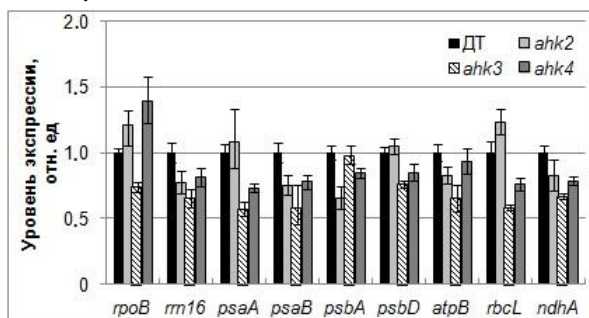


Рисунок 1 - Экспрессия пластидных генов у растений дикого типа и одинарных *ahk* мутантов

Figure 1 - Plastid gene expression in single *ahk* mutants

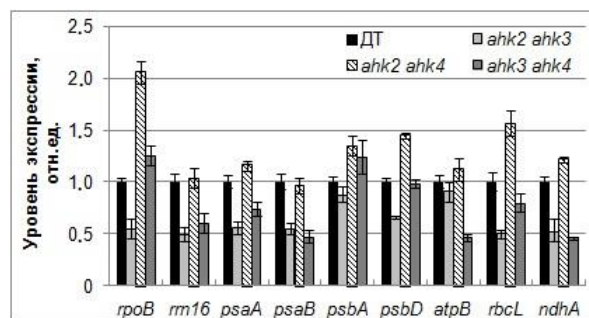


Рисунок 2 - Экспрессия пластидных генов у растений дикого типа и двойных *ahk* мутантов

Figure 2 - Plastid gene expression in double *ahk* mutants

Относительный количественный анализ накопления транскриптов хлоропластных генов в листьях растений дикого типа и мутантов, содержащих зрелые активно функционирующие хлоропласты, показал, что для большинства исследованных генов инактивация одного из трех рецепторов приводила к заметному снижению уровня транскриптов хлоропластных генов. Однако мутант *ahk3* характеризовался достоверно меньшим содержанием транскриптов всех исследованных генов, как по сравнению с диким типом, так и по сравнению с другими мутантами. Исключение составил ген *psbA*, кодирующий белок *D1* ФСII. Следовательно, нормальный уровень транскриптов хлоропластных генов в клетке обеспечивает присутствием главным образом рецептора АНК3. Ранее в литературе было показано, что АНК3 рецептор специфично фосфорилирует определенный регулятор ответа на ЦК типа В – ARR2, что приводит к задержке распада хлорофилла у отделенных листьев в темноте и, как следствие, способствует долготелию листа (Kim et al., 2006). Нами же установлено, что АНК3 рецептору принадлежит главная роль и в ЦК-опосредованном механизме накопления транскриптов хлоропластных генов. Анализ двойных мутантов выявил достоверное снижение по сравнению с диким типом накопления транскриптов практически всех исследованных хлоропластных генов у мутанта *ahk2ahk3*, включавшего активный рецептор АНК4. Двойной мутант *ahk3ahk4*, содержащий единственно активный рецептор АНК2, также характеризовался снижением мРНК большинства хлоропластных генов. Исключение составили три гена – *rpoB*, кодирующий β субъединицу РНК полимеразы бактериального типа, и гены ФСII – *psbA* и *psbD*, накопление транскриптов которых рецептор АНК2 регулировал позитивно. Таким образом, полученные результаты дают основание предполагать, что АНК2, наряду с АНК3, играет важную роль в контроле поддержания уровня мРНК генов хлоропластного кодирования. Двойной мутант *ahk2ahk4*, включающий единственный активный рецептор АНК3, характеризовался нормальным по сравнению с диким типом или заметно повышенным накоплением транскриптов генов *rpoB*, *psbA*, *psbD* и *rbcL*. Эти данные свидетельствуют о важном значении АНК3 в контроле уровня мРНК хлоропластных генов и дополняют существующие литературные данные о первостепенном значении этого рецептора для поддержания листьев в активном функциональном состоянии. Таким образом, мутации по АНК3 киназе в большей степени нарушают трансдукцию сигнала эндогенных ЦК в хлоропласты, что негативно сказывается на накоплении мРНК хлоропластных генов. По-видимому, АНК3 рецептор, специфично взаимодействуя с генами ответа на гормон, расположенными ниже цепи трансдукции ЦК сигнала, способен активировать экспрессию пула генов, позитивно контролирующего процесс транскрипции и экспрессии пластидных генов. Можно предположить, что это могут быть гены, участвующие в процессе транскрипции пластома: гены *транс*-факторов (сигма-факторов), необходимые для функционирования РНК полимеразы собственного кодирования или гены РНК полимеразы фагового типа ядерного кодирования. Важная роль АНК3 рецептора для нормального роста и развития растительного организма подтверждается литературными данными, согласно которым АНК3 отводит-

ся главная роль в накоплении хлорофилла в интактных растениях, в ЦК-индуцированном развитии побегов в темноте и поддержании долголетия листа (Riefler et al., 2005; Kim et al., 2006).

Заключение и выводы

Полученные данные указывают на доминирующую роль рецептора АНК3 в контроле биогенеза хлоропластов, что выразалось в регуляции накопления мРНК хлоропластных генов, кодирующих важнейшие полипептиды белковых комплексов хлоропластов. Наряду с АНК3 в регуляции экспрессии некоторых генов пластидного кодирования, вероятно, принимает участие АНК2. Наши результаты также дополняют существующие литературные данные о важном значении этого рецептора для поддержания листьев в активном функциональном состоянии. Таким образом, можно сделать вывод, что рецептор АНК3 играет ведущую роль в передаче цитокининового сигнала в хлоропласты, приводящего к активации транскрипции хлоропластных генов в листьях, несущих активно фотосинтезирующие хлоропласты.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ, грант 14-04-00818.

Литература

1. Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., and Schmölling, T., Arabidopsis Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth, Leaf Senescence, Seed Size, Germination, Root Development and Cytokinin Metabolism // *Plant Cell*. 2006. V. 18, P. 40–54.
2. Chory J, Reinecke D, Sim S, Washburn T, Brenner M. A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* (det mutants have an altered response to cytokinins) // *Plant Physiology*. 1994. V. 104, P. 339–347.
3. Zubo Y.O., Yamburenko M.V., Selivankina S.Y., Shakirova F.M, Avalbaev A.M., Kudryakova N.V., Zubkova N.K., Liere K., Kulaeva O.N., Kusnetsov V.V., Börner Cytokinin Stimulates Chloroplast Transcription in Detached *Barley* Leaves // *Plant Physiology*. 2008, V. 148, P. 1082–1093.
4. Brenner, W., Romanov, G.A., Köllmer, I., Burkle, L., and Schmölling, T., Immediate-Early and Delayed Cytokinin Response Genes of *Arabidopsis thaliana* Identified by a Genome-Wide Expression Profiling Reveal Novel Cytokinin-Sensitive Processes and Suggest Cytokinin Action through Transcriptional Cascades // *Plant J*. 2005. V. 44, P. 314–333.
5. Kim H.J., Ryu H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. Cytokinin mediated control of leaf longevity by AHK through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis* // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2006. V. 103. P. 814–819.

ARABIDOPSIS CYTOKININ RECEPTOR AHK3 REVEALS A LEADING ROLE IN THE CONTROL OF CHLOROPLAST GENE EXPRESSION

Danilova M.N., Kudryakova N.V., Doroshenko A.S., Kusnetsov V.V., Kulaeva O.N.

Arabidopsis thaliana, chloroplasts, cytokinins, histidine kinase receptors, two-component system, control of gene expression

Though chloroplasts are among the targets of cytokinin (CK) action, up to now nothing is known about possible functions of CK receptors in regulation of expression of chloroplast genes. We observed differential transcript levels of chloroplast genes depending on the lack of a particular receptor kinase. The results obtained suggest that, AHK3 plays a leading role in cytokinin signal transduction to chloroplast promoting accumulation of transcripts of chloroplast genes.

ЭКСПРЕССИЯ СПЛАЙСИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ МРНК ГЕНОВ *CDPK3A* И *CDPK9* В ВИНОГРАДЕ АМУРСКОМ *VITIS AMURENSIS* RUPR.: ИСТИННЫЙ И ЛОЖНЫЙ АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ

Дубровина А.С.¹, Киселев К.В.¹, Христенко В.С.^{1,2}, Алейнова О.А.¹

¹ФГБУН Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, пр. Столетия Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, Россия, E-mail: dubrovina@biosoil.ru

²ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», Школа естественных наук, ул. Октябрьская 27, г. Владивосток, 690090, Россия

виноград, альтернативный сплайсинг, кальций-зависимые протеинкиназы, экспрессия генов

Альтернативный сплайсинг – это процесс регуляции экспрессии генов, при котором кодирующие участки мРНК могут соединяться между собой различным образом, приводя, таким образом, 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 (Syed et al., 2012). Так, установлено, что ~42-61% интрон-содержащих генов арабидопсиса подвергаются альтернативному сплайсингу, что во многих случаях вносит значительный вклад в способность растений своевременно отвечать на различные стрессовые условия или гормональные сигналы (Marquez et al., 2012). В настоящее время литературе не представлена информация о распространенности альтернативного сплайсинга для многих генов растений, а также том, как альтернативный сплайсинг регулирует активность и функции ферментов растений. Получение этой информации необходимо не только для более полного понимания процессов роста, развития и защитных реакций растений, но и для развития биотехнологии растений, в частности для разработки наиболее эффективных подходов к созданию трансгенных растений.

Кальций-зависимые протеинкиназы (CDPK) – это 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 окружающей среды, участвуют в регуляции вторичного метаболизма и в формировании клубеньков при взаимодействии растений и бактерий Rhizobiaceae, а также во многих других жизненно важных процессах у растений (Медведев, 2005; Klimecka and Muszyńska, 2007). На сегодняшний день в литературе не представлена информация о распространенности альтернативного сплайсинга для генов протеинкиназ растений, в том числе и генов *CDPK*.

Цель настоящей работы – определить, подвергаются ли гены *CDPK* винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr. альтернативному сплайсингу, а также изучить основные характерные черты и предполагаемые механизмы образования альтернативных транскриптов *CDPK* в случае их обнаружения. В качестве модельной системы для исследований использовались растения винограда амурского *V. amurensis*. Использование дикого винограда в качестве модельной системы для исследований особенно интересно, поскольку виноград амурский *V. amurensis*, произрастающий на Дальнем Востоке России, обладает высоким адаптивным потенциалом и высоким уровнем устойчивости к неблагоприятным факторам среды. Данные литературы свидетельствуют о том, что CDPK выполняют важные функции в адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды. Важно отметить, что геном *V. vinifera*, близкого вида для *V. amurensis*, секвенирован, депонирован в ГенБанк и частично аннотирован, что вносит существенные методические возможности и делает виноград удобной модельной системой.

Тотальную РНК выделяли из различных органов и тканей лиан *V. amurensis* (листья, стебли, ягоды и черешки листьев), после чего получали кДНК с использованием обратной транскрипции. Для последующего клонирования и секвенирования транскриптов мРНК были выбраны гены *VaCDPK3a* и *VaCDPK9*, экспрессия которых значительно активируется (*VaCDPK9*) или не отвечает (*VaCDPK3a*) на стрессовые условия окружающей среды по нашим данным (Dubrovina et al., 2013). Полноразмерные кодирующие последовательности мРНК транскриптов генов *VaCDPK3a* и *VaCDPK9* были амплифицированы, клонированы и секвенированы. Помимо полноразмерных кДНК *VaCDPK3a* и *VaCDPK9*, нами были детектированы многочисленные необычные укороченные последовательности мРНК генов *VaCDPK3a* и *VaCDPK9*. При клонировании и секвенировании полных последовательностей кДНК генов *VaCDPK9* и *VaCDPK3a* обнаружены последовательности кДНК, где отсутствовали обширные участки, затрагивающие функционально важные области: обширные участки киназного, аутоингибиторного и/или Ca^{2+} -связывающего доменов, вследствие чего во многих случаях изменялась рамка считывания, и появлялись преждевременные стоп-кодона.

Из литературы известно, что стандартными сайтами сплайсинга в большинстве случаев являются 5'GT донорный и 3'AG акцепторный динуклеотиды, которые находятся на границах участков, вырезаемой сплайсосомой (Reddy, 2007). Важно отметить, что на границах отсутствующих участков во всех детектированных транскриптах *VaCDPK3a*, а также среди прилегающих нуклеотидов, отсутствовали стандартные донорные и акцепторные сайты сплайсинга, а вместо этого присутствовали короткие прямые повторы длиной 6-8 нуклеотидов. Для *VaCDPK9* мы обнаружили как транскрипты с прямыми повторами, так и транскрипты со стандартными сайтами сплайсинга. Мы предположили, что транскрипты *VaCDPK9*, которые могли быть образованы с использованием стандартных сайтов, являются результатом альтернативного сплайсинга или процесса сходного с альтернативным сплайсингом. Однако происхождение транскриптов *VaCDPK9* и *VaCDPK3a*, содержащих прямые повторы на границах вырезаемых участков, оставалось неясным. Анализ полученных данных и данных литературы показал необходимость проверки, действительно ли наблюдаемые короткие транскрипты *CDPK* образованы в результате альтернативного сплайсинга или же являются результатом работы используемой ревертазы, то есть, являются ли артефактом проведения обратной транскрипции. Для этого полученные данные были экспериментально проверены с помощью использования высокоточной термоустойчивой ревертазы. При проведении обратной транскрипции при высоких температурах (+65°C) оказалось, что содержание транскриптов *VaCDPK3a* и *VaCDPK9* с нестандартными сайтами сплайсинга резко снижается, в то время как относительное содержание транскриптов *VaCDPK9*, где присутствовали стандартные сайты сплайсинга на границах вырезаемых участков, остается неизменным. Содержание сплайсированных транскриптов *VaCDPK9* в тканях *V. amurensis* составляло 5-6%.

Нами установлено, что в результате образуются три вида альтернативных транскриптов *VaCDPK9SF1*, *VaCDPK9SF2* и *VaCDPK9SF3*, в последовательности киназного домена которых отсутствуют участки длиной 349, 279 и 495 нуклеотидов, соответственно. В результате в последовательности *VaCDPK9SF1* изменяется рамка считывания, и белок *VaCDPK9SF1*, в случае его синтеза, может содержать только N-терминальный домен. В последовательности *VaCDPK9SF2* и *VaCDPK9SF3* рамка считывания не нарушена. Выведенные аминокислотные последовательности *VaCDPK9SF2* и *VaCDPK9SF3* не содержат I-V и I-VII киназных субдоменов, соответственно. Мы предполагаем, что белки *VaCDPK9SF1*, *VaCDPK9SF2* и *VaCDPK9SF3*, в случае их существования, не обладают киназной активностью, поскольку не содержат сайта связывания с АТФ, наличие которого является необходимым для фосфорилирования.

Кроме того, с использованием метода агробактериальной трансформации, нами получены трансгенные клеточные культуры *V. amurensis*, сверхэкспрессирующие некоторые из необычных транскриптов генов *VaCDPK3a* или *VaCDPK9* с отсутствующими участками в функционально важных областях. Исследование ростовых и морфологических характери-

стик, а также устойчивости полученных трансгенных культур клеток к стрессовым условиям, находится на завершающем этапе.

Таким образом, в настоящей работе установлено, что ген *VaCDPK9* подвергается альтернативному сплайсингу, опосредованному стандартными сайтами сплайсинга, в результате чего образуются три типа альтернативных транскриптов, в последовательностях которых отсутствуют важные каталитические субдомены киназного домена. В тоже время показано, что необычные кДНК транскриптов *VaCDPK3a* и *VaCDPK9*, содержащие короткие прямые повторы на границах вырезаемых участков, являются ложными альтернативными транскриптами образованными *in vitro* в результате артефактов обратной транскрипции. Полученные данные показывают, что использование нетермоустойчивых ревертаз для обратной транскрипции является неприемлемым подходом для изучения альтернативного сплайсинга растений, в то время как использование термоустойчивых ревертаз для обратной транскрипции при высоких температурах может способствовать клонированию только истинных альтернативных транскриптов.

Работа выполнена при поддержке Фонда Династия (№ДП-Б-09) и Российского фонда фундаментальных исследований (12-04-31110 мол_а).

Литература

1. Syed N.H., Kalyna M., Marquez Y., Barta A., Brown J.W. Alternative splicing in plants - coming of age // *Trends Plant Sci*, 2012, 17:616-623
2. Marquez Y., Brown J.W., Simpson C., Barta A., Kalyna M. Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis // *Genome Res*, 2012, 22:1184-1195
3. Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система растений // *Физиология растений*, 2005, 52: 1-24.
4. Klimecka M., Muszyńska G. Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases // *Acta Biochim Pol*, 2007, 54:219-233
5. Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Khristenko V.S. Expression of calcium-dependent protein kinase (*CDPK*) genes under abiotic stress conditions in wild-growing grapevine *Vitis amurensis* // *J Plant Physiol*, 2013, 170:1491-1500
6. Reddy A.S. Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic Era // *Ann Rev Plant Biol*, 2013, 58:267-294

EXPRESSION OF SPLICED mRNA VARIANTS OF *VaCDPK3a* AND *VaCPK9* GENES IN WILD-GROWING *VITIS AMURENSIS* RUPR.: TRUE AND FALSE ALTERNATIVE SPLICING

Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Khristenko V.S., Aleynova O.A.

grapevine, alternative splicing, Ca²⁺-dependent protein kinases, gene expression

VaCPK9 gene undergoes unproductive alternative splicing mediated by canonical splice sites to generate three mRNA isoforms lacking important catalytic kinase subdomains. Numerous unusual *VaCPK3a* and *VaCPK9* transcripts with short direct repeats instead of canonical splice sites are likely to be false alternative transcripts generated by RT template switching *in vitro*. The data demonstrate that using non-thermostable RTs for studying alternative splicing is not appropriate.

**УЧАСТИЕ СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ В ОТВЕТЕ НА
ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803**

Зорина А.А., Бедбенов В.С., Новикова Г.В., Паничкин В.Б., Лось Д.А.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35,
г. Москва, 127276, Россия, E-mail: zorina.anna@yahoo.com

Synechocystis, протеом, серин-треониновые протеинкиназы, фосфорилирование, холодовой стресс

Участие серин-треониновых протеинкиназ (СТПК) в регуляции различных процессов жизнедеятельности у разных микроорганизмов является признанным фактом. У одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* ответ на стрессы осуществляется при помощи нескольких регуляторных механизмов, например, двухкомпонентных систем, а также посредством отрицательной сверхспирализации геномной ДНК. В геноме *Synechocystis* насчитывается 12 генов СТПК, причем к настоящему времени функционально охарактеризованы далеко не все. В настоящей работе мы изучали вовлеченность СТПК в передачу стрессовых сигналов об изменении температуры окружающей водной среды.

Результаты биоинформатического анализа позволили нам определить, что 4 из 11 протеинкиназ (SpkC/D/F/L) могут участвовать в ответах клеток на данный стресс. Они имеют в своем составе трансмембранные домены, и поэтому могут «работать» около сайта восприятия холодового сигнала – сенсорной гистидинкиназы Hik33. Однако, исследование при помощи нозерн-блот гибридизации экспрессии ряда стресс-индуцируемых генов (*slr1291*, *slr1469*, *slr0083*, *hliB* и *hliC*) не подтвердило наших первоначальных предположений. Анализ экспрессии холодоиндуцируемых генов продолжили на всей коллекции мутантов при помощи метода ПЦР после обратной транскрипции. Мы обнаружили отличия в профилях экспрессии по сравнению с диким типом у 4 мутантных штаммов. Эти данные дали нам возможность заключить, что протеинкиназы, кодируемые генами *spkB*, *spkE*, *spkD* и *spkG*, могут быть вовлечены в ответ цианобактерии на холодовой стресс. Мутанты по вышеперечисленным генам были использованы для изучения возможных отличий на уровне протеома. Наиболее интересным с точки зрения белкового профиля оказался мутант по протеинкиназе SpkE, набор белков которого значительно отличался от контрольного штамма даже в условиях нормы – при 32°C. В профиле белков Δ SpkE отсутствовало несколько групп: (1) – белки с молекулярной массой 65–75 кДа и *pI* 5.0–5.1; (2) – белки с аналогичной молекулярной массой, но с более щелочным значением *pI* (около 5.3); (3) – белки с молекулярной массой 45–50 кДа и *pI* 5.5. Анализ доступных литературных данных, позволяет утверждать, что белки групп (1) и (2) вероятно принадлежат к семейству шаперонов Hsp60. Достоверно предположить состав группы (3) пока не представляется возможным. Интересно, что стрессовое воздействие низких температур не оказывало значимого влияния на состав белков или их количество в исследуемых клетках. Также мы установили, что наличие гена протеинкиназы SpkE необходимо для фосфорилирования белков в высокомолекулярной области (50-75 кДа), причем сигнал фосфорилирования не относится ни к одной из отсутствующих групп белков. Внутриклеточные субстраты протеинкиназы SpkE еще предстоит выявить. Тем не менее, вопреки ранее высказывавшимся предположениям о нефункциональности SpkE – этот фермент представляет собой функционально активную протеинкиназу с явным предпочтением основных клеточных белков в качестве субстратов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14_04_01446).

Литература

1. А. А. Зорина, В. С. Бедбенев, Г. В. Новикова, В. Б. Паничкин, Д. А. Лось. Участие серин-треониновых протеинкиназ в ответе на холодовой стресс у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803: функциональная характеристика SpkE // Молекулярная биология, 2014, т. 48, № 3.

INVOLVEMENT OF SERINE/THREONINE PROTEIN KINASES IN COLD STRESS RESPONSE IN THE CYANOBACTERIUM *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803

Zorina A.A., Bedbenov V.S., Novikova G.V., Panichkin V.B., Los D.A.

Synechocystis, proteome, serine/threonine protein kinases, phosphorylation, cold stress

Stress responses of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* are fulfilled via a number of regulatory systems. We have studied an involvement of serine/threonine protein kinases (STPK) in the cyanobacterium *Synechocystis* cold stress response. We determine four proteinkinases, SpkB, SpkD, SpkE and SpkG, which could regulate transcription under the low temperature. According to a proteome analysis, SpkE significantly affects the protein pattern in *Synechocystis*

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И РАЗВИТИЯ ЯГОД ВИНОГРАДА НА РАННИХ ЭТАПАХ ЭМБРИОГЕНЕЗА

Казахмедов Р.Э.

ГНУ Дагестанская селекционная опытная станция виноградарства и овощеводства,
ул. Вавилова 9, г. Дербент, Республика Дагестан, 368601, Россия
E-mail: dsosvio@mail.ru; kre_05@mail.ru

виноград, семяпочка, околоплодник, опыление, оплодотворение, интенсивность роста, семенной индекс.

Несмотря на общность процессов цветения бутонов, рост завязей после опыления и оплодотворения семенных сортов различных эколого - географических групп имеет свои особенности, которые определяют дальнейшее развитие ягод и семян и биологическую продуктивность сортов.

Нами была исследована динамика роста завязей (ягод) и семяпочек (семян) в период, непосредственно после опыления (в течение 10 дней) т.к., именно в этот период происходит оплодотворение семяпочек, и он является критическим в плане завязывания ягод для формирования урожая текущего года.

Результаты исследований показали (рис. 1), что у семенных сортов винограда, независимо от их принадлежности к эколого - географической группе, интенсивный рост семяпочек начинается с третьего (Ркацители) - пятого (Агадаи, Каберне - Совиньон) дня после опыления, что следует, видимо, объяснять завершением процесса оплодотворения.

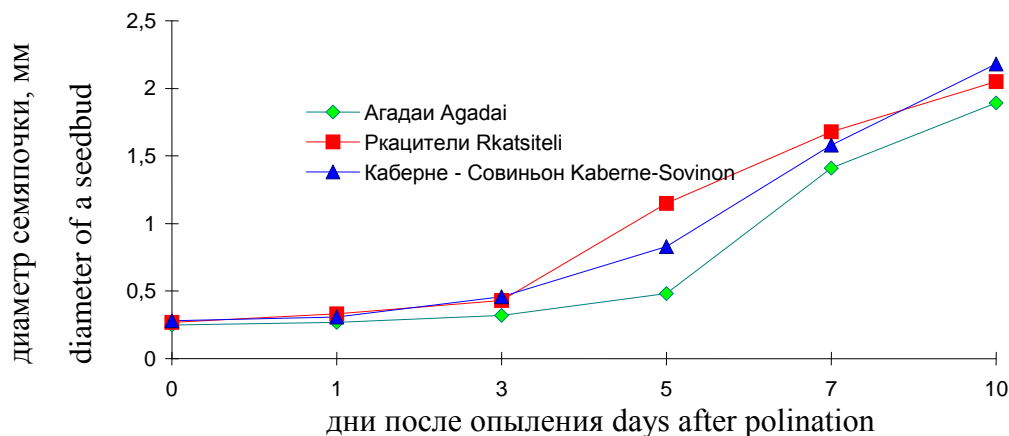


Рисунок 1 - Динамика роста семяпочек семенных сортов винограда различных эколого-географических групп

Figure 1 - Growth dynamics ovules seed varieties of grapes of different ecologo-geographic groups

На пятый день после опыления отмечается также и начало интенсивного роста околоплодника (рис. 2).

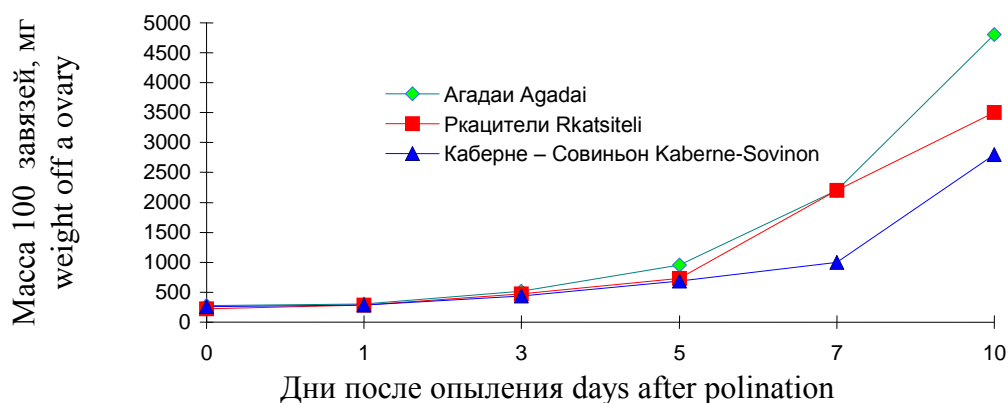


Рисунок 2 - Динамика роста завязей семенных сортов винограда различных эколого-географических групп

Figure 2 - Dynamics of growth of the ovaries seed varieties of grapes of different ecologo-geographic groups

В то же время, обращают на себя внимание морфологические различия в росте и развитии между завязями сортов различных эколого - географических групп.

У семенного сорта Агадаи (*conv. orientalis* Negr.) отмечается более высокая абсолютная масса завязей, начиная с первого дня после опыления и за весь период наблюдения. Несколько меньше масса завязей у сорта Ркацители (*conv. pontica* Negr.) и она минимальна у сорта Каберне - Совиньон (*conv. occidentalis* Negr.). Кроме того, нарастание объема (массы) околоплодника в абсолютном значении происходит интенсивнее у сорта группы *conv. orientalis* Negr., чем у семенных сортов групп *conv. pontica* Negr. и *conv. occidentalis* Negr..

Однако величина семяпочек у сорта Агадаи уступает по величине семяпочкам сортов Ркацители и Каберне - Совиньон.

На 10 день после опыления у сорта Агадаи (*conv. orientalis* Negr.) увеличение массы завязей (околоплодника) происходит в большей степени (в 17,5 раз), чем у сортов Ркацители (*conv. pontica* Negr.) (в 13,6 раз) и Каберне - Совиньон (*conv. occidentalis* Negr.) (в 10,7 раз), но при этом изменение величины семяпочек имеет противоположную тенденцию. Это свидетельствует о склонности сортов группы *conv. orientalis* Negr. к опережающему и преимущественному росту околоплодника и противоположной тенденции у сортов *conv. pontica* Negr. и *conv. occidentalis* Negr..

Подтверждением этому является показатель семенного индекса сортов различных групп (табл. 1) к периоду физиологической зрелости.

Таблица 1 - Семенной индекс различных сортов винограда
Table 1 - Seed index different grape varieties

Сорт	Масса ягоды, г	Масса семян в ягоде, мг	Семенной индекс
Агадаи	2,71	90,63	29,90
Ркацители	1,03	70,0	14,71
Каберне - Совиньон	0,93	99,45	9,35

Семенной индекс (отношение массы ягоды к массе семян в ягоде) у семенного сорта Агадаи выше, чем у сортов Ркацители и Каберне-Совиньон, следовательно, доля семян в

структуре ягоды возрастает в ряду *conv. orientalis* Negr. < *conv. pontica* Negr. < *conv. occidentalis* Negr.

Таким образом, опережающие развитие околоплодника (завязи) у сорта Агадаи (*conv. orientalis* Negr.) на ранних этапах эмбриогенеза, по сравнению с сортами Ркацители (*conv. pontica* Negr.) и Каберне - Совиньон (*conv. occidentalis* Negr.) приводит к увеличению доли околоплодника (мякоти) в структуре ягоды. У последних двух сортов отмечается обратная зависимость. Эти биологические особенности сортов определяют направление использования продукции – столовое или техническое, а также должны быть учтены при разработке сортовых технологий применения регуляторов роста растений.

FEATURES OF GROWTH AND DEVELOPMENT OF BERRIES OF GRAPES AT EARLY STAGES OF AN EMBRYOGENESIS

Kazakhmedov R.E.

grapes, semyapochka, okoloplodnik, pollination, fertilisation, intensity, intensity of growth, seed index

Various intensity of growth of elements ovary and ability to the autonomous growth of an *okoloplodnik* of grapes of different ekologo-geographical groups *Vitis vinifera* L. is shown, at pollination and fertilization stages that defines their efficiency and the direction of use of production

**ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕНЕЗА ДНК РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA*
ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА И СТАДИИ ВЕГЕТАЦИИ РАСТЕНИЯ**

Киселев К.В.¹, Дубровина А.С.¹, Тюнин А.П.¹, Огнева З.В.^{1,2}

¹ФГБУН Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН,
пр. Столетия Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, Россия, E-mail: kiselev@biosoil.ru

²ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», Школа естественных наук,
г. Владивосток, ул. Октябрьская 27, 690090, Россия

арабидопсис, соматические мутации, точечные нуклеотидные замены, инсерции, делеции, старение растений

Несмотря на то, что в литературе широко представлены данные о мутагенезе ДНК в клетках животных и человека, мутагенез ДНК в клетках растений малоизучен. Исследование разнообразия, скорости накопления и молекулярных механизмов возникновения мутаций в геноме растений представляет значительный интерес не только для понимания эволюционных процессов и процессов старения растений, но и для понимания фундаментальных механизмов, контролирующей правильность воспроизведения генетической информации. Кроме того, знание закономерностей и механизмов мутагенеза ДНК необходимы для получения растений с заданными свойствами.

Геномная нестабильность, включающая повреждения ДНК и накопление соматических мутаций, считается одним из основных стохастических механизмов старения, как у животных, так и у растений (Vijg, 2004; Thomas, 2002). Для животных теория соматических мутаций была поддержана экспериментальными доказательствами из различных источников, показавшими, что уровень соматических мутаций в животном митохондриальном и ядерном геноме увеличивается с возрастом. Для растений, тем не менее, в настоящее время наблюдается дефицит экспериментальных данных о частоте и спектре соматических мутаций, появляющихся в течение жизненного цикла растений (Brutovská et al., 2013). Например, до сих пор неясно, как соматический мутагенез может повлиять на деградацию растений со временем и в конечном итоге способствовать гибели растений. В настоящее время хорошо известно, что в культуре клеток и тканей растений *in vitro* возникают разнообразные мутации и хромосомные перестройки, которые принято называть “соматические вариации” (Bairu et al. 2011; Sato et al. 2011), которые могут накапливаться с течением времени (Kiselev et al. 2013). Недавно было показано, что соматические вариации возникают в процессе каллусогенеза, а не присутствуют изначально в экспланте растения, используемом для инициации каллуса (Sato et al. 2011). Предполагают, что точечные нуклеотидные замены вносят основной вклад и являются “движущей силой” соматических вариаций (Jiang et al. 2011). Важно отметить, что в литературе отсутствуют данные о закономерностях и скорости накопления мутаций в ДНК интактных растений в зависимости от этапа вегетации и возраста растения.

Цель настоящей работы – исследовать влияние возраста однолетнего растения *Arabidopsis thaliana* на частоту, скорость накопления и молекулярный спектр соматических мутаций. Мы исследовали уровень соматических мутаций в четырех случайно выбранных контрольных участках кодирующей и некодирующей ДНК, выделенной из 1-, 4-, 8-, и 12-недельных растений *A. thaliana*. Растения (*A. thaliana*, экотип Columbia), высаживали в горшки и культивировали в климатической камере, контролирующей условия произрастания растений (+22°C, фотопериод 16 ч день/8 ч ночь). Для сравнения частоты и типов соматических мутаций на разных стадиях жизненного цикла *A. thaliana* были отобраны по 2 растения *A. thaliana* после 1, 4, 8 и 12 недель культивирования. Выбранные участки ядерной ДНК включали участок гена актина *Actin2*, кодирующий участок *tRNA^{Pro}-tRNA^{Cys}* и межгенный спейсер *ITS-5.8rRNA-ITS2*; а хлоропластной ДНК – ген рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы

(*rbcL*). С помощью ПЦР выбранные участки ДНК *A. thaliana* были амплифицированы (подбор праймеров осуществляли на основе уже известных последовательностей, депонированных в GenBank). ПЦР-продукты были выделены из агарозного геля, затем клонированы и секвенированы. С помощью секвенирования проанализирована частота соматических мутаций (одиночные нуклеотидные замены, делеции, инсерции) на 1000 пар нуклеотидов в последовательностях выбранных участков ДНК. Суммарный уровень небольших мутаций (точечных нуклеотидных замен, инсерций, делеций) на 1000 нуклеотидов был подсчитан с помощью специальных формул и статистически обработан.

В анализируемых областях ДНК мы обнаружили точечные нуклеотидные замены, инсерции, делеции, которые не являются ошибками амплификации, так как в реакции амплификации была использована специальная смесь полимераз (Taq/Pfu), а частота возникновения мутаций была значительно выше, чем частота возникновения ошибок используемой смеси полимераз, которая составляет < 0,09 на 1000 нуклеотидов (Kiselev et al. 2009). Мы проанализировали частоту соматических мутаций в исследуемых участках ДНК. Скорость накопления мутаций в исследуемых участках ДНК значительно увеличивалась с возрастом *A. thaliana* (от 1,6 мутаций на 1000 нуклеотидов у однонедельного проростка до 2,7 мутаций на 1000 нуклеотидов у 12-недельного растения). Наибольшая частота соматических мутаций была детектирована для некодирующего межгенного участка *ITS-5,8 rRNA-ITS2*, в то время как наименьшая частота мутаций наблюдалась в последовательности хлоропластного гена *rbcL*. Частота мутаций генов *rbcl* и *tRNAPro-rRNACys* значительно не изменялась в течении трехмесячного жизненного цикла *A. thaliana*. Подавляющее большинство наблюдаемых нуклеотидных замен представлено транзициями (около 73%). При этом транзиции А:Т→Г:С встречались наиболее часто. Также мы обнаружили небольшое количество трансверсий во всех исследуемых участках ДНК. Количество трансверсий было намного выше в некодирующем участке *ITS-5,8 rRNA-ITS2* по сравнению с последовательностями участков *Actin2*, *tRNAPro-tRNACys* и *rbcL*. Трансверсии А→С были наиболее частым (около 30%) типом замен в *ITS-5,8 rRNA-ITS2*.

Таким образом, в настоящей работе установлено, что частота соматических мутаций значительно увеличивается при развитии и старении растений *A. thaliana* для четырех анализируемых участков ДНК. Полученные данные свидетельствуют о том, что, по крайней мере, некоторые области ДНК растений могут аккумулировать соматические мутации при росте, развитии и старении однолетнего растения. Поскольку у растений отсутствует защита их зародышевых клеток и гамет, которые, как известно, формируются у растений на последних стадиях жизненного цикла путем дифференциации соматических меристематических клеток, соматические клетки могут накапливать мутации и передавать их в будущие поколения растений, что потенциально может влиять на экологическую и эволюционную приспособленность растений.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (13-04-01902) и Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Литература

1. Vijg J. Impact of genome instability on transcription regulation of aging and senescence // *Mech Ageing Dev*, 2004, 125:747-753.
2. Thomas H. Ageing in plants // *Mech Ageing Dev*, 2002, 123:747-753.
3. Brutovská E., Sámelová A., Dušička J., Mičieta K. Ageing of trees: Application of general ageing theories // *Ageing Res Rev*, 2013, 12:855-66.
4. Bairu M.W., Aremu A.O., Staden J.V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods // *Plant Growth Regul*, 2011, 63:147-173.
5. Sato M., Hosokawa M., Doi M. Somaclonal variation is induced *de novo* via the tissue culture process: a study quantifying mutated cells in *Saintpaulia* // *Plos One*, 2011, 6:e23541.
6. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Shumakova O.A. DNA mutagenesis in 2- and 20-year-old *Panax ginseng* cell cultures // *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2013, 35:1525-1532.

7. Kiselev K.V., Turlenko A.V., Tchernoded G.K., Zhuravlev Y.N. Nucleotide substitutions in *rolC* and *nptII* gene sequences during long-term cultivation of *Panax ginseng* cell cultures // Plant Cell Rep, 2009, 28:1273-1278.

AGE-ASSOCIATED SOMATIC DNA MUTATION IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Tyunin A.P., Ogneva Z.V.

Arabidopsis thaliana, somatic mutations, single nucleotide substitutions, insertions, deletions, plant ageing

We studied the levels of somatic mutations in four randomly chosen *A. thaliana* DNA control regions (*Actin2*, *tRNA^{Pro}-tRNA^{Cys}*, *ITS1-5.8rRNA-ITS2* and *rbcL*). The mutation rate in the DNA regions considerably increased with *A. thaliana* age from 1.6 per 1,000 nt in 1-week-old *A. thaliana* seedlings to 2.7 per 1,000 nt in 12-week-old plants. The vast majority of nucleotide substitutions were transitions (~73%) with A:T→G:C transitions being the most frequent type of substitution.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ АДАПТАЦИОННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАСУХЕ СОРТОВ ЯБЛОНИ РАЗЛИЧНОЙ ПЛОИДНОСТИ

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

ГНУ Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства
и виноградарства ФАНО, ул.40 лет Победы, 39, г. Краснодар, 350901, Россия,
E-mail: kubansad@kubannet.ru

яблоня, плоидность, оводненность, пролин, листовая пластинка

Развитие эколого-адаптивного садоводства на юге России определило одно из приоритетных направлений в селекции яблони – создание сортов с высокой экологической пластичностью, устойчивых к лимитирующим факторам среды, в частности к летней засухе [1,2]. Одним из направлений селекции, способствующих достижению этой цели, является полиплоидия. По мнению видных отечественных и зарубежных генетиков современности полиплоидия обеспечивает дополнительные возможности для адаптации и выживания растительного организма в экстремальных условиях среды [3].

Цель настоящей работы – выявить физиолого-биохимические критерии адаптационной устойчивости к засухе сортов яблони различной плоидности в условиях юга России.

Исследования проводили в 2011-2013 г.г. на базе ЗАО ОПХ «Центральное», ГНУ СКЗ-НИИСиВ Россельхозакадемии, г. Краснодар. Объектами исследований служили растения яблони диплоидных сортов Рассвет, Фортуна (селекции СКЗНИИСиВ), Эрли Мак, Дейтон (Америка) и триплоидных сортов Союз, Родничок (селекции СКЗНИИСиВ). Для оценки устойчивости растений яблони в условиях летнего периода в листьях определяли оводненность, содержание свободной и связанной воды, пролина, сахарозы, пигментов [4]. Анатомо-морфологические исследования проводили с помощью микроскопа «Olympus» ВХ 41 согласно методике [5].

Активность фотосинтетического аппарата яблони – один из параметров, наиболее чувствительных к воздействию внешних факторов среды. В пигментном комплексе листового аппарата изучаемых сортов яблони существенные изменения претерпел хлорофилл. Содержание суммы хлорофиллов *a* и *b* у диплоидов составляла 2,11-4,73 мг/г сухого вещества; у триплоидов 4,20-4,94 мг/г сухого вещества. Содержание каротина, выполняющего защитную функцию хлорофилла, у диплоидов составляла 1,04-2,08 мг/г сухого вещества; у триплоидов 1,98-2,72 мг/г сухого вещества (табл. 1).

Пролин обладает свойствами осмопротектора при адаптации. Способность накапливать пролин является генетически обусловленным признаком. Содержание пролина у диплоидных сортов яблони составляло 8,4 - 98,3 мг/г сырого вещества, у триплоидных 82,2 -192,6 мг/г сырого вещества. При воздействии стрессовых условий среды растения накапливают сахара. Повышенное содержание сахарозы, удерживающей воду в клетках, характеризует механизм проявления устойчивости растений яблони к засухе. Содержание сахарозы у диплоидных сортов яблони составляло 2,29 - 6,43 мг/г сухого вещества, у триплоидных 4,39 - 6,75 мг/г сухого вещества.

Обобщая трехлетние данные, проведенные в контрастные по метеорологическим условиям годы, у триплоидных сортов яблони Союз и Родничок в отличие от изучаемых диплоидных сортов выявлено повышенное содержание связанной формы воды, сахарозы, пролина, устойчивее пигментная система, что позволяет поддерживать достаточно высокий уровень физиологических процессов в летний период.

Таблица 1 - Сравнительная характеристика физиолого-биохимических и анатомо-морфологических показателей сортов яблони различной ploidy в летний вегетационный период 2011-2013 г.г. (средние значения)

Table 1 - Comparative characteristic of the physiological biochemical and anatomo- morphological indices of the types of the apple tree of different ploidy in the summer vegetal period of 2011-2013 g.g. (average values)

Показатели	Диплоиды	Триплоиды
Физиолого-биохимические		
Оводненность, %	49,27 - 71,87	55,1 - 68,55
Содержание связанной воды, %	51,79 - 89,30	76,18 - 85,31
Сумма хлорофиллов <i>a+b</i> , мг/г сухого вещества	2,11 - 4,73	4,20 - 4,94
Содержание каротина, мг/г сухого вещества	1,04 - 2,08	1,98 - 2,72
Содержание пролина, мг/г сырого вещества,	8,4 - 98,3	82,2 - 192,6
Содержание сахарозы, мг/г сухого вещества	2,29 - 6,43	4,39 - 6,75
Анатомо-морфологические		
Общая толщина листовой пластинки, мк	154,6 - 184,4	217,6 - 217,0
Кутикула и верхний эпидермис, мк	10,2 - 11,7	11,1 - 11,9
Индекс палисадности	1,01 - 1,27	1,39 - 1,51
Количество устьиц, шт. на 1 мм ² листовой поверхности	200 - 288	281 - 321
Длина устьиц, мк	55 - 56	51 - 52
Ширина устьиц, мк	31 - 34	28 - 32

У триплоидных сортов яблони Союз и Родничок в отличие от изучаемых диплоидных сортов выявлены ксероморфные признаки листовой пластинки, связанные с засухоустойчивостью: увеличение толщины листовой пластинки, утолщение кутикулы и верхнего эпидермиса, увеличение толщины слоя клеток палисадной паренхимы, индекса палисадности, количества устьиц на единицу листовой поверхности, уменьшение линейных размеров устьиц.

Ксероморфные признаки листовой пластинки, повышенное содержание связанной форм воды, сахарозы, пролина могут служить научно-обоснованными критериями их засухоустойчивости. Полученные результаты убеждают, что увеличение ploidy растений, создание триплоидных сортов могут привести к получению растений, более устойчивых к действию экстремальных условий среды.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ р_юг_а № 13-04-96581.

Литература

1. Ненько, Н.И. Изучение перспективных сортов яблони различной ploidy в связи с адаптацией к засухе / Н.И. Ненько, Г.К. Киселева, Е.В. Ульяновская // *Materialy IX mezinarodni vedesko-prakticka konference «Predni vedeske novinky - 2013» (27srpna – 05 zari 2013 roku) – Dil 7. Lekarstvi. Biologicke vedy.Zverolekarstvi: Praga.Publishing House «Educatoin and Sciense» s.r.o.- 2013. S.40-45.*

2. Ненько, Н.И. Водный статус сортов яблони различной ploidy при засухе / Н.И. Ненько, Г.К. Киселева, А.В. Караваева, Е.В. Ульяновская // *Инновационные направления современной физиологии растений: тез.докл. Всероссийск. науч.конф.с межд.участием.- М., Россия 2-6 июня 2013 г.- С.308-309.*

3. Nenko Nataliya I. Stability to the drought of the types of the apple tree of different ploidy / Nataliya I. Nenko, Galina K. Kiseleva, Alla V.Karavaeva, Helen V.Ulyanovskaya / *Journal of International Scientific Publications: Ecology & Safety, Bulgaria (EU), 2013, Volume 7, Part 4, P. 4-12.*

4. Ненько, Н.И. Физиологические методы в адаптивной селекции плодовых культур / Н.И. Ненько, Т.Н. Дорошенко, Т.А. Гасанова // *Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве.-Краснодар, СКЗ-НИИСиВ, 2012.- С. 189-198.*

5. Киселева, Г.К. Анатомо-морфологическая оценка адаптивного потенциала сортов плодовых культур и винограда // Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. - Краснодар, СКЗНИИСиВ, 2012.- С.199-205.

**PHYSIOLOGO- BIOCHEMICAL CRITERIA OF ADAPTIVE STABILITY
TO THE DROUGHT VARIETIES OF THE APPLE TREE DIFFERENT PLOIDY**

Kiseleva G.K., Nenko N.I., Ulyanovskaya E.V., Karavaeva A.V.

apple tree, ploidy, water content, proline, leave blade

The physiologo-biochemical special features varieties of the apple tree of different ploidy in connection with the adaptation to the drought are studied. The scientifically substantiated criteria of the drought resistance are revealed: the increased content of that connected of the forms of water, saccharose, proline, xeromorphic signs of leave plate. Raising the level of ploidy favorably affects the drought resistance of apple tree, increasing its ecological plasticity.

НИТРИТ - РЕГУЛЯТОР РОСТА БОКОВЫХ КОРНЕЙ *ZEА MAYS L.*

Клименко (Сидоренко) Е.С., Харитонашвили Е.В.

ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,
Ленинские горы, д. 1, стр.12, г. Москва, 119992, Россия, E-mail: kleo80@yandex.ru*нитрит, рост бокового корня, накопление нитрита***Введение**

Традиционно считается, что нитрит не участвует в метаболизме растительной клетки, поскольку не накапливается в тканях, так как быстро восстанавливается до аммония ферментом НиР [1]. Известно также, что высокие концентрации нитрита для растений токсичны [2]. Сравнительно недавно методами молекулярной биологии было показано наличие генов в корнях *Arabidopsis thaliana*, экспрессия которых регулируется нитритом в нано- и микромолярной концентрации [3]. Наша работа посвящена исследованию регуляторного действия NO_2^- на уровне целого растения, а именно, как NO_2^- влияет на рост боковых корней (БК) кукурузы (*Zea mays L.*) в зависимости от концентрации и времени воздействия.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись растения кукурузы (*Zea mays L.*) с. «Катарина», которые выращивали в водной культуре на питательных растворах модифицированной смеси Прянишникова 0.5 нормы, с 0.75 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в качестве источника N (контроль), pH=6.0. В опыте растения экспонировали 4, 24 и 48 ч на питательном растворе с добавлением 0.01, 0.1 или 1.5 KNO_2 . Перед экспонированием маркировали участок главного корня (ГК) длиной 2.5 см, считая от самого апикального бугорка в базальном направлении. Контрольные растения маркировали аналогично. После 4 ч экспозиции корни промывали и проростки переносили на исходную среду; спустя 24 и 48 ч после воздействия определяли длину БК. При длительном экспонировании первый раз длину корней определяли через 24 ч, затем через 48 ч после воздействия нитрита. Параллельно проводили измерения БК для контрольных растений. Все измерения были сделаны в маркированных зонах. За счет этого достигалось нормирование измеряемых БК по стадии развития. Длину БК измеряли после фотографирования с последующей обработкой изображения в программе «AxioVision 4.7». Эндогенное содержание нитрита в тканях корня определяли колориметрически с реактивом Грисса [4]. Навеску сырого растительного материала 70 мг замораживали и хранили при -20°C в течение суток. Нитрит из замороженного материала экстрагировали дистиллированной водой (1.5 мл на 70 мг) в течение 1 ч при 95°C . С аликвотами полученного экстракта проводили реакцию с реактивом Грисса, после чего измеряли оптическую плотность растворов при 540 нм на планшетном спектрофотометре «Униплан» фирмы «Пикон».

Результаты и обсуждение

О действии малых, нетоксичных доз NO_2^- на корни растений судили по изменению длины БК.

При длительном экспонировании кукурузы на среды с нитритом через 24 ч после добавления 0.01, 0.1 мМ NO_2^- длина интенсивно растущих БК в маркированной апикальной зоне ГК была одинаковой и достоверно не отличалась от контроля. При 1.5 мМ NO_2^- в среде длина БК была меньше. Через 48 ч воздействия стал заметным стимулирующий эффект 0.01 мМ на рост БК, а длина БК растений других вариантов не отличалась от контроля (рис.1а).

В опытах с 4 ч экспозицией спустя 1 сут. после воздействия 0.01 мМ NO_2^- длина БК увеличивалась, а обработка 0.1 и 1.5 мМ KNO_2 не влияла на длину БК кукурузы по сравнению с контролем (рис.1б). Через 48 ч после экспонирования эта тенденция сохранялась (рис.1б).

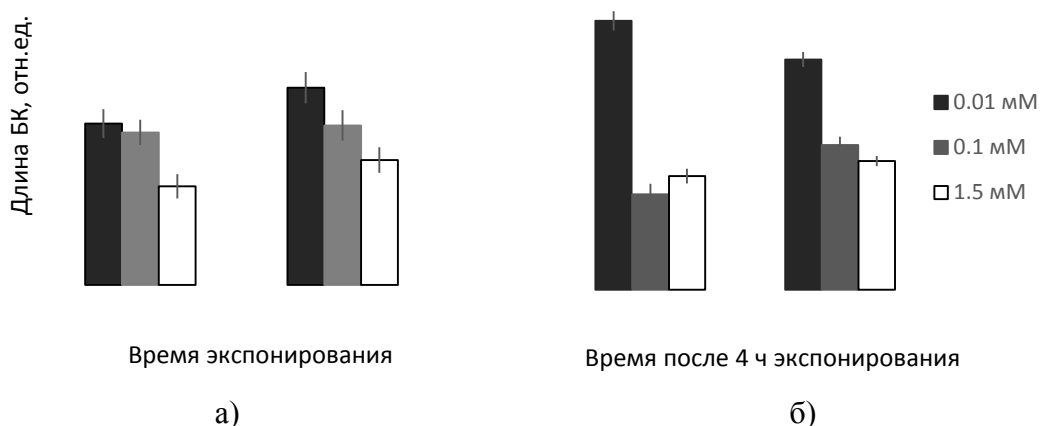


Рисунок 1 - Влияние KNO₂ на длину БК кукурузы при экспозиции а) длительной; б) кратковременной

Figure 1 - The effect of KNO₂ on LR length of maize seedlings after exposure a) prolonged; b) short-time

При доступности в среде нитрит накапливается в тканях корня (табл. 1). При 4 ч экспозиции растений на нитрит самая малая концентрация 0.01 мМ не приводит к изменению [NO₂⁻]_{in} в тканях ГК, при 0.1 мМ [NO₂⁻]_{in} возрастает примерно в 4 раза и при 1.5 мМ – на порядок. В БК изменение [NO₂⁻]_{in} наблюдали лишь при самой большой концентрации KNO₂ в среде. Мы полагаем, что ускорение роста БК зависит от изменения уровня эндогенного нитрита в тканях корня.

Таблица 1 - Эндогенное содержание NO₂⁻ в тканях ГК и БК 9-дн. проростков кукурузы после 4 ч экспонирования в зависимости от концентрации нитрита в среде

Table 1 - Nitrite accumulation in primary and lateral roots of 9 d old maize seedlings (4 h exposure, different KNO₂ concentration)

Вариант	Эндогенное содержание [NO ₂ ⁻], мкмоль/г F.W.	
	главный корень	боковой корень
Контроль	0,05±0,001	0,07±0,008
0.01 мМ KNO ₂	0,06±0,002	0,07±0,005
0.1 мМ KNO ₂	0,29±0,001	0,06±0,002
1.5 мМ KNO ₂	0,94±0,0025	0,14±0,005

Самое большое ускорение роста мы наблюдали при 4 ч экспозиции на 0.01 мМ нитрита, когда с помощью реактива Грисса не удается зарегистрировать изменение [NO₂⁻]_{in}. Возможно, для проявления стимулирующего действия NO₂⁻ на рост БК достаточно небольшого повышения эндогенной концентрации, что объясняет стимулирование 0.01 мМ при экспонировании. Если же [NO₂⁻]_{out} высока (1.5 мМ) или нитрит длительно присутствует в растворе (рис 1а), происходит значительный сдвиг эндогенного содержания, что тормозит рост БК. В случае невысоких концентраций за счет активации и/или синтеза ферментов, утилизирующих NO₂⁻, гомеостаз восстанавливается, начинает проявляться стимулирующее действие. Если концентрация во внешней среде слишком высока, ферментные системы не справляются, и рост корней угнетается (токсическое действие).

Закключение

Результаты нашего исследования показали, что NO₂⁻ в малой концентрации стимулировал рост БК. Наблюдаемая взаимосвязь между концентрацией в среде и ответной

ростовой реакцией БК может быть связана с изменением эндогенного уровня NO_2^- в тканях корня.

Литература

1. Алехина Н.Д. и др. Физиология растений: учебник для студентов вузов. Под ред. Ермакова И.П. М. Изд.центр«Академия». 2007. 640 с.
2. Phipps R.H. and Cornforth I.S. Factors effecting the toxicity of nitrite nitrogen to tomatoes // Plant and Soil. 1970. V.33. p.457-466.
3. Wang R., Xing X. and Crawford N. Nitrite Acts as a Transcriptome Signal at Micromolar Concentrations in Arabidopsis Roots // Plant Physiology. 2007. V. 145. p.1735–1745.
4. Granger D.L., Taintor R.R., Boockvar K.S., Hibbs J.B. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction // Methods Enzymol. 1996. V.268. p.142–151.

NITRITE REGULATES GROWTH OF LATERAL ROOTS IN MAIZE

Klimenko E.S., Kharitonashvili E.V.

nitrite, lateral root growth, nitrite accumulation

In this study we showed that low concentration of nitrite stimulated LR growth of maize seedlings. Plants were exposed with 0.01, 0.1 or 1.5 mM KNO_2 for 4, 24 or 48 hours. After short-time exposure to 0.01 mM NO_2^- LR was significant longer than in control. 48 h exposure to 0.01 mM NO_2^- had similar effect on LR growth. The level of nitrite accumulation in roots correlated with NO_2^- concentration in nutrient solution.

ФИТОГОРМОНЫ, ЭТИЛЕН И АБК, И ПОЛЯРНЫЙ РОСТ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПЕТУНИИ

Ковалева Л.В.¹, Захарова Е.В., Тимофеева Г.В.¹, Ракитин В.Ю.²

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Ботаническая ул. 35, г. Москва, 127276, Россия, E-mail: kovaleva_1@mail.ru

²ФГБОУ ВПО «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева», Тимирязевская ул., 49, г. Москва, 127550, Россия, E-mail: zakharova_ekater@mail.ru

мужской гаметофит, полярный рост, сигнальные системы, фитогормоны

В 1993 году O'Neill et al. высказали гипотезу, что этилен и его предшественник АЦК включаются в передачу сигнала опыления от рыльца к другим органам цветка. Исследования, проведенные на орхидее, гвоздике, табаке и петунии, подтвердили тот факт, что индуцированное опылением образование этилена тканями пестика является фактором, необходимым для роста пыльцевых трубок и успешного оплодотворения. Этилен включается в регуляцию гаметофитно-спорофитных взаимодействий в ходе развития, прорастания и роста мужского гаметофита, взаимодействуя с другими фитогормонами, такими как ИУК, АБК, ГК и цитокинины (Kovaleva, Zakharova, 2003; Ковалева и др., 2013). Вместе с тем в настоящее время имеются некоторые основания считать, что этилен в пыльнике и пестике запускает механизмы программируемой клеточной смерти (ПКС) (Rogers, 2006). Мы полагаем, что такое действие этилена может быть одной из причин ингибирования роста пыльцевых трубок при функционировании механизма гаметофитной самонесовместимости, одного из наиболее распространенных барьеров самооплодотворения, молекулярный механизм которого до сих пор не установлен. В данной работе мы исследовали эффекты экзогенных этилена и АБК, а также ингибиторов их синтеза на рост пыльцевых трубок в системе пыльца-пестик петунии с целью проверки гипотезы о том, что взаимодействие этилена с АБК запускает в рассматриваемой системе ПКС при функционировании механизма гаметофитной самонесовместимости.

Материал и методы

Перед опылением кастрированные накануне цветки петунии (*Petunia hybrida* L.) самосовместимого и самонесовместимого клонов обрабатывали продуцентом этилена этефоном (1:1000), ингибитором синтеза этилена аминоксиуксусной кислотой (АОА) (5-10 мМ), АБК(10мМ), ингибитором синтеза АБК флуридоном (1-6 мМ), а также флуридоном (5 мМ) + АОА (10 мМ). Анализировали скорость увядания венчика, завязываемость семян и определяли в системе пыльца-пестик признаки ПКС (деградация ДНК по методу Bernatsky & Tanksley, 1986), длину пыльцевых трубок и содержание АЦК (по методу Lizada и Yang, 1979).

Результаты и обсуждение

Показано, что пыльцевые зерна петунии быстро прорастают на рыльце и пыльцевые трубки растут в течение 6 ч по проводниковым тканям столбика с одинаковой скоростью после совместимого и несовместимого опылений. Затем пыльцевые трубки либо продолжают расти в течение 24-30 ч до завязи, где происходит оплодотворение (после совместимого опыления), либо вследствие реакции самонесовместимости прекращают свой рост через 8-10 ч на расстоянии $8 \pm 0,6$ мм от поверхности рыльца (после самонесовместимого опыления).

Судя по деградации ДНК, признаки ПКС были выявлены в тканях столбика самонесовместимого клона через 8 ч после самоопыления, т.е. во время прохождения реакции самонесовместимости, что свидетельствует в пользу предположения об участии ПКС в механизме гаметофитной самонесовместимости.

Прорастание и рост пыльцевых трубок в тканях пестика сопровождалось синтезом этилена, причем интенсивность этого процесса после самонесовместимого опыления была в 4–5

раз выше, чем после самосовместимого опыления. Кроме этого, показано, что этилен в высокой концентрации (10 мкл/л) на 50 % замедлял скорость роста пыльцевых трубок петунии на среде культивирования. Обработка рылец петунии самонесовместимого клона ингибитором синтеза этилена АОА приводила к различным ответным реакциям в зависимости от времени действия этого агента на ткани пестика: ингибированию или стимуляции роста пыльцевых трубок. Сделан вывод, что торможение роста трубок обусловлено ингибированием синтеза этилена, необходимого для их прорастания, в то время как стимуляция их роста обусловлена ингибированием синтеза этилена, участвующего в механизме самонесовместимости. Одним из свидетельств в пользу такого вывода является отсутствие в столбиках признаков деградации ДНК после их обработки АОА.

Потенциальная возможность участия АБК, наряду с этиленом, в механизме гаметофитной самонесовместимости была установлена в опытах с флуридоном, который в зависимости от времени действия и концентрации, ингибировал или стимулировал рост пыльцевых трубок. Во втором случае не наблюдали признаков деградации ДНК.

В системах *in vitro* прорастающий мужской гаметофит и *in vivo* пыльца-пестик получены данные в пользу гипотезы о взаимодействии этилена с АБК на уровне синтеза АЦК. Так, в опытах *in vitro* АБК снимала полностью или частично эффекты блокатора рецепторов этилена 1-МСП и ингибитора синтеза этилена АОА на прорастание и рост пыльцевых зерен. В системе пыльца-пестик обработка флуридоном рылец (перед опылением) приводила к полному ингибированию прорастания пыльцевых трубок и падению содержания АЦК, в то время как в варианте комбинированной обработки (флуридон + АОА) наблюдали прорастание и рост пыльцевых трубок и повышение уровня АЦК. Полученные результаты свидетельствуют о сложных взаимодействиях между этиленом и АБК в процессе регуляции прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок и требуют дальнейших исследований.

Выводы

1. Впервые на системе пыльца-пестик показано, что этилен контролирует регуляцию прорастания и роста мужского гаметофита в прогамной фазе оплодотворения, взаимодействуя с АБК на уровне синтеза АЦК.

2. Получены доказательства участия этилена и АБК в механизме гаметофитной самонесовместимости, одного из основных барьеров самооплодотворения.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00592

Литература

1. O'Neill S.D., Nadeau J.A., Zhang X.S. et al. Interorgan Regulation of Ethylene Biosynthetic Genes by Pollination // *Plant Cell*. 1993. V.5. P. 419-432.

2. de Nettancourt D. Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants. Berlin, Springer. 2001. P.322.

3. Kovaleva L.V., Zakharova E.V. Hormonal Status of the Pollen-Pistil System at the Progametic Phase of Fertilization after Compatible and Incompatible Pollination in *Petunia hybrida* // *Sex Plant Reproduction*. 2003. V. 16. P.191-196.

4. Ковалева Л.В., Тимофеева Г.В., Родионова Г.Б., Захарова Е.В., Ракитин В.Ю. Роль Этилена в Регуляции Гаметофитно-Спорофитных Взаимодействий в Прогамной Фазе Оплодотворения у Петунии (*Petunia hybrida* L.) // *Онтогенез*. 2013.Т.44. С.91-100.

5. Woltering E.J., de Jong A.J., Yakimova E.T. Apoptotic Cell Death in Plants: the Role of Ethylene // *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*. Dordrecht: Kluwer. 1999. P.209-216.

6. Rogers H.J. Programmed Cell Death in Floral Organs: How and Why do Flowers Die? // *Ann Bot*. 2006. 97. P.309-315.

7. Bernatsky R. and S.D. Tanksley. Toward a Saturated Linkage Map in Tomato Based on Isozymes and Random cDNA Sequences // *Genetics*. 1986. 112. P.887-898.

8. Ракитин В.Ю., Ракитин Л.Ю. Определение Газообмена и Содержания Этилена, Двухокси Углерода и Кислорода в Тканях Растений // Физиология растений. 1986. Т.33. С.403-413.

9. Lizada M.C., Yang S.F. A Simple and Sensitive Assay for 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid // Anal.Biochem. 1979. V.100. P.140-145.

PHYTOHORMONES, ETHYLENE AND ABA, AND PETUNIA MALE GAMETOPHYTE POLAR GROWTH IN THE PROGAMIC PHASE OF FERTILIZATION

Kovaleva L.V., Zakharova E.V., Timofeeva G.V., Rakitin V.U.

male gametophyte, polar growth, signal systems, phytohormones

Strong evidence for participation of ethylene and ABA in the mechanism of gametophyte self-incompatibility, one of basic barriers of self-fertilization, was obtained. It was established that ethylene interacts with ABA at the level of ACC, a known ethylene precursor, in the course of pollen germination and pollen tube growth. The results obtained suggest that intensive ethylene production induces programmed cell death in the incompatible pollen tubes.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ФОРМИРОВАНИЯ АДВЕНТИВНЫХ КОРНЕЙ.
ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТОРОВ**

Ларская И.А.

ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН,
ул. Лобачевского 2/31, а/я 30, г. Казань, 420111, Россия, E-mail: pzl@mail.ru*олигосахарины, ризогенез, ИУК, Ca²⁺, экспланты***Введение**

Адвентивные корни - постэмбриональные корни, которые, в отличие от боковых корней, имеют свое происхождение из клеток листьев, стеблей или из клеток старых корней, не относящихся к периклилу. Формирование адвентивных корней представляет коммерческое значение, поскольку вегетативное размножение кусочками тканей является эффективным методом для размножения, особенно для трудно укореняющихся видов. Кроме того, процесс образования адвентивных корней, продуцируемых на тканях растений, культивируемых *in vitro*, представляет собой подходящую систему для изучения процесса корнеобразования при контролируемых условиях. На данный момент основное ограничение в исследованиях динамики формирования адвентивных корней остается недостаток сведений об индукторах данного процесса. Приоритетная роль в этом процессе отводится ауксину [1]. Также была показана близкая связь между механизмом действия ауксина и кальциевой сигнализацией [2]. Кроме того, начиная с 80-х годов появились данные о новых регуляторных молекулах - олигосахаридах, участвующих в различных морфогенных реакциях растений, включая корнеобразование [3]. Однако в большинстве работ исследовались эффекты олигосахаридов, полученных путем химического синтеза или при гидролизе выделенных клеточных стенок [4]. Нами были получены эндогенные олигосахариды, обладающие ризогенной активностью [5], что подтверждает существование этих регуляторных молекул *in vivo*. Однако работы по исследованию взаимосвязи этой относительно новой сигнальной системы с другими в процессе ризогенеза крайне малочисленны [6]. Поэтому целью данной работы являлось исследование роли Ca²⁺ и полученной фракции олигосахарида в процессе формирования адвентивных корней на тонкослойных эксплантах гречихи.

Материалы и методы

Фракция активного олигосахарида была выделена из проростков гороха (*Pisum sativum* L.), выращенных на водопроводной воде при температуре 25⁰С на свету (12-часовой фотопериод, 20 Вт/м²). Проростки фиксировали 30 мин. при 100⁰С, досушивали при 60⁰С до постоянного веса и растирали до порошкообразного состояния. Растительный материал отмывали органическими растворителями (хлороформ:этанол в соотношении 1:2 и 70% этанол) после чего эндогенные олигосахариды экстрагировали 50 мМ КН₂РО₄ (рН 7.0). Дальнейшая очистка олигосахаридов представляла последовательные этапы хроматографирования с использованием различных типов хроматографии. Более детальное описание метода представлено в ранее опубликованных работах [5].

Для получения сегментов гипокотилей гречихи, семена стерилизовали 10 мин. в 2% растворе гипохлорита натрия, а затем проращивали в течение четырех дней на агаризованной среде MS/2 [7]. Из средней части гипокотила вырезали сегменты длиной 0,7 см, которые разрезали вдоль на две части и помещали срезом вниз в чашки Петри со средой В5. Культивирование эксплантов проводили в темноте при 25⁰С. Все работы по проращиванию гипокотилей, приготовлению и культивированию эксплантов выполнялись стерильно. Подсчет корней производили на 5 сут. культивирования.

Эффекторы и ингибиторы вносились стерильно в концентрациях, указанных в подписи под рисунком.

Результаты и обсуждение

Как видно из рисунка, олигосахарин, внесенный в среду культивирования вместе с ИУК, увеличивал количество корней на эксплантах по сравнению с вариантом, когда экспланты культивировались с одним гормоном. Ингибитор потенциал-зависимых кальциевых каналов – дилтиазем снижал ИУК-индуцируемое количество корней. При одновременном внесении в среду культивирования трех эффекторов ингибитор Ca^{2+} каналов снижал количество корней. Однако при такой постановке не совсем понятно, что подавляет дилтиазем – действие ИУК или олигосахарина, поскольку все эффекторы вносились одновременно при нарезании эксплантов и присутствовали в среде весь период культивирования. Поэтому далее были использованы различные комбинации этих эффекторов. Как видно из рисунка кратковременная (1 ч) предобработка олигосахарином перед переносом эксплантов в среду с ИУК вызывала повышение количества корней. Количество корней было выше, чем в варианте, когда оба эффектора присутствовали в среде культивирования с самого начала. Дилтиазем, внесенный вместе с олигосахарином не оказывал ингибирующего эффекта. Однако ингибирующее действие блокатора кальциевых каналов наблюдалось, когда дилтиазем добавлялся вместе с ИУК после того, как экспланты были прединкубированы в течение ч в среде с олигосахарином.

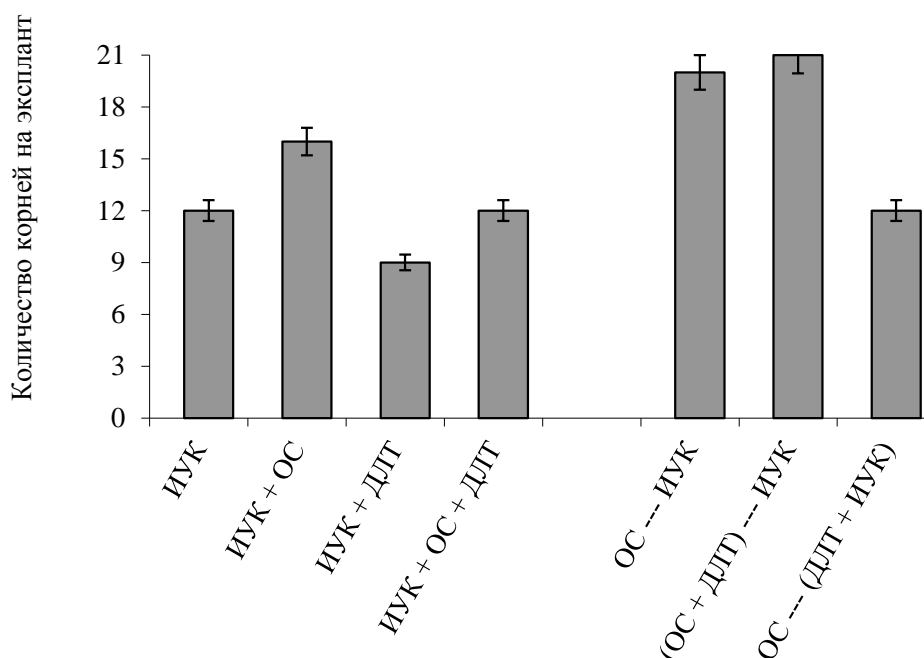


Рисунок 1 - Действие олигосахарина (ОС) и дилтиазема (ДЛТ) на ИУК-индуцируемое корнеобразование. ИУК- 3 мкМ; дилтиазем – 25 мкМ; олигосахарина - 5 мкг/мл.

«+» - одновременное внесение эффекторов в среду культивирования;

«---»- перенос из среды с одними добавками в среду с другими добавками

Figure 1 - Effect the oligosaccharin (OS) and diltiazem (DLT) on the IAA-induced rooting. IAA-3 mkM; diltiazem - 25 mkM; oligosaccharin - 5 mkg/ml.

"+" - the simultaneous introduction the effectors into the medium of culture;

"---" - transfer from the medium with one additives to the medium with other additives

Таким образом, можно предположить, что потенциал-зависимые каналы плазмалеммы участвуют в ИУК-индуцируемом процессе образования адвентивных корней на эксплантах из гипокотилей гречихи. А эффект олигосахарина опосредован не через открытие этих кана-

лов, а через какие-то другие пути. Однако эти предположения требуют дополнительных исследований. Пока что полученные данные свидетельствуют о том, что извлеченный нами эндогенный олигосахарин вовлечен в сигнальный путь регуляции ризогенеза, запускаемый и регулируемый ауксином и то, что он действует на ранних стадиях корнеобразования до ИУК, что представляет значительный интерес, поскольку именно этот период до сих пор является белым пятном в исследовании динамики формирования адвентивных корней.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (14-04-01591).

Литература

1. Fukaki H., Tasaka M. Hormone interactions during lateral root formation // *Plant Mol. Biol.* 2009. V.69. P. 437–449.
2. Yang T., Poovaiah B.W. Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action // *Biol Chem.* 2000. V.275. P.37–43.
3. Liskova O., Auxtova D., Kakoniova M. et al. Biological activity of galactoglucomannan-derived oligosaccharides // *Planta.* 1995. V.196. P.425-429.
4. Bellincampi D., Cardarelli M., Zaghi D. et al. Oligogalacturonides prevent rhizogenesis in rolB-transformed tobacco explants by inhibiting auxin-induced expression of the *rolB* gene // *The Plant Cell.* 1996. V.8. P.477-487.
5. Заботина О.А., Гурьянов О.П., Аюпова Д.А., Лозовая В.В. и др. Выделение и анализ растворимых олигосахаридов из побегов гороха, стимулирующих процесс корнеобразования // *Биохимия.* 1997. Т.62. С.988-992.
6. Moscatiello R., Mariani P., Sanders D., Maathuis F. Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signaling pathways induced by oligogalacturonides // *Journal of Experimental Botany.* 2006. V.57. P.2847–2865.
7. Murashige T., Scoog F. A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plantarum.* 1962. V.15. P.473-497.

THE INVESTIGATION OF THE ADVENTITIOUS ROOTS FORMATION. THE INFLUENCE OF THE EFFECTORS

Larskaya I.A.

oligosaccharins, rhizogenesis, IAA, Ca²⁺, explants

The IAA-induced adventitious root formation on the hypocotyls explants of buckwheat regulated through voltage-dependent channels of plasma membrane. The effect of oligosaccharin mediated not through the opening of these channels but through any other way. The data confirm that oligosaccharin acts in the early stages of rooting prior the IAA.

ПОСТУПЛЕНИЕ КАДМИЯ В ХЛОРОПЛАСТЫ РАСТЕНИЙ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И АКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТАЛысенко Е.А.¹, Клаус А.А.¹, Пшибытко Н.Л.², Кузнецов В.В.¹¹ ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, г. Москва, 127276, Россия, E-mail: genlysenko@mail.ru² Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Республики Беларусь, ул. Академическая 27, г. Минск, 220072, Беларусь*растения, хлоропласты, кадмий, фотосинтетический аппарат, мРНК, белки***Введение**

Кадмий – один из наиболее токсичных тяжёлых металлов. При попадании в организм он нарушает многие процессы. Фотосинтез – один из важнейших процессов, которые растения должны защитить от воздействия кадмия. «Каждый орган растений, вследствие селективности мембран и механизмов иммобилизации тяжелых металлов, является барьером на пути Cd из почвы в хлоропласты» [1]. В ходе эволюции растения выработали различные механизмы защиты хлоропластов от попадания в них тяжелых металлов, в том числе кадмия. Рассмотрим, в каких количествах Cd попадает в хлоропласты и к каким последствиям это может приводить.

Накопление Cd в хлоропластах.

Для корректной оценки накопления Cd в хлоропластах необходима их очистка в градиенте плавучей плотности (Перкола, сахарозы или др.). Число таких работ невелико. Так в хлоропластах водорослей *Chlamidomonas reinhardtii* [2] and *Euglena gracilis* [3] было обнаружено более половины Cd, накопленного их клетками. Однако водоросли сильно отличаются по ультраструктурной организации клеток. Например, клетки *Euglena* не имеют клеточных стенок и вакуолей и используют свой огромный хлоропласт как своего рода вакуоль [3]. Напротив, красная водоросль *Audouinella saviana* обладает этими клеточными структурами, поэтому в ее хлоропластах кадмий не обнаруживается [4].

У растений накопление Cd в хлоропластах изучено для двух видов: двудольного - *Brassica napus* [5] и однодольного *Phragmites australis* [6]. Условия постановки эксперимента в этих работах отличаются очень сильно, поэтому трудно понять, с чем связаны отличия, однако отличия огромны. В хлоропластах рапса накапливается 4.5 нг Cd на 1 мг хлорофилла, что составляет около 0.02% от накопления кадмия в листе [5]. В хлоропластах тростника накапливается 93 и 336 нг Cd на 1 мг хлорофилла (при 50 и 100 мкМ Cd в среде), что составляет около 10% и 15% от накопления кадмия в листе [6].

Влияние Cd на уровень мРНК и белков в хлоропластах.

В хлоропластах ячменя уровень 5 мРНК - *atpB*, *rbcL*, *rpl16*, *atpF* и *ucf3* не изменялся, а уровень 3 других мРНК - *ndhA*, *rpl2*, *rps12* у контрольных растений был ниже, чем при обработке Cd, Cu или Ni [7].

Содержание фотосинтетических белков при поступлении Cd как правило не меняется. Это было показано для относительно небольшого набора белков - D1, D2, ЛНСII (1,2,3), большой и малой субъединиц РБФК и PsbO. Отсутствие изменений было продемонстрировано как для двудольных: горох и фасоль [8], рапс [5], томат [9], - так и для однодольных: риса [10, 11] и ржи [12]. У растений ржи, выращенных при 50 мкМ Cd изменялась подвижность белков семейства ЛНСII, тогда как медь в равной концентрации не вызывала подобного эффекта [12]. И только в работе, выполненной на тростнике, Cd уменьшал в листьях содержания большой субъединицы РБФК [6]. Снижение уровня этого белка было достоверным, но небольшим, тогда как активность РБФК падала в несколько раз.

Влияние Cd на функциональную активность электрон-транспортной цепи хлоропластов.

Хотя Cd почти не влияет на содержание фотосинтетических белков, его влияние на функциональное состояние электрон-транспортной цепи хлоропластов описано хорошо. Уменьшается максимальный (Fv/Fm) и эффективный (Φ PSII) квантовый выход фотосистемы 2, фотохимическое тушение энергии (qP). Нефтохимическое тушение (qN, NPQ), напротив, возрастает. Это показано для однодольных [13, 14], двудольных [15, 16], и даже для вида-гипераккумулятора Cd [17]. В то же время в целом ряде работ влияние Cd на эти показатели не было обнаружено, причем в списке также есть растения однодольные [18-20], двудольные [5, 21] и виды-гипераккумуляторы [22, 23].

Выводы

Данные о накоплении Cd в хлоропласты крайне противоречивы и недостаточны для определенных выводов. Влияние Cd на содержание мРНК и белков в хлоропластах относительно не велико. В основном его эффект проявляется через ингибирование функциональной активности фотосинтетических комплексов.

Литература

1. Siedlecka A., Krupa Z. Cd/Fe interaction in higher plants – its consequences for photosynthetic apparatus// *Photosynthetica*, 1999, V.36, №3, P.321-331.
2. Nagel K., Adelmeier U., Voigt J. Subcellular Distribution of Cadmium in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*// *J. Plant Physiol.*, 1996, V.149, №1-2, P.86-90.
3. Mendoza-Cozatl D., Devars S., Loza-Tavera H., Rafael Moreno-Sanchez R. Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*// *Physiol. Plant.*, 2002, V.115, №2, P.276-283.
4. Talarico L. Fine structure and X-ray microanalysis of a red macrophyte cultured under cadmium stress// *Environ. Pollut.*, 2002, V.120, №3, P.813-821.
5. Baryla A., Carrier P., Franck F., Coulomb C., Sahut C., Havaux M. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth// *Planta*, 2001, V.212, №5-6, P.696-709.
6. Pietrini F., Iannelli M.A., Pasqualini S., Massacci A. Interaction of Cadmium with Glutathione and Photosynthesis in Developing Leaves and Chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel// *Plant Physiol.*, 2003, V.133, №2, P.829-837.
7. Zaripova N.R., Kholodova V.P., Zubo Ya.O., Kusnetsov V.V., and Kuznetsov V.I. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Chloroplast Gene Expression by Heavy Metals in Barley Seedlings// *Russ. J. Plant. Phys.*, 2011, V.58, №6, P.1040-1047.
8. Franco E., Alessandrelli S., Masojidek J., Margonelli A., Giardi M.T. Modulation of D1 protein turnover under cadmium and heat stresses monitored by [³⁵S]methionine incorporation// *Plant Science*, 1999, V.144, №2, P.53–61.
9. Liu K.-L., Shen L., Wang J.-Q., Sheng J.-P. Rapid Inactivation of Chloroplastic Ascorbate Peroxidase is Responsible for Oxidative Modification to Rubisco in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) under Cadmium Stress// *J. Integr. Plant Biol.*, 2008, V.50, №4, P.415–426.
10. Pagliano C., Raviolo M., Dalla Vecchia F., Gabbrielli R., Gonnelli C., Rascio N., Barbato R., La Rocca N. Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.)// *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 2006, V.84, №1, P.70–78.
11. Rascio N., Dalla Vecchia F., La Rocca N., Barbato R., Pagliano C., Raviolo M., Gonnelli C., Gabbrielli R. Metal accumulation and damage in rice (cv. Vialone nano) seedlings exposed to cadmium// *Environ. Exp. Botany*, 2008, V.62, №3, P.267–278
12. Janik E., Maksymiec W., Mazur R., Garstka M., Gruszecki W.I. Structural and Functional Modifications of the Major Light-Harvesting Complex II in Cadmium- or Copper-Treated Secale cereale// *Plant Cell Physiol*, 2010, V.51, №8, P.1330-1340.

13. He J.-Y., Ren Y.-F., Zhu C., Yan Y.-P., Jiang D.-A. Effect of Cd on growth, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll fluorescence of wild and Cd-sensitive mutant rice// *Photosynthetica*, 2008, V.46, №3, P.466-470.
14. Cai Y., Cao F., Cheng W., Zhang G., Wu F. Modulation of Exogenous Glutathione in Phytochelatins and Photosynthetic Performance Against Cd Stress in the Two Rice Genotypes Differing in Cd Tolerance// *Biol. Trace Elem. Res.*, 2011. V.143, №3, P.1159–1173
15. Pietrini F., Zacchini M., Iori V., Pietrosanti L., Ferretti M., Massacci A. Spatial distribution of cadmium in leaves and its impact on photosynthesis: examples of different strategies in willow and poplar clones// *Plant Biol.* 2010. №2, V.12. P. 355–363.
16. Filek M., Koscielniak J., Łabanowska M., Bednarska E., Bidzinska E. Selenium-induced protection of photosynthesis activity in rape (*Brassica napus*) seedlings subjected to cadmium stress. Fluorescence and EPR measurements// *Photosynth. Res.*, 2010, V.105, №1, P.27–37.
17. Küpper H., Parameswaran A., Leitenmaier B., Trtílek M., Setlík I. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*// *New Phytol.*, 2007, V.175, №4, P.655–674.
18. Drazkiewicz M., Tukendorf A., Baszynski T. Age-dependent response of maize leaf segments to cadmium treatment: Effect on chlorophyll fluorescence and phytochelatin accumulation// *J. Plant. Physiol.*, 2003, V.160, №3, P.247-254.
19. Wu F.B., Zhang G.P., Yu J.S. Genotypic Differences in Effect of Cd on Photosynthesis and Chlorophyll Fluorescence of Barley (*Hordeum vulgare* L)// *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2003, V.71, №6, P.1272–1281.
20. Ekmekci Y., Tanyolac D., Ayhan B. Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars// *J. Plant Physiol.*, 2008, V.165, №6, P.600-611.
21. Burzynski M., Zurek A. Effects of copper and cadmium on photosynthesis in cucumber cotyledons// *Photosynthetica*, 2007, V.45 №2, P.239-244.
22. Zhou W., Qiu B. Effects of cadmium hyperaccumulation on physiological characteristics of *Sedum alfredii* Hance (*Crassulaceae*)// *Plant Sci.*, 2005, V.169, №4, P.737–745.
23. Tang L., Ying R.-R., Jiang D., Zeng X.-W., Morel J.-L., Tang Y.-T., Qiu R.-L. Impaired leaf CO₂ diffusion mediates Cd-induced inhibition of photosynthesis in the Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*// *Plant Physiol. Biochem.*, 2013, V.73. P.70-76.

CADMIUM UPTAKE IN PLANT CHLOROPLASTS AND ITS IMPACT ON GENE EXPRESSION AND ACTIVITY OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS

Lysenko E.A., Klaus A.A., Pshybytko N.L., Kusnetsov V.V.

plants, chloroplasts, cadmium, photosynthetic apparatus, mRNA, proteins

Photosynthesis is one of the most important targets have to be protected from cadmium action. We analyzed up-to-date information concerning cadmium accumulation in chloroplasts of plants and its impact on gene expression in chloroplasts and photosynthetic activity.

МЕМБРАННЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В СУБПРОТОПЛАСТАХ ИЗ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК *NICOTIANA TABACUM* L.

Максимов Н.М., Брейгина М.А., Ермаков И.П.

ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
Ленинские горы, д. 1, стр. 12, г. Москва, Россия, 119991, E-mail: nmmaksimow@gmail.com

Nicotiana tabacum, пыльцевая трубка, пероксид водорода, Ca^{2+} -сигналинг, мембранный потенциал, ионные каналы

Введение

Пероксид водорода традиционно рассматривался в качестве токсичного побочного продукта энергетического метаболизма. Однако, в последнее десятилетие накоплен значительный объем данных, свидетельствующих об участии H_2O_2 в сигнальных процессах [1]. Возможность транспорта через мембраны, низкая концентрация перекиси в цитозоле и высокая стабильность H_2O_2 , в сравнении с другими АФК, – служат предпосылками, определяющими ключевую роль H_2O_2 в физиологических процессах в качестве вторичного мессенджера. Показана связь H_2O_2 с такими компонентами регуляторных систем растительной клетки, как: MAP-киназный каскад, $[Ca^{2+}]_{cyt}$, NO, микроРНК; кроме того, выявлен ряд транскрипционных факторов, активность которых модулируется перекисью [2]. Установлено, что H_2O_2 может не только участвовать в сигналинге внутри клетки, но также выступать в роли межклеточного сигнала. Например, на *Arabidopsis* было показано, что перекись функционирует в качестве дальнего сигнала при поранении, индуцируя активность НАДФН-оксидазы клеток, расположенных в непосредственной близости [3].

Участие перекиси в репродуктивных процессах у растений изучено недостаточно. Показано, что АФК выступают в качестве регуляторов механических свойств интины пыльцевого зерна при прорастании [4], а также продемонстрирована необходимость образования эндогенной перекиси для роста пыльцевой трубки [5]. Обнаружено активное накопление перекиси в тканях рыльца, которое маркирует готовность пестика к опылению [6]. Эти данные в совокупности позволяют предположить, что пероксид водорода, локализованный в рыльце, может контролировать прорастание пыльцы *in vivo*, выступая в качестве межклеточного сигнала. Мы сделали первый шаг к проверке этой гипотезы, выяснив, может ли перекись в физиологических концентрациях участвовать в передаче экзогенного сигнала в мужском гаметофите.

Материалы и методы

Изучение влияния перекиси водорода на функционирование ион-транспортных систем плазмалеммы проводили на субпротопластах, выделенных из пыльцевых трубок *Nicotiana tabacum* L. Отсутствие клеточной стенки позволяет напрямую воздействовать на плазмалемму, что не возможно в интактной трубке, где это взаимодействие опосредовано клеточной стенкой. Для выделения жизнеспособных субпротопластов, лишённых ядер и клеточной стенки, использовали модифицированную методику Yu [7].

С помощью количественной флуоресцентной микроскопии исследовали действие экзогенной перекиси на цитозольную концентрацию Ca^{2+} и мембранный потенциал плазмалеммы. Для оценки изменений цитозольной концентрации Ca^{2+} использовали флуоресцентный краситель Fluo-3 [8]. Мембранный потенциал субпротопластов изучали при помощи двух красителей с различным механизмом действия [9]. Для изучения динамики потенциала использовали быстрый липофильный краситель Di-4-ANEPPS, который, встраиваясь в мембрану, мгновенно реагирует на изменение величины мембранного потенциала. Для определения абсолютных значений мембранного потенциала использовали медленный краситель DiBAC₄(3), проницающая способность, и, соответственно, интенсивность флуоресценции которого зависит от мембранного потенциала и может быть отнесена к таковой для фиксированных клеток с

нулевым потенциалом. Определения рН цитозоля проводили с помощью рациометрического красителя BCECF, имеющего в своем спектре возбуждения рН-чувствительный и рН-нечувствительный участки длин волн [10]. Общепринятый тест на жизнеспособность клеток проводили с использованием красителя FDA [11].

Результаты и обсуждение

В соматических клетках растений одним из наиболее ранних сигнальных событий, связанных с перцепцией перекиси, является активация кальциевых каналов [12]. При изучении динамики цитозольной концентрации кальция в субпротопластах из пыльцевых трубок также было выявлено быстрое увеличение $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ в ответ на добавления перекиси (10 мкМ). Ингибитор Ca^{2+} -каналов нифедипин полностью снимал этот эффект, демонстрируя, что вход кальция в цитозоль происходит через Ca^{2+} -каналы плазмалеммы. Известно, что АФК-индуцированный вход Ca^{2+} является важным модулем в регуляторных сетях растительной клетки и является важным компонентом в ряде физиологических процессов: АБК-индуцируемое закрытие устьиц, апикальный рост корневого волоска, рост эпидермальных клеток корня в зоне элонгации [12]. Полученные данные позволяют говорить о наличии такого модуля в системе регуляции роста пыльцевой трубки.

Мы предположили, что обнаруженная динамика $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ может быть тесно связана с изменениями мембранного потенциала, поскольку в пыльцевых трубках ранее были обнаружены потенциал-зависимые катионные каналы, опосредующие вход Ca^{2+} [13]. Для проверки этого предположения была исследована динамика мембранного потенциала при действии перекиси. С использованием двух различных красителей было обнаружено, что после добавления перекиси происходила гиперполяризация мембраны, сопровождающая вход Ca^{2+} . Обнаруженные мембранные эффекты свидетельствуют о наличии на плазмалемме пыльцевой трубки мишеней для действия перекиси.

Чтобы проверить, не вызывает ли экзогенная перекись патологических изменений в состоянии субпротопластов, проводили измерение рН, как интегрального показателя физиологического состояния, и оценку жизнеспособности. Было показано, что даже при воздействии 100 мкМ H_2O_2 рН не изменялся, а жизнеспособность сохранялась на уровне контроля. Это означает, что используемые концентрации являются физиологическими, а наблюдаемые эффекты свидетельствуют о возможном участии перекиси в передаче экзогенного сигнала.

Однако, для ответа на вопрос о конкретных мишенях для действия перекиси на плазмалемме необходимы дальнейшие исследования с использованием микроэлектродных методов. Кроме того, темой дальнейшего исследования является механизм H_2O_2 -индуцируемой гиперполяризации плазмалеммы.

Заключение

Обнаруженные мембранные эффекты говорят о возможности участия перекиси в передаче экзогенного сигнала в растущей пыльцевой трубке. В качестве мишеней для перекиси могут выступать нифедипин-чувствительные кальциевые каналы и ион-транспортные системы плазмалеммы, регулирующие мембранный потенциал. Обнаруженный сигнальный паттерн, предположительно может реализовываться при взаимодействии прорастающей пыльцы с тканями рыльца.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 14-04-31431 мол-а).

Литература

1. Petrov V.D., Breusegem F. Van. Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. // AoB Plants. 2012. Vol. 2012. P. 1–13.
2. Hancock J., Desikan R., Harrison J., Bright J., Hooley R., Neill S. Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception // J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57, № 8. P. 1711–1718.
3. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. ROS signaling: the new wave? // Trends Plant Sci. 2011. Vol. 16, № 6. P. 300–309.

4. Smirnova A.V., Matveyeva N.P., Yermakov I.P. Reactive oxygen species are involved in regulation of pollen wall cytomechanics // *Plant Biol.* 2013. Vol. 16. P. 252–257.
5. Potocky M., Jones M.A., Bezvoda R., Smirnoff N., Zarsky V. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth // *New Phytol.* 2007. Vol. 174. P. 742–751.
6. McInnis S.M., Desikan R., Hancock J.T., Hiscock S.J. Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk? // *New Phytol.* 2006. Vol. 172, № 2. P. 221–228.
7. Yu G., Liang J., He Z., Sun M. Quantum dot-mediated detection of gamma-aminobutyric acid binding sites on the surface of living pollen protoplasts in tobacco // *Chem. Biol.* 2006. Vol. 13, № 7. P. 723–731.
8. Wang Y.-F., Fan L.-M., Zhang W.-Z., Zhang W., Wu W.-H. Ca^{2+} -Permeable channels in the plasma membrane of Arabidopsis pollen are regulated by actin microfilaments // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 136. P. 3892–3904.
9. Брейгина М.А., Смирнова А.В., Матвеева Н.П., Ермаков И.П. Изменения мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки // *Цитология.* 2009. Vol. 51, № 10. P. 815–823.
10. Feijo J.A., Sainhas J., Hackett G.R., Kunkel J.G., Hepler P.K. Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip // *J. Cell Biol.* 1999. Vol. 144, № 3. P. 483–496.
11. Yang H.Y. Fluorescein diacetate used as a vital stain for labeling living pollen tubes // *Plant Sci.* 1986. Vol. 44, № 1. P. 59–63.
12. Mori I.C., Schroeder J.I. Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 135. P. 702–708.
13. Hepler P.K., Kunkel J.G., Rounds C.M., Winship L.J. Calcium entry into pollen tubes // *Trends Plant Sci.* Elsevier Ltd, 2012. Vol. 17, № 1. P. 32–38.

**MEMBRANE EFFECTS OF HYDROGEN PEROXIDE IN POLLEN TUBE
SUBPROTOPLASTS OF *NICOTIANA TABACUM* L.**

Maksimov N.M., Breygina M.A., Yermakov I.P.

Nicotiana tabacum, pollen tube, hydrogen peroxide, Ca^{2+} -signaling, membrane potential, ion channels

By means of fluorescent microscopy we have investigated $[Ca^{2+}]_{cyt}$ and membrane potential in pollen tube subprotoplasts after addition of H_2O_2 (10 μ M). H_2O_2 induced an increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$; this effect was reversed by the addition of calcium channel blocker nifedipine. Simultaneously H_2O_2 induced plasma membrane hyperpolarization, as shown by two independent methods. FDA test and pH measurement indicated that there are no pathological changes during H_2O_2 (100 μ M) treatment.

**МЕМБРАННЫЙ МЕХАНИЗМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ФОСФАТИДНЫХ КИСЛОТ
КАК ВТОРИЧНЫХ ПОСРЕДНИКОВ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ**

Медведев С.С., Тарасова О.В., Танкелюн О.В.

ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Университетская наб.,
7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, Россия; E-mail: ssmedvedev@mail.ru*фосфатидные кислоты, мембранные везикулы, флуоресцентные зонды, мембранный транспорт кальция и протона, трансдукция сигналов, цитокинины*

Фосфатидные кислоты (ФК), уровень которой в мембранах составляет 1-2% от общего содержания фосфолипидов, играют ключевую роль в метаболизме липидов растительной клетки, поскольку они вовлекается в биосинтез структурных фосфо- и гликолипидов. В последнее время ФК рассматривают также как вторичный мессенджер липидной природы, который участвует в передаче сигналов в растительной клетке о повреждении, водном, солевом и окислительном стрессах, в процессах полярного роста, осмотического изменения объема замыкающих клеток устьиц. Уровень ФК в клетках-мишенях временно повышается под АБК и этилена. Фосфатидные кислоты могут выполнять функции вторичных посредников липидной природы в различных сигнальных путях. Показано участие ФК в гормональной регуляции роста и развития растений, в реакциях на биотические и абиотические стрессы: механические повреждения, водный, солевой и окислительный стресс, действие патогенов, элиситоров. Однако механизмы передачи сигналов с участием ФК в растительной клетке пока еще изучены слабо.

Полагают, что ФК способны оказывать влияние на структуру мембран, участвовать во взаимодействии белков с клеточными мембранами, вызывать связывание белков с плазмалеммой и повышение активности ряда ферментов, например, таких как НАДФН-оксидазы, киназ МАРК-каскада, кальций-зависимых протеинкиназ. Изменение уровня ФК оказывает влияние на физические свойства мембран и их способность образовывать везикулы. Тем самым ФК может влиять на везикулярный транспорт в процессах экзо- и эндоцитоза.

Довольно давно было показано, что ФК обладают способностью транспортировать ионы Ca^{2+} через мембраны мышечных и нервных клеток [Putney et al., 1980; Salmon et al., 1980]. У растений на замыкающих клетках устьиц выявлено, что при передаче сигнала АБК изменение активности фосфолипазы Д (ФлД) сопровождается повышением уровня ионов Ca^{2+} в цитоплазме. Однако пока не установлено – являются ли изменения активности ФлД и уровня ионов Ca^{2+} последовательными в едином сигнальном пути или же эти события представляют собой независимые друг от друга процессы.

Основная цель настоящего исследования состояла в анализе сигнальных функций фосфатидных кислот в растительной клетке. В задачу работы входило исследовать ионофорные функции ФК на мембранных везикулах с использованием спектрофлуориметрических методов, а также оценить роль фосфатидных кислот в передаче цитокининового и осмотического сигналов.

В качестве объектов исследований служили мембранные везикулы, полученные из клеток корней и колеоптилей кукурузы.

Для измерения потоков кальция использовали флуоресцентные зонды: индо-1 (загружался внутрь везикул) и хлортетрациклин (добавлялся в среду инкубации). Установлено, что фосфатидные кислоты (50 – 500 мкМ) индуцируют вход ионов Ca^{2+} по градиенту концентрации внутрь везикул плазмалеммы и эндомембран (фрагменты тонопласта и эндоплазматического ретикулула).

Протонофорные функции ФК анализировали с помощью зонда акридинового оранжевого. Градиент ионов H^+ на везикулах тонопласта создавали за счет добавления Mg-АТФ и

активации, таким образом, H^+ -АТФазы вакуолярной мембраны. Затем везикулы обрабатывали ФК (25 - 100 мкМ), что вызывало выход протонов из везикул тонопласта и диссипацию протонного градиента.

Таким образом, установлено, что ФК могут функционировать, как ионофоры и переносить ионы Ca^{2+} и H^+ через мембраны растительных клеток по градиенту их концентрации. Транспортные функции фосфатидных кислот в мембране определяются их липофильностью и фосфатной группой с двумя гидроксильными остатками ($pK_1 - 3,5$, $pK_2 - 9,0$). Диссоциация гидроксильных групп ФК и, соответственно, их способность связываться с кальцием или протоном будет зависеть от pH. В щелочных условиях будет происходить диссоциация обеих групп с образованием двух отрицательных зарядов на остатке фосфорной кислоты. В этом случае ФК будут присоединять ионы Ca^{2+} и переносить их через мембрану по градиенту концентрации. В более кислой среде ФК будут переносить преимущественно протоны. Липофильные свойства ФК будут зависеть от их жирнокислотного состава.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ФК может оказывать прямое влияние на уровень ионов Ca^{2+} в цитоплазме, облегчая их перемещение в цитоплазму из внутриклеточных компартментов и апопласта по градиенту концентрации. Если ФК обладают функцией кальциевого ионофора, то они могут участвовать в системе кальциевой сигнализации, инициируя транспорт ионов Ca^{2+} по градиенту концентрации в цитоплазму, тем самым, активируя Ca-регулируемые процессы. Модуляции уровня Ca^{2+} в цитоплазме относятся к одному из основных механизмов внутриклеточной сигнализации, которые обнаруживаются под действием многообразных стимулов.

В качестве протонифора фосфатидные кислоты, могут выполнять, как минимум две функции. Во-первых, они могут индуцировать кислотно-щелочные сдвиги в клеточных компартментах и вызывать pH-зависимое изменение активности энзиматических систем. Во-вторых, шунтируя электрохимический градиент ионов H^+ на сопрягающих мембранах митохондрий и хлоропластов, они, вероятно, способны влиять на синтез АТФ, т.е. на энергетику клетки. Таким образом, фосфатидные кислоты, обладая функциями ионофоров, могут принимать участие не только в функционировании систем кальциевой и протонной сигнализации, но также и в регуляции энергетики растительной клетки.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-01-624 и грантом СПбГУ № 1.38.233.2014.

MEMBRANE MECHANISM OF PHOSPHATIDIC ACIDS FUNCTIONING AS SECOND MESSENGERS IN THE PLANT CELL

Medvedev S.S., Tarasova O.V., Tankelyun O.V.

phosphatidic acids, membrane vesicles, fluorescent probes, membrane transport of calcium and proton, signal transduction, cytokinins

It has been shown that phosphatidic acids (PAs) have properties of proton and calcium ionophores. As a calcium ionophore PAs may be involved in calcium signaling system and Ca-regulated processes. As a protonophore PAs can induce the pH-dependent enzymatic activity changes and probably able to influence the synthesis of ATP, and thus on the cell energetics. The participating PAs in the transduction of osmotic and cytokinin signals in the plant cell is also discussed.

**ДЕЙСТВИЕ НИТРАТА НА ФЕРМЕНТЫ ДИССИМИЛЯЦИИ САХАРОЗЫ
ГОРОХА ПОСЕВНОГО В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

Никитин А.В., Измайлов С.Ф.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35,
г. Москва, 127276, Россия, E-mail: nitrogenexchange@mail.ru*горох посевной, сахарозосинтаза, кислая и щелочная инвертазы, нитрат, нитратный сигна-
линг, гетеротрофия, автотрофия***Введение**

Нитрат, основной источник азота для растений, помимо субстратной выполняет важную сигнальную роль, регулируя экспрессию более тысячи генов быстрого ответа [1]. Последние кодируют ферменты не только азотного обмена, но и гликолиза, пентозофосфатного пути, цикла Кребса и др. [2]. В результате происходит репрограммирование С- и N-метаболизма, роста и развития [3]. До сих пор малоизученным остаётся вопрос, входят ли в сферу нитратного сигналинга стартовые реакции метаболизма основных депонируемых форм углерода – сахарозы и крахмала. Система ферментов диссимилиации сахарозы включает в себя сахарозосинтазу (СС), кислую (КИ) и щелочную (ЩИ) инвертазы. Цель работы – исследование действия нитрата как возможного сигнального агента на альтернативные сахарозорасщепляющие ферменты – СС, КИ, ЩИ у растений гороха в раннем онтогенезе.

Материалы и методы

В работе были использованы набухшие семена и проростки гороха посевного (*Pisum sativum* L.) сорта Адагумский. Для определения активности СС использовали корни (с гипокотилем), КИ – междоузлия стеблей, ЩИ – молодые листья как органы с преимущественной локализацией соответствующих ферментов. Нитрат (14,2 мМ) входил в состав среды Кнопа в форме $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и KNO_3 . Контролем служила среда без нитрата. Дефицит кальция и калия в неполных средах компенсировали внесением солей $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и K_2SO_4 в эквимолярных концентрациях. Растения выращивали в факторостатной камере при температуре 27°C, 16-часовом фотопериоде, освещенности 18 тыс. лк. Активность СС определяли в направлении синтеза сахарозы с окрашиванием по Рое и измерением оптической плотности при длине волны 520 нм. Активность КИ/ЩИ определяли по наработке глюкозы глюкозооксидазным методом с измерением оптической плотности при 500 нм.

Результаты и обсуждение

В отсутствие нитрата в среде активность СС в корнях с гипокотилем в период 1–20 сут. роста растений экспоненциально убывала (рис. 1а, кривая 1). В первые трое сут. прорастания она была наиболее высокой и в 2–3 раза превышала выявленную в течение последующего времени развития растений. Позитивный эффект нитрата на активность СС отчетливо проявлялся в течение всего исследованного отрезка онтогенеза, имея место уже на 2 сут. от замачивания семян (рис. 1а, кривая 2). В этот период он был вдвое выше, чем при дальнейшем развитии (до 20 суток). Пересчет активности СС в органах на среде с нитратом в процентах от контроля показал наличие пика эффекта NO_3^- на 6–8 сут. роста (рис. 1б).

Активность КИ в начале периода роста стеблей (6 сут.) более чем в 9 раз превышала характерную для сформированных органов (рис. 2). Активность ЩИ в растущей верхушке побега в течение 6–14 сут. роста практически не изменялась (рис. 2). Нитрат не оказывал эффекта на оба фермента.

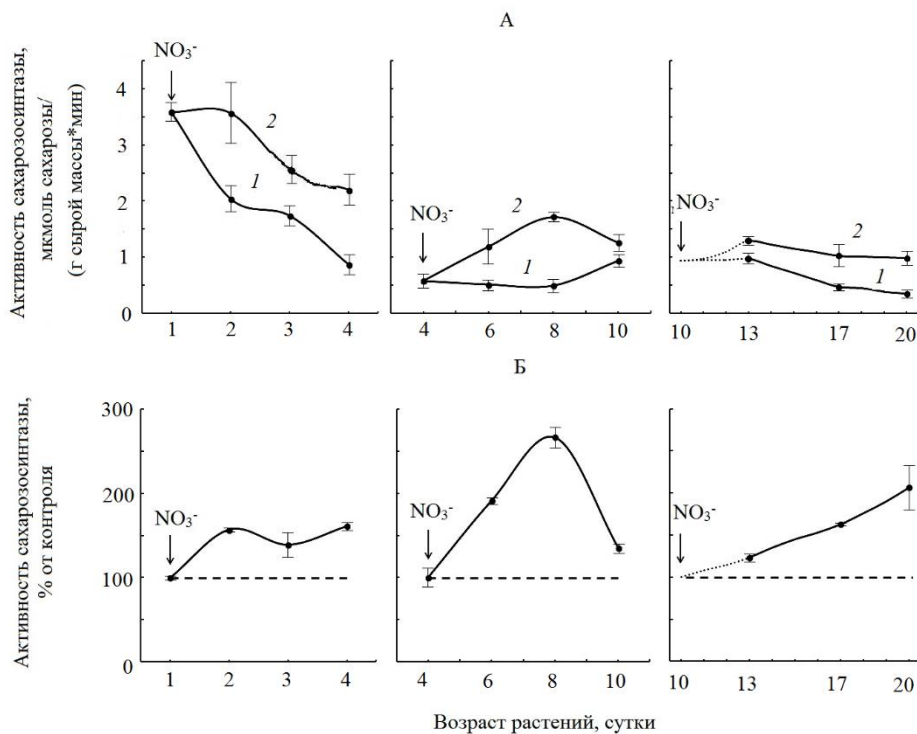
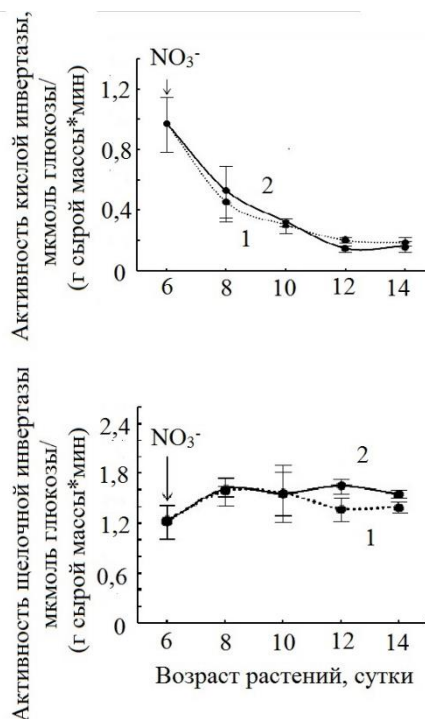


Рисунок 1 - Активность сахарозосинтазы в корнях гороха в зависимости от наличия нитрата в среде при гетеротрофии и нарастающей автотрофии. А – в абсолютных величинах, Б – в процентах от контроля (штриховая линия). 1 – на среде без нитрата, 2 – на среде с 14.2 мМ нитратом

Figure 1 - Sucrose synthase activity in pea roots as dependent on the presens of nitrate in nutrient medium in heterotrophy and increased autotrophy. (A) absolute values; (B) percentage of control (dashed line). (1) nitrate-free medium; (2) medium contained nitrate (14.2 mM)

Рисунок 2 - Активность инвертаз гороха в период 6–14 сут. роста растений в зависимости от наличия в питательной среде нитрата. 1 – на среде без нитрата, 2 – на среде с 14.2 мМ нитратом

Figure 2 - Invertases activity during pea plant growth 6–14 days as dependent on the presens of nitrate in nutrient medium. (1) nitrate-free medium; (2) medium contained nitrate (14.2 mM)



Различное действие нитрата на стартовые ферменты метаболизма сахарозы может быть связано с их функциональной спецификой. В отличие от инвертаз СС обеспечивает наработку УДФ-глюкозы, на основе которой осуществляется биосинтез структурных полисахаридов апопласта, а также трегалозо-6-фосфата как регулятора роста и энергетического обмена [4]. Помимо этого, как показывает результат процентного выражения, максимум нитратзависимой активности СС совпадает и с пиковой реутилизацией запасного белка семядолей [5]. Таким образом, через увеличение активности СС, как приоритетной по сравнению с инвертазами мишени, нитрат способен интенсифицировать широкий круг связанных с ростом и развитием субстратных и сигнальных процессов. Это особенно значимо при стартовом росте зародыша, происходящем за счет локализованных в его оси запасов.

Выводы

Показано, что уже в самом начале прорастания семян гороха посевного нитрат увеличивает активность ключевого фермента диссимиляции сахарозы – СС, тем самым обеспечивая С-субстратами процессы первичного роста проростка и утилизации запасных N-пулов. Инвертазы не входят в круг мишеней нитрата.

Литература

1. Wang R., Guan P., Chen M., Xing X., Zhang Y., Crawford N.M. Multiple regulatory elements in the Arabidopsis NIA 1 promoter act synergistically to form a nitrate enhancer // *Plant Physiol.* 2010. V. 154. № 1. P. 423-432.
2. Wang R., Okamoto M., Xing X., Crawford N.M. Microarray analysis of the nitrate response in Arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulphate metabolism // *Plant Physiol.* 2003. V. 132. № 2. P. 556-567.
3. Tsay Y.-F., Ho Ch.-H., Chen H.-Y., Lin Sh.-H. Integration of nitrogen and potassium signaling // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2011. V. 62. № 6. P. 207-227.
4. Abid G., Silue S., Muhovski Y., Jacquemin J.M., Toussaint A., Baudoin J.P. Role of myo-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development // *Gene.* 2009. V. 439. № 1-2. P. 1-10.
5. Basha S.M.M., Beevers L. The development of proteolytic activity and protein degradation during the germination of *Pisum sativum* L. // *Planta.* 1975. V. 124. № 1. P. 77-87.

NITRATE EFFECT OF SUCROSE CLEAVING ENZYMES OF GARDEN PEA IN EARLY DEVELOPMENT

Nikitin A.V., Izmailov S.F.

garden pea, sucrose synthase, acid and neutral invertases, nitrate, nitrate signaling, heterotrophy – autotrophy

During the period of heterotrophic and early autotrophic plant nutrition (0–20 days) exogenous nitrate (14.2 mM) stimulated sucrose synthase activity in roots and hypocotyls. Maximum effect was observed at the beginning of germination (2 days from seed soaking), second peak – at most intensive utilization of cotyledon reserves (6–8 days of plant growth). During the 6–14 days period, nitrate did not affect invertases activity.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35,
г. Москва, 127276, Россия, E-mail: gv.novikova@mail.ru

фитогормоны, оксид азота, передача сигналов, нитрозилирование, нитрирование

Знания последних лет, безусловно, указывают, что оксид азота (NO) – внутриклеточная сигнальная молекула, участвующая в регуляции физиологических изменений, происходящих на всех этапах жизненного цикла растений, начиная с прорастания семян до созревания плодов, старения и запрограммированной клеточной смерти. Даже из этого неполного перечисления видно, что, регулируя названные физиологические программы, NO обязан взаимодействовать, в частности, с фитогормонами. Сейчас начинает складываться механистическая картина взаимоотношений фитогормонов и NO. Понятно, что и NO, и фитогормоны могут участвовать в осуществлении одного и того же физиологического ответа. Однако не ясно, используются ли для этого общие сигнальные компоненты, или фитогормоны и NO способны регулировать одинаковый ответ посредством параллельно и независимо функционирующих путей передачи их сигналов. Несмотря на методическую сложность и концептуальную неоднозначность, которые сопровождают исследования механизмов, ответственных за взаимодействие путей передачи сигналов фитогормонов и NO, недавно получены принципиально значимые результаты. Цель предлагаемого доклада – не столько рассказать о современных успехах в изучении механизмов взаимодействия фитогормонов и NO, сколько сформулировать вопросы, ответы на которые позволят разобраться в том, как сигнал NO «конвертируется» в физиологические ответы, реализуемые как при нормальных условиях роста растений, так и при действии стрессовых факторов различной природы. Эти новые знания позволят манипулировать взаимодействием NO и фитогормонов для обеспечения регуляции метаболизма, роста и развития растений.

В течение последних 15 лет, прошедших со времени открытия NO у растений, исследователи NO «охотились» за его белками-рецепторами. Однако убедительные сведения об идентификации рецепторов NO так и не были получены. Отчасти по этой причине основное внимание уделялось исследованию белков, которые NO модифицирует на пост-трансляционном уровне. Наиболее важными из этих модификаций являются S-нитрозилирование и нитрирование Тир. Эти модификации могут влиять на активность белков, их стабильность и внутриклеточную локализацию, а также на белок-белковые, белок-ДНК, белок-кофактор взаимодействия и даже на связывание белка с гормоном. Поскольку сейчас изучение не только физиологического значения нитрозилирования и нитрирования *in planta*, но, собственно, идентификация модифицируемых NO белков находятся лишь на начальной стадии, то в ближайшее время это направление будет развиваться наиболее интенсивно.

Рассуждая о взаимодействии NO с фитогормонами, необходимо понять, каким образом настраивается тонкий механизм, обеспечивающий образование и деградацию NO, а также как осуществляется транспорт NO. Эти сведения позволят установить локализацию NO в клетке, определить концентрацию NO и его производных. Сейчас газообразный NO определяют при помощи хемилюминесцентного, фотоакустического, масс-спектрометрического методов, а для определения NO в экстрактах растительных клеток/тканей используют флуоресцентные красители, пробы с оксигемоглобином, NO-электроды, реактив Грисса и ЭПР. Однако оказалось, что применить лишь один из перечисленных методов недостаточно для получения надёжных данных, причём как в случае обработки растений донорами NO, так и при физиологических или стрессовых условиях. Использование для доказательства синтеза NO в клетках растений сРТЮ также имеет серьёзные ограничения, поскольку ингибирующий эффект сРТЮ зависит не только от постановки эксперимента, но и определяется биологическими особенностями объекта исследования. Так как предполагается, что ответ растения на NO зависит от его концентрации, пристальное внимание будет уделено развитию высокочувствительных специфических методов идентификации и NO, и его производных.

Учитывая, что нитрозилирование и нитрирование белков, скорее, обратимо, следует разобрататься в вопросе о том, как в целом, происходит оборот модифицированных NO белков. Здесь немедленно возникает аналогия с процессами фосфорилирования и дефосфорилирования белков. Действительно, денитрозилазы и денитразы могут существенно влиять на кинетические характеристики сигнальных путей. Названные ферменты, без сомнения, ожидают своих исследователей.

Благодаря газообразной природе и способности к диффузии, NO может транспортироваться по клетке/ткани/растению. Вместе с тем, высокая реакционная способность NO может ограничивать диффузию этого радикала в биологических тканях. Здесь возникает ещё один интригующий вопрос, ожидающий решения: как растительная клетка распознаёт NO, образующийся эндогенно, и NO, поступающий как экзогенный сигнал.

Непременно внимания заслуживает также выяснение того, как NO регулирует биосинтез и/или передачу сигналов фитогормонов, могут ли фитогормоны контролировать эндогенный уровень NO. Существующие в настоящее время данные указывают, что, практически все фитогормоны, до определённой степени, могут «следить» за концентрацией и распределением NO, а уровень NO может инициировать изменения метаболизма и передачу сигналов фитогормонов. Остаётся, однако, не ясным, происходит ли такое взаимное влияние в одно время и в одном месте. Между тем, для некоторых фитогормонов уже сейчас можно говорить о том, что NO влияет на работу пути передачи гормонального сигнала посредством изменения активности отдельных сигнальных компонентов. Показано, например, что NO влияет на убиквитинирование белков и зависящий от протеосом протеолиз белков-репрессоров. Учитывая, что в клетках животных убиквитин лигазы подвергаются нитрозилированию, становится всё очевиднее наличие общих закономерностей действия NO в клетках эукариот. Хотя и здесь необходимо понять, может ли у растений NO напрямую влиять на деградацию сигнальных белков. Это направление исследований также требует дальнейшего развития.

Наконец, достижения, касающиеся «взаимодействия» NO и фитогормонов, описывают ситуации, наблюдаемые лишь у трёх видов растений: *Arabidopsis*, томаты и рис. Расширение числа растительных объектов, а также увеличение разнообразия физиологических программ, применительно к которым исследуются механизмы взаимодействия фитогормонов и NO, помогут детализировать роль NO как контролёра метаболизма, роста и развития растений.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-00333).

PLANT HORMONES AND NO INTERPLAY: CROSSTALKS ARE INEVITABLE

Novikova G.V.

phytohormones, nitric oxide, signal transduction, nitrolylation, nitration

Gaseous free radical nitric oxide (NO) is involved in a number of signaling cascades controlling numerous plant physiological responses. Although significant progress has been made within the last 15 years the exact nature of the NO-phytohormone interaction still not completely elucidated. The talk will be focus on challenging questions that remain to be answered to define the mechanisms responsible for interconnecting plant hormones and NO signaling.

БИОСИНТЕЗ ОКСИЛИПИНОВ В ПЛАУНКЕ *SELAGINELLA MARTENSII*

Огородникова А.В., Мухитова Ф.К., Гречкин А.Н.

ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН,
ул. Лобачевского 2/31, а/я 30, г. Казань, 420111, Россия, E-mail: anyuta_ogorodnik@mail.ru*Selaginella martensii*, оксипирины, линолевая кислота, α -линоленовая кислота, дивиниловые эфиры**Введение**

Оксипирины являются продуктами липоксигеназного каскада. В растениях эти метаболиты выполняют роль медиаторов сигнальных систем, регуляторов роста и эндогенных средств защиты от биогенных и абиогенных стрессоров. Цепь ферментативных реакций начинается с окисления ненасыщенной жирной кислоты при участии липоксигеназы, а затем ряд ферментов, осуществляет дальнейшие превращения оксигенированных C₁₈-жирных кислот. Среди ключевых ферментов липоксигеназного каскада, во многом определяющих его направленность, в настоящее время известны три основных группы: алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы и дивинилэфирсинтазы (ДЭС). До сих пор активность ДЭС была обнаружена в ограниченном количестве растительных видов. Это филогенетически отдалённые виды: коричневая и красная водоросли, однодольные (чеснок, ландыш, ирис, гладиолус) и двудольные (некоторые виды *Ranunculaceae* и *Solanaceae*, включающие картофель, томат и табак). В филогенетических построениях плауновидные занимают промежуточное положение между водорослями и семенными растениями (цветковыми и голосеменными). Липоксигеназный путь у плауновидных ранее изучен не был. Поэтому изучение метаболизма ненасыщенных жирных кислот в плаунке *Selaginella martensii* может дополнить картину биосинтеза оксипиринов и последовательной эволюции наземных растений.

Материалы и методы

Растительный материал – плаунок *Selaginella martensii* – был поставлен фирмой *Zeester Bloenn en Planten B.V.* (Голландия, Нидерланды). Линолевая и α -линоленовая кислоты были получены от *Sigma* (США). Бесклеточные препараты из листьев (филлоидов) и стеблей *Selaginella martensii* инкубировали с линолевой и α -линоленовой кислотой при постоянном пропускании кислорода. Продукты экстрагировали, очищали с помощью твёрдофазной экстракции, превращали в ТМС-производные метиловых эфиров и анализировали с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии. Для микропрепаративного разделения продукты в виде метиловых эфиров делили и очищали с помощью ВЭЖХ на обращённой и, затем, на нормальной фазе. Для ВЭЖХ анализа использовали хроматографическую систему производства фирмы *Gilson (Gilson, Франция)*, состоящую из двух насосов (305 и 306), манометрического модуля и ручного инжектора *Rheodyne 7125 (Rheodyne, США)*. Хроматография на колонках с обращённой фазой (C₁₈) использовалась во всех экспериментах как первый этап разделения оксигенированных жирных кислот. Собранные фракции высушивали, перерастворяли в гексане для дальнейшей очистки на колонке с нормальной фазой. В качестве детектора использовался спектральный детектор с диодной матрицей *SHIMADZU SPD-M20A* (Япония). Очищенные продукты анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) в виде MeTMS-эфиров, которые получали метилированием диазометаном и силинизацией (пиридин – гексаметилдисилазан – триметилхлорсилан в соотношении 2:1:2 по объёму). Анализ проводили с помощью масс-селективного хромато-масс-спектрометра *SHIMADZU QP5050* (Япония). Ввод исследуемого образца осуществляли в режиме деления в кварцевую капиллярную колонку MDN-5S (5% фенил, 95% метилполисилоксан) длиной 30 м и диаметром 0.25 мм при программировании температуры от 120 до 240 °С по 10 °С/мин, в качестве газоносителя использовали гелий с линейной скоростью 30 мл/с.

Результаты и обсуждение

Нами установлено, что при инкубациях происходит образование оксипинов с характерными УФ-спектрами и большим временем удерживания на колонках с обращённой фазой. Метаболиты имели максимум поглощения в УФ-свете в области 267-268 нм и 248-251 нм, что характерно, согласно литературным данным [1-3], для дивиниловых эфиров производных α -линоленовой и линолевой кислот. ГХ-МС анализ продуктов показал, что преобладающей гидроксикислотой была 13-гидроксистеариновая кислота. Это говорит о том, что основным продуктом липоксигеназного окисления была 13-гидроперекись линолевой кислоты. Таким образом, в плауне *Selaginella martensii* преобладает 13-липоксигеназная активность. Наряду с гидроперекисями жирных кислот, в ходе ГХМС анализа выделенных оксипинов были обнаружены соединения **I**, **II**, **III**, **IV**, **V** и **VI** (рис. 1А).

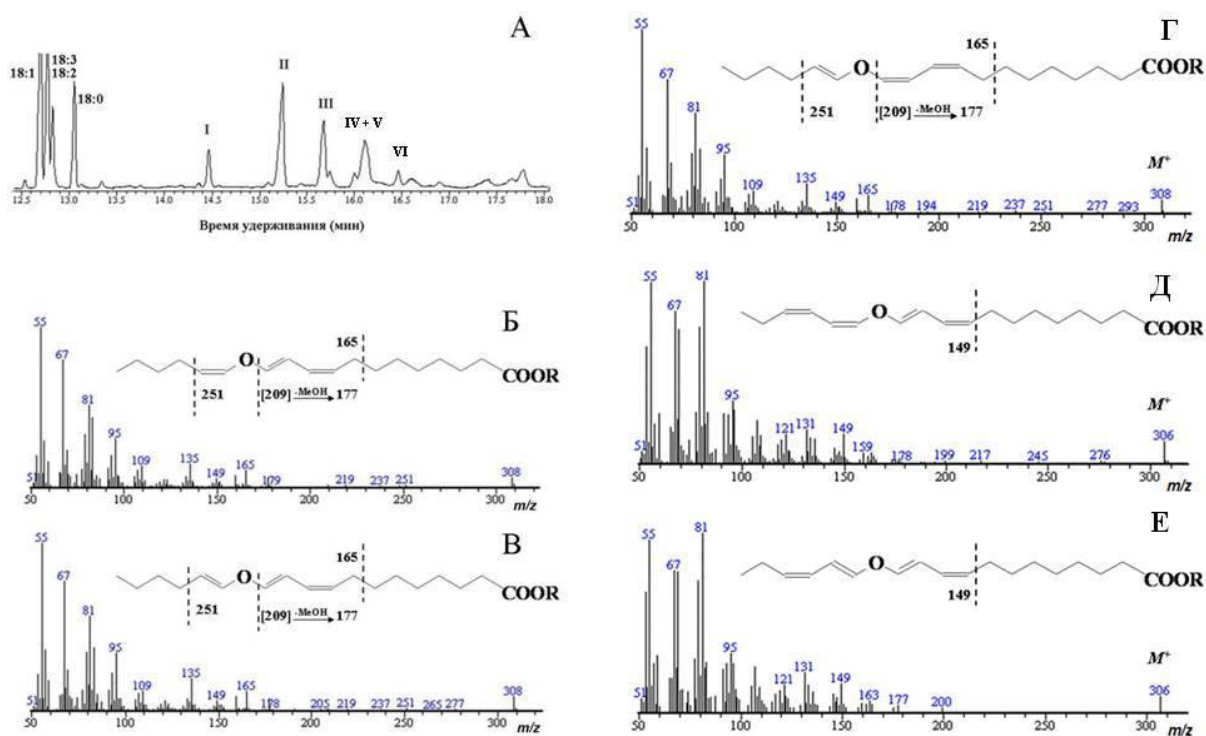


Рисунок 1 - Продукты инкубации линолевой и α -линоленовой кислот с 15000g супернатантом *Selaginella martensii*. (А) – хроматограмма по полному ионному току; (Б), (В), (Г), (Д), (Е) – масс-спектры и схемы фрагментаций соединений **I**, **II**, **III**, **IV** и **V** соответственно (R = CH₃)

Figure 1 - Products of linoleic and linolenic acids incubation with 15,000 g supernatant of *Selaginella martensii*. (A) – the total ion GC-MS chromatograms of products as Me esters; (Б), (В), (Г), (Д), (Е) – mass spectral data for compounds **I**, **II**, **III**, **IV** и **V** (R = CH₃)

Соединение **II** было основным продуктом превращения линолевой кислоты *in vitro*. Также наблюдалось образование, но в меньшей степени, соединений **I** и **III**, также производных линолевой кислоты. Для изучения структуры соединений были записаны масс-спектры электронного удара. Картина масс-спектрометрической фрагментации продуктов **I**, **II** и **III** была идентичной описанным ранее фрагментациям дивиниловых эфиров: (9Z,11E,1'Z)-12-(1'-гексенилокси)-9,11-додекадиеновой ((ω 5Z)-этеролевой), (9Z,11E,1'E)-12-(1'-гексенилокси)-9,11-додекадиеновой (этеролевой) и (9Z,11Z,1'E)-12-(1'-гексенилокси)-9,11-додекадиеновой ((11Z)-этеролевой) кислот. Масс-спектр электронного удара метилового эфира продукта **I**, **II** и **III** (рис.1В-Г) имел молекулярный ион с m/z 308, а картина фрагментации, была идентична фрагментации метиловых эфиров этеролевой, (ω 5Z)-этеролевой и (11Z)-этеролевой кислот. Для дальнейшего установления структуры, соединения **I**, **II** и **III** были выделены при помощи обращено-фазовой ВЭЖХ и очищены с ис-

пользованием нормально-фазовой ВЭЖХ. Анализ полученных данных показал, что согласно времени удерживания (рис.1) и масс-спектрам электронного удара метилового эфира продуктов, соединение **I** было идентифицировано как метиловый эфир (9Z,11E,1'Z)-12-(1'-гексенилокси)-9,11-додекадиеновой (ω 5Z)-этеролево́й кислоты, соединение **II** - (9Z,11E,1'E)-12-(1'-гексенилокси)-9,11-додекадиеновой (этеролево́й) кислоты (метиловый эфир), соединение **III** - (9Z,11Z,1'E)-12-(1'-гексенилокси)-9,11-додекадиеновой ((11Z)-этеролево́й) кислоты (метиловый эфир). Соединения **IV** и **V** (рис.1А) были основным продуктом превращения α -линоленовой кислоты *in vitro*. Также наблюдалось образование, но в меньшей степени, соединения **VI**, производного α -линоленовой кислоты. Картина масс-спектрометрической фрагментации продуктов **IV**, **V** и **VI** (рис. 1Д-Е) была идентичной описанным ранее фрагментациям дивиниловых эфиров (9Z,11E,1'E,3'Z)-12-(1',3'-гексадиенилокси)-9,11-додекадиеновой (этеролево́й), (9Z,11E,1'Z,3'Z)-12-(1',3'-гексадиенилокси)-9,11-додекадиеновой (ω 5Z)-этеролево́й и (9Z,11Z,1'E,3'Z)-12-(1',3'-гексадиенилокси)-9,11-додекадиеновой ((11Z)-этеролево́й) кислот. Для подтверждения структуры и геометрической конфигурации соединений **I-VI** были получены их спектры ^1H ЯМР и COSY.

Заклучение

Впервые исследован метаболизм ненасыщенных жирных кислот у представителя плауновидных *Selaginella martensii*. Установлено, что основным направлением липоксигеназного каскада линолевой и линоленовой кислот в *Selaginella martensii* является дивинилэфирсинтазный путь. Присутствие ДЭС активности в плаунке, как и в водорослях, может свидетельствовать о том, что дивинилэфирсинтазный путь метаболизма линолевой и α -линоленовой кислот имеет древнее происхождение.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» 2013-2017, РФФИ (гранты № 12-04-01140, № 12-04-97059-р_поволжье), гранта Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ РФ НШ-825.2012.4.

Литература

1. Grechkin A.N., Fazliev F.N., Mukhtarova L.S.. The lipoxygenase pathway in garlic (*Allium sativum* L.) bulbs: detection of the novel divinyl ether oxylipins. *FEBS Lett.* 1995. Vol.371. No.2. P.159-162.
2. Grechkin A.N., Ilyasov A.V., Hamberg M.. On the mechanism of biosynthesis of divinyl ether oxylipins by enzyme from garlic bulbs. *Eur. J. Biochem.* 1997. Vol.245. P.137-142.
3. Ogorodnikova A.V., Latypova L.R., Mukhitova F.K., et al. *Phytochemistry.* 2008. Vol.69. No.16. P.2793-2798.

BIOSYNTHESIS OF OXYLIPINS IN THE LYCOPHYTE *SELAGINELLA MARTENSII*

Ogorodnikova A. V., Mukhitova F.K., Grechkin A.N.

Selaginella martensii, oxylipins, linoleic acid, linolenic acid, divinyl ethers

The divinyl ether synthase (DES) activity and divinyl ethers have been detected in the division of Lycopodiophyta: *Selaginella martensii*. Exogenous linoleic and linolenic acids were metabolized predominantly into the divinyl ethers – etheroleic and colneleic acids. The products in the form of methyl esters of trimethylsilyl derivatives (Me TMS) were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry.

ДЕЙСТВИЕ НИТРАТА НА МЕТАБОЛИЗМ КРАХМАЛА В СЕМЯДОЛЯХ ГОРОХА ПОСЕВНОГО

Подмарьков В.Г., Измайлов С.Ф.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35,
г. Москва, 127276, Россия, E-mail: nitrogenexchange@mail.ru

горох посевной, крахмал, амилаза, нитрат, нитратный сигналинг, гетеротрофия, автотрофия

Введение

Нитрат, являясь одним из основных источников питания растений, индуцирует не только ключевые ферменты азотного, но и углеродного метаболизма. Одним из мало изученных вопросов остается возможность его включения в регуляцию утилизации крахмала. В данной работе была применена модель гетеротрофного растения, исключая потребность в нитрате как в субстрате, но допускающая возможность его использования как сигнального агента. Цель работы – характеристика нитратного сигналинга по количественным и временным параметрам действия иона на утилизацию крахмала в семядолях гороха посевного.

Материалы и методы

В работе использован сорт гороха посевного Орегон, который выращивали на среде Кнопс с разными концентрациями экзогенного нитрата (3,5; 7,0; 14мМ) и набором микроэлементов по Хогланду, при 16-часовом фотопериоде и освещенности 18000 люкс. Содержание крахмала определяли спектрофотометрически йодным методом при длине волны 700 нм, активность амилазы – по действию выделенной из семядолей амилазы на контрольные образцы крахмала. Содержание белка в экстракте определяли с помощью реактива Бредфорд. Расчет активности амилазы приводится в % от контроля (относительная активность), где контроль – величина активности амилазы в семядолях растения, росших на среде без нитрата.

Результаты и их обсуждение

Данные по действию нитрата на содержание крахмала в семядолях гороха в течение первых 12 сут. роста представлены на рисунке 1.

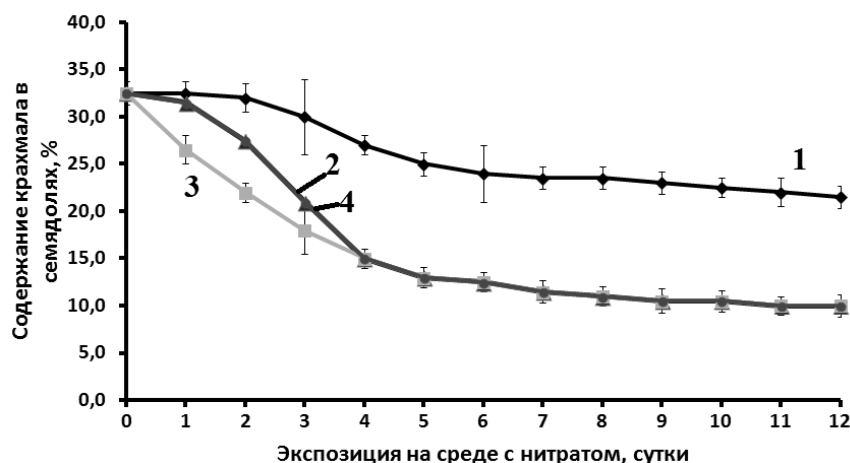


Рисунок 1 - Содержание крахмала в семядолях гороха. 1 – среда без нитрата; 2 – среда с 3,5 мМ; 3 – с 7 мМ; 4 – 14 мМ нитрата.

Figure 1 - Starch percentage in pea cotyledons. 1- nitrate-free medium, 2 – 3,5 mM; 3 – 7 mM; 4 – 14 mM nitrate.

Видно, что максимальная скорость убыли крахмала приходилась на 2-4 сутки, с последующим спадом к 12 суткам. Далее содержание крахмала в семядолях практически не изменялось вплоть до 30 суток. Действие экзогенного нитрата при всех испытываемых концентрациях

циях существенно не влияло на характер кривой до 12 сут. роста, однако происходила более полная утилизация крахмала с практически одинаковой интенсивностью при всех испытываемых концентрациях. В итоге, в этом случае к 12 сут. его оставалось до 8%, в то время как без нитрата до 25%. В результате происходило ускорение роста корня и побега проростка за счет увеличения их биомассы.

Проведенное определение амилолитической активности в семядолях выявило аналогичную закономерность действия нитрата на распад крахмала (рис. 2).

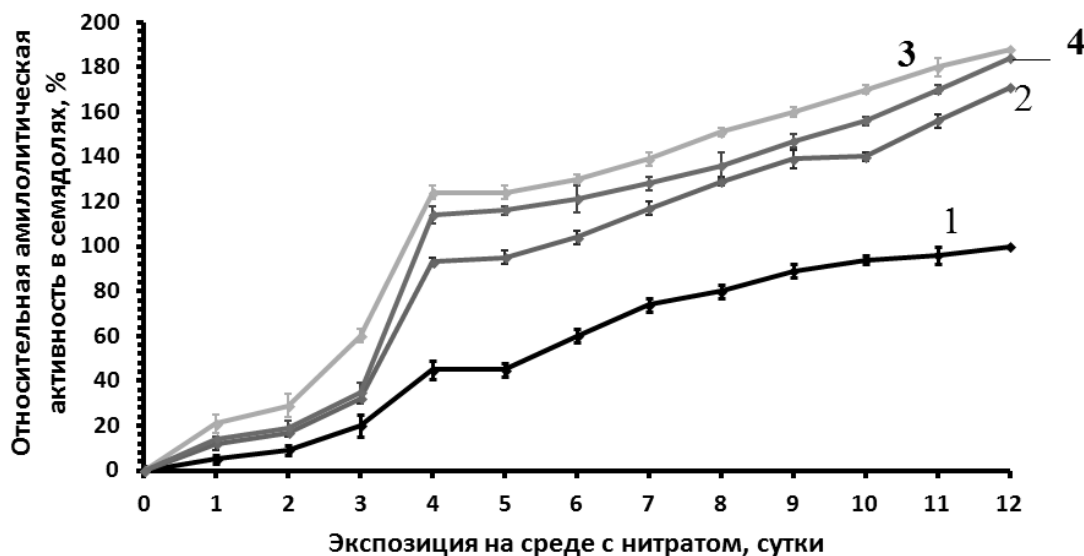


Рисунок 2 - Относительная активность амилазы в семядолях гороха в течение первых 12 сут. роста. 1 – среда без нитрата; 2 – среда с 3,5 мМ; 3 – 7 мМ; 4 – 14 мМ нитрата.

Figure 2 - Relative amylase activity in pea cotyledons during first 12 days of plant development. 1- nitrate-free medium; 2 – 3,5 mM; 3 – 7 mM; 4 – 14 mM nitrate.

Активность фермента под воздействием нитрата повышалась уже после 1 суток, далее наблюдался отчетливый пик к 4 суткам, что соответствует максимальной интенсивности распада крахмала, с последующим более плавным ростом до 12 суток. Как и в случае данных, представленных на рисунке 1, концентрация экзогенного нитрата мало влияла на исследуемый процесс (рис. 2). На основании этого можно предположить сигнальную природу наблюдаемого эффекта.

Распад крахмала не проявлялся в изолированных семядолях, что указывает на необходимость их взаимодействия с осевыми органами для проявления указанного процесса.

Выводы

Нитрат уже на самых ранних стадиях развития проростка гороха посевного стимулирует амилолитическую активность и, соответственно, скорость утилизации запасного крахмала семядолей гороха посевного. Наблюдаемое явление не связано с субстратной ролью нитрата.

Литература

1. Wang R., Guan P., Chen M., Xing X., Zhang Y., Crawford N.M. Multiple regulatory elements in the *Arabidopsis* NIA 1 promoter act synergistically to form a nitrate enhancer // *Plant Physiol.* 2010. V. 154. № 1. P. 423-432.
2. Wang R., Okamoto M., Xing X., Crawford N.M. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulphate metabolism // *Plant Physiol.* 2003. V. 132. № 2. P. 556-567.
3. Tsay Y.-F., Ho Ch.-H., Chen H.-Y., Lin Sh.-H. Integration of nitrogen and potassium sig-

naling // Annu. Rev. Plant. Biol. 2011. V. 62. № 6. P. 207-227.

4. Coruzzi G., Daniel R. Bush. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 61-64.

5. Bernfeld P. Amylases, α and β // Meth. Enzymology. 1955. V. 1. P. 149-158.

NITRATE EFFECT ON STARCH METABOLISM IN GARDEN PEA COTYLEDONS

Podmarkov V.G., Izmailov S.F.

garden pea, starch, amylase, nitrate, nitrate signaling, heterotrophy, autotrophy

Nitrate presence in the medium stimulates amylase activity in germinating pea cotyledons. The effect is unrelated to substrate role of nitrate and is a form of nitrate signaling.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ГЛУТАТИОНСИНТЕТАЗЫ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К ДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР И КАДМИЯ

Репкина Н.С., Таланова В.В., Титов А.Ф., Букарева И.В.

ФГБУН Институт биологии КарНЦ РАН, ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, 185910, Россия, E-mail: nrt9@ya.ru

низкие температуры, кадмий, пшеница, устойчивость, глутатионсинтетаза

Введение

Неблагоприятные факторы внешней среды напрямую или опосредованно способны вызывать накопление в клетках и тканях растений свободных форм кислорода и соответственно, приводить к активизации защитных антиоксидантных систем, включающих низкомолекулярные антиоксиданты [1; 2]. Одним из основных низкомолекулярных антиоксидантов является глутатион, в синтезе которого ключевую роль играет фермент глутатионсинтетаза, кодируемая геном *GSI*. В связи с этим, цель данной работы заключалась в изучении экспрессии гена глутатионсинтетазы при действии на растения низкой температуры и кадмия.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований использовали проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с. Московская 39, которые выращивали при постоянных условиях в климатических камерах. По достижении недельного возраста проростки в течение 7 сут подвергали действию низких закалывающих температур (4, 8, 12 °С) или сульфата кадмия (100–2000 мкМ). О реакции растений на действие низких температур и кадмия судили по изменению показателей роста и проницаемости мембран клеток листа. Накопление транскриптов гена *GSI* анализировали методом ПЦР в режиме реального времени.

Результаты и обсуждение

Установлено, что чем ниже действующая на растения температура, тем в большей степени замедляются у них ростовые процессы. В частности, при температуре 4°С уже в начальный период ее действия (1 сут) происходило практически полное прекращение роста побега, и хотя через 2–3 сут наблюдалось частичное его восстановление, к концу эксперимента (на 7-е сут) высота побега превышала исходный уровень всего на 20% (в контроле – на 70%). При температурах 8 и 12°С также наблюдалось торможение роста побега, но в меньшей степени, чем при 4°С. Таким образом, хотя температуры 4, 8 и 12°С и вызывают торможение роста растений, но полной его остановки не происходит. Это говорит о способности пшеницы поддерживать на определенном уровне основные процессы жизнедеятельности в условиях пониженных температур. Наблюдаемое же при этом торможение роста можно рассматривать как неспецифическую защитно-приспособительную реакцию растений [3].

Исследование действия кадмия на ростовые показатели пшеницы выявило достаточно хорошо выраженную дозовую зависимость между концентрацией тяжелого металла и продолжительностью его воздействия, с одной стороны, и степенью ингибирования роста – с другой. В частности, при действии кадмия в концентрациях 100–700 мкМ полного ингибирования роста не наблюдалось, тогда как при 1000 и 2000 мкМ отмечено резкое его торможение, что указывает на повреждающий эффект этих концентраций. Эти данные согласуются с результатами изучения проницаемости мембран клеток листа пшеницы: кадмий в концентрациях 1000 и 2000 мкМ вызывал значительное увеличение выхода электролитов на 7-е сутки, а в концентрациях 100–500 мкМ не влиял на него.

В дальнейшем была проанализирована динамика выхода электролитов из клеток листа пшеницы при действии температуры 4°С и сульфата кадмия в концентрации 100 мкМ. В обоих случаях не выявлено существенных изменений в выходе из листьев электролитов на протяжении всего эксперимента (1–7 сут). Это свидетельствует о том, что при действии этих

стресс-факторов не происходит нарушения проницаемости мембран клеток листьев пшеницы, а, следовательно, и их повреждения. На основании полученных данных можно заключить, что растения пшеницы успешно адаптировались к действию низкой температуры (4°C) и кадмия (100 мкМ).

Как отмечалось выше, важную роль в повышении устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов играют низкомолекулярные антиоксиданты, в том числе глутатион. В связи с этим нами была проанализирована динамика накопления транскриптов гена глутатионсинтетазы. Установлено, что при температуре 4°C накопление транскриптов гена *GSI* происходит уже в начальный период ее действия (15 мин–1 ч), в дальнейшем (5 ч–7 сут) содержание мРНК сохранялось на повышенном уровне. В начальный период действия кадмия (100 мкМ) наблюдалось небольшое увеличение содержания транскриптов гена *GSI*, которое значительно возрастало через 2 сут. При еще более длительном воздействии металла отмечено некоторое снижение уровня транскриптов гена.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что повышение устойчивости пшеницы к действию низкой положительной температуры и кадмия связано с изменением экспрессии гена глутатионсинтетазы, что подтверждает важное значение глутатиона в неспецифических адаптивных реакциях на действие стресс-факторов разной природы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-31676 мол_а).

Литература

1. Чиркова Т.Ф. Физиологические основы устойчивости растений. СПб: Изд-во СПб. ун-та, 2002. 244 с.
2. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. К.: Основа, 2010. 352 с.
3. Трунова Т. И. Растения и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 54 с.

GLUTATHIONE SYNTHASE GENE EXPRESSION AND WHEAT PLANT TOLERANCE TO LOW TEMPERATURE AND CADMIUM

Repkina N.S., Talanova V.V., Titov A.F., Bukareva I.V.

low temperature, cadmium, wheat, tolerance, glutathione synthase

In our research was showed as less influence of low temperature and higher concentration of cadmium than more negative effect of them on growth of plants. In the same time the finishing of growth and changes in electrolyte leakage from plant cells wasn't found. The higher level of *GSI* gene expression was observed under influence of low temperature and cadmium it had been reported about it's role in tolerance of plants.

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ *ARABIDOPSIS THALIANA*
НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ КАРБОАНГИДРАЗ ХЛОРОПЛАСТОВ**
Руденко Н.Н., Игнатова Л.К., Ветошкина Д.В., Федорчук Т.П., Иванов Б.Н.

ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ул. Институтская, 2, г. Пущино
Московской обл., 142290, Россия, E-mail: rudenko_n@rambler.ru

хлоропласт, карбоангидраза, экспрессия генов

Введение

Карбоангидраза (КА) – фермент, катализирующий обратимую гидратацию углекислого газа. В высших растениях встречаются представители трех семейств КА: альфа, бета и гамма. КА, обнаруженная в листьях высших растений еще в 1939 г., оказалась стромальным ферментом [1]. Это – самый распространенный белок растительной клетки после Рубиско – был назван, согласно номенклатуре [2], бета-КА1. Несмотря на то, что фермент хорошо изучен, физиологическая роль его до сих пор неизвестна. Еще одна КА стромы, так называемая альфа-КА1, была обнаружена сравнительно недавно [3]. Методом встраивания гена зеленого флуоресцентного белка показано присутствие в хлоропластах арабидопсиса КА, названной бета-КА5 [2] и продукт гена *At4g20990*, альфа-КА4, был найден при проведении протеомного анализа белков тилакоидной мембраны [4]. Более точное местоположение бета-КА5 и альфа-КА4 еще предстоит выяснить. В представленной работе показано, что условия выращивания растений, оказывающие непосредственное влияние на фотосинтез (интенсивность света, концентрация углекислоты), вызывают изменение экспрессии генов КА хлоропластов. При этом нокаут генов КА оказывает влияние на параметры фотосинтеза и содержание в тилакоидах белков Lhcb1 и Lhcb2 светособирающего комплекса фотосистемы 2 (ССК2).

Материалы и методы

Объектом исследования были растения *Arabidopsis thaliana*, экотип Columbia (ДТ), и мутанты, нокаутированные по гену *At4g20990* (альфа-КА4-нокауты) выращенные при 19°C, концентрации CO₂, равной 450 ppm (атмосферной), и 80 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹, часть 28-дневных растений была помещена в условия повышенной интенсивности света, 360 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹ на 5 дней. Для экспериментов по определению влияния содержания CO₂ в атмосфере на экспрессию генов КА часть растений выращивали в течение 26 дней при 150 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹, при концентрации CO₂ в атмосфере 150 ppm, другую часть растений – при той же интенсивности света, но при 750 ppm CO₂. Измерение уровня экспрессии генов *At3g01500*, *At4g33580*, *At3g52720* и *At4g20990*, кодирующих бета-КА1, бета-КА5, альфа-КА1 и альфа-КА4, соответственно, проводили с помощью ПЦР в реальном времени. В качестве положительного контроля использовали праймеры к гену актина. Параметры фотосинтеза измеряли с помощью флуориметра Mini-PAM. Денатурирующий электрофорез белков тилакоидов был проведен в 13% полиакриламидном геле [5]. Вестерн-блот анализ проводили использованием антител к белкам ССК2, Lhcb1 и Lhcb2, и набора реагентов Bio-Rad.

Результаты и обсуждение

Были исследованы изменения в уровне экспрессии генов, кодирующих хлоропластные КА, под влиянием света высокой интенсивности (рис. 1) и в зависимости от концентрации углекислоты в атмосфере (рис. 2). Уровень экспрессии большинства генов КА возрастал в растениях арабидопсиса, выращенных при повышенном освещении (рис. 1а, в и г), что позволяет предполагать непосредственное или опосредованное участие бета-КА1, альфа-КА1 и альфа-КА4 в защите растения от окислительного стресса.

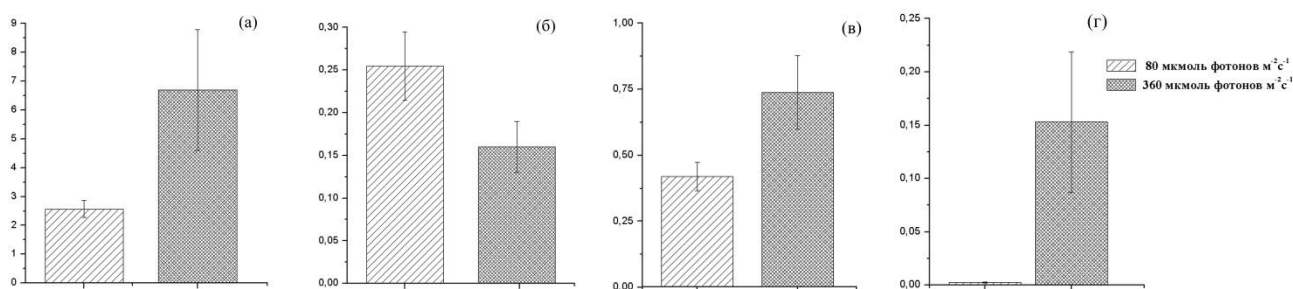


Рисунок 1 - Влияние интенсивности света при выращивании растений ($80 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$ и $360 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$) на уровень экспрессии генов, кодирующих бета-КА1 (а), бета-КА5 (б), альфа-КА1 (в) и альфа-КА4 (г). По оси ординат – уровень экспрессии, отн. ед.

Figure 1 - The effect of light intensity during plant growth ($80 \text{ μmol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and $360 \text{ μmol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) on the expression level of beta-CA1 (а), beta-CA5 (б), alfa-CA1 (в) and alfa-CA4 (г) genes. Y-axis shows the expression level, rel. un.

Уровень экспрессии гена, кодирующего бета-КА5, немного снижался при повышенной интенсивности света (рис. 1б), и был существенно выше при пониженной концентрации CO_2 , чем при повышенной (рис. 2б), что свидетельствует об участии этого фермента в фотосинтезе. Уровень экспрессии генов бета-КА1 и альфа-КА1 не изменялся при изменении концентрации CO_2 (рис. 2а, 2в), альфа-КА4 – повышался в 2,5 раза выше при увеличении концентрации CO_2 (рис. 2г).

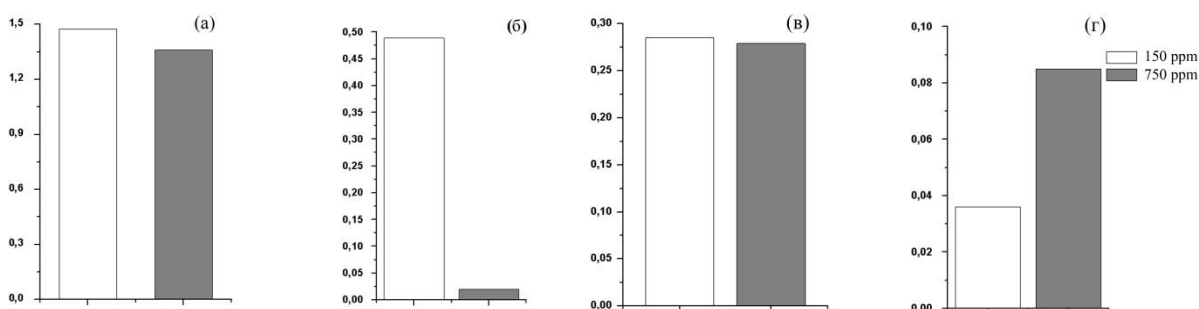


Рисунок 2 - Влияние пониженной (150 ppm) и повышенной (750 ppm) концентрации CO_2 на уровень экспрессии генов, кодирующих бета-КА1 (а), бета-КА5 (б), альфа-КА1 (в) и альфа-КА4 (г). По оси ординат – уровень экспрессии, отн. ед.

Figure 2 - The effect of the low (150 ppm) and high (750 ppm) CO_2 concentration on the expression level of beta-CA1 (а), beta-CA5 (б), alfa-CA1 (в) and alfa-CA4 (г) genes. Y-axis shows the expression level, rel. un.

Эти данные указывают на особое значение альфа-КА4 для растений в современном мире, поскольку концентрация CO_2 в атмосфере неуклонно возрастает. Несмотря на довольно низкий уровень экспрессии, нокаут гена, кодирующего альфа-КА4, приводил существенному накоплению в листьях большого количества крахмала по сравнению с растениями ДТ. Квантовый выход ФС2, измеренный при высокой концентрации CO_2 в атмосфере и при повышенном освещении, был выше у альфа-КА4-нокаута, что свидетельствует о том, что в мутанте более активно протекают процессы, связанные с потреблением восстановительных эквивалентов АТФ и НАДФН. При отсутствии этой КА в мутанте на высоком свете происходило избыточное образование протонов, что отражалось на увеличении параметра q_c нефотохимического тушения. Более низкое значение параметров нефотохимического тушения q_i и более высокое – q_j у альфа-КА4-нокаутов свидетельствует о том, что в листьях мутантов хуже работает система защиты фотосинтетического аппарата от фотоповреждения. На это указывают и данные вестерн-блот анализа - количество белков ССК2, как Lhcb1, так и Lhcb2, в ли-

стях альфа-КА4-нокаутов (рис. 3а, 3; 3б, 3) было больше, чем таковых в листьях ДТ (рис. 3а, 1; 3б, 1), выращенных при низкой интенсивности света. При высокой интенсивности света в листьях альфа-КА4-нокаутов содержание обоих белков ССК2 (рис. 3а, 4 и 3б, 4) снижалось незначительно, по сравнению с таковыми в листьях растений ДТ (рис. 3а, 2 и 3б, 2). Как известно, растения приспособляются к высокой интенсивности света, уменьшая размер антенны ССК2. По-видимому, альфа-КА4 участвует в адаптации растений к изменению интенсивности света.



Рисунок 3 - Результат вестерн-блот анализа с антителами к Lhcb1 (а) и Lhcb2 (б) белков тилакоидов, выделенных из листьев арабидопсиса ДТ (1, 2) и альфа-КА4-нокаутов (3, 4), выращенных при интенсивности света 80 мкмоль фотонов $m^{-2}s^{-1}$ (1, 3) и 360 мкмоль фотонов $m^{-2}s^{-1}$ (2, 4)

Figure 3 - The result of western-blot analysis of thylakoid proteins from arabidopsis leaves of the wild type plants (1, 2) and alfa-CA4 knockouts (3, 4) with antibodies against Lhcb1 (а) и Lhcb2 (б). The plants were grown at 80 $\mu\text{mol photons } m^{-2}s^{-1}$ (1, 3) and 360 $\mu\text{mol photons } m^{-2}s^{-1}$ (2, 4)

Заключение

Таким образом, исследованные КА хлоропластов по-разному реагируют на изменения условий выращивания, что свидетельствует о различиях их физиологической роли в высших растениях.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №14-04-323-23.

Литература

1. Neish A.C. Chloroplasts. II. Their chemical composition and the distribution of certain metabolites between the chloroplasts and the remainder of the leaf // *Biochemistry J.*, 1939, 33, 300-8.
2. Fabre N., Reiter I.M., Becuwe-Linkan N., Genty B., Rumeau D. Characterization and expression analysis of genes encoding a and b carbonic anhydrases in *Arabidopsis* // *Plant, Cell and Environment*, 2007, 30, 617-629.
3. Villarejo A., Buren S., Larsson S., Dejardin A., Monne M., Rudhe Ch., Karlsson J., Jansson S., Lerouge P., Rolland N., von Heijne G., Grebe M., Bako L., Samuelsson G. Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast // *Nature cell biology*, 2005, 7, 1224-1231.
4. Friso G., Giacomelli L., Ytterberg A.J., Peltier J.-B., Rudella A., Sun Q., van Wijka K.J. In-Depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts // *The Plant Cell*, 2004, 16, 478-499.
5. Schagger H., Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // *Anal. Biochem.*, 1987, 166, 368-379.

THE EFFECT OF *ARABIDOPSIS THALIANA* GROWTH CONDITIONS ON THE EXPRESSION LEVEL OF THE CHLOROPLAST CARBONIC ANHYDRASES

Rudenko N.N., Ignatova L.K., Vetoshkina D.V., Fedorchuk T.P., Ivanov B.N.

chloroplasts, carbonic anhydrase, gene expression

The present study shows that the expression levels of the genes of chloroplast carbonic anhydrases (CA) depend on *A. thaliana* growth conditions those are important for photosynthesis (light intensity, CO₂ concentration). From the other hand, the knockout of CA genes had the effect on photosynthesis parameters and the content of the proteins of light-harvesting complex of photosystem II. The data show that chloroplast CAs have different functions in higher plant cells.

**ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА РАННИЕ СТАДИИ ФОРМИРОВАНИЯ
КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ У ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ**

Салмин С.А.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет», ул. Комсомольская, 95,
г. Орёл, 302026, Россия, E-mail: gio2-74@mail.ru*кукуруза, боковые корни, примордии, регуляторы роста*

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 сут. 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, α -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.) [1]. Для характеристики действия ингибиторов на рост главного корня вычисляли степень ингибирования роста (I) в процентах от контроля.

Для подсчёта числа примордиев боковых корней внутри материнского корня фиксировали корни целиком через 72 ч после начала опыта в фиксаторе Чемберлена [2]. Фиксированный материал промывали в дистиллированной воде 5 мин, гидролизировали в 5N HCl 15 мин, снова промывали в дистиллированной воде 5 мин, затем окрашивали в ацетокармине 15 мин (Jensen, 1962). После этого под бинокулярным микроскопом МБ-51-2 с помощью двух препаровальных игл удаляли всю корневую часть и проводили подсчёт примордиев. Измеряли длину клеток перицикла в первых трёх базальных сантиметрах на центральных продольных срезах живых корней, сделанных от руки лезвием бритвы. Измерения проводили при помощи окулярного микрометра МОВ-1-15 под микроскопом Р-12.

Статистическая обработка результатов проводилась по общепринятой методике [3]. Анализ результатов и построение графиков выполнялись с помощью программ Microsoft Excel 7.0.

Ветвление корней проростков кукурузы типично для корней большинства изученных растений. Примордии закладываются в акропетальной последовательности – от семени к кончику корня,

и в такой же последовательности появляются боковые корни. Рост корней в контрольном варианте в течение трёх дней постепенно ускорялся.

Первые боковые корни появлялись на 2-е сут. после начала опыта. Через 48ч от момента начала опыта длина главного корня составила $107,6 \pm 1,9$ мм, а длина зоны боковых корней – $27,0 \pm 1,5$. Через 72ч соответственно $152,8 \pm 3,1$ и $53,9 \pm 1,6$ мм. Чем длиннее был корень, тем длиннее была зона боковых корней. Среднее время формирования бокового корня внутри материнского составило $50,8 \pm 1,4$ ч. На одном корне образовывалось $44,7 \pm 1,4$ корня. Максимальное число боковых корней формировалось в 1-м см корня, а затем их число снижается. Анатомический анализ показал, что среди боковых корней не было примордиев новых боковых корней.

Измерение размеров клеток перицикла показало, что их длина увеличивается в базальной части корня, значит, что число клеток на один сантиметр уменьшается, при большем числе образующихся боковых корней. Следовательно, большее число клеток участвует в образовании боковых корней.

Выращивание проростков кукурузы на растворах ауксинов показало, что ауксины заметно влияют на ветвление корня при концентрациях выше 10^{-7} М. Однако эти концентрации ауксинов ингибируют рост главного корня вплоть до его прекращения. Ветвление корней кукурузы при обработке разными ауксинами изменялось по-разному. ИУК вызывала незначительное повышение плотности ветвления на первых двух отрезках и резкое снижение – на последующих. Воздействие НУК, напротив, почти не меняло плотности ветвления на первых двух отрезках главного корня, но вызывало увеличение плотности ветвления на следующих двух отрезках и далее уменьшение числа боковых корней. Следует отметить, что корни проростков кукурузы на момент начала воздействия имели длину 20-30 мм и содержали зачатки боковых корней, следовательно, увеличение плотности ветвления происходило на новых участках корня, где закладывались примордии.

Цитокинины при использованных концентрациях сильно ингибировали рост и ветвление главного корня. 6-БАП резко снижал скорость роста корня во всех испытанных концентрациях и независимо от исходной длины корней. При концентрации 10^{-5} М происходила полная остановка роста. По мере снижения концентрации ингибирующий эффект снижался и суммарный прирост при концентрации 10^{-9} М составил $43,5 \pm 2,5$ мм. Среднее время формирования бокового корня составило у контрольных корней $50,8 \pm 1,4$ ч. 6-БАП не повлиял на время формирования бокового корня. Первые боковые корни появлялись на 2-е сут. после начала опыта. На одном контрольном корне образовывалось $44,7 \pm 1,4$ корня против 10 корней при обработке. Число боковых корней не зависит от длины корня, но зависит от длины зоны боковых корней. Максимальное число боковых корней было в 1-м сантиметровом отрезке корней, где они были заложены до начала опыта, а затем их число снижается, но даже в 1-м отрезке число корней при обработке не превышало контрольный вариант. Анатомический анализ показал, что среди боковых корней не было примордиев новых боковых корней.

Образование значительного числа примордиев и боковых корней на небольшом отрезке главного корня кукурузы при воздействии НУК объяснить пока не удалось. Можно предположить, что клетки перицикла способны к образованию боковых корней только в определённый период времени, когда они находятся на небольшом расстоянии от растущего кончика корня, так как достоверное повышение плотности ветвления наблюдалось лишь на тех участках, где в начальный момент воздействия происходило заложение примордиев. Но ИУК не вызывает значительного увеличения числа боковых корней. Возможно, разное действие природного и синтетического ауксинов на ветвление объясняется их разной устойчивостью в тканях корня [4], однако этот вопрос требует дополнительного исследования.

АБК значительно ингибирует рост главного корня во всех испытанных концентрациях. В течение опыта ингибирующий эффект в разных вариантах проявлялся по-разному. Рост главного корня при обработке АБК 10^{-5} М в первые сут. ингибируется на 76%, затем ингибирующее действие ослабевает до 64% и вновь возрастает до 83% через 72ч после начала опыта. При обработке 10^{-6} М ингибирующее действие усиливается на вторые сут. опыта, а к его окончанию снижается до 58%. В варианте с АБК 10^{-7} М ингибирующий эффект постепенно ослабевает и в конце опыта достигает 18

% от контроля. АБК в значительной степени подавляла образование боковых корней даже в наиболее старых участках корня. По сравнению с контролем боковых корней образовывалось меньше на 50%. Длина зоны боковых корней сокращалась в соответствии с уменьшением длины главного корня. АБК не оказывает стимулирующего действия на рост главного корня, а только ингибирует его. АБК также всегда ингибирует образование боковых корней, но на ранних этапах ингибирующее действие проявляется сильнее.

Во всех вариантах опыта время формирования боковых корней внутри материнского не отличалось от контроля. Таким образом, развитие примордия бокового корня оказывается весьма устойчивым к действию изученных веществ.

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.

Литература

1. Ivanov V.B. Root growth responses to chemicals // Sov. Scient. Rev. Ser. D. 1994. P. 1-70.
2. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: "Колос". – 1970, 255 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. -2-е изд., перераб.- М.: Высш.школа, 1973.-343с.
4. Полевой В.В. Фитогормоны. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. 248 с.

INFLUENCE THE REGULATION GROWTH FOR EARLY STAGES FORMATION OF THE ROOT SISTEM OF THE MAIZE SEEDLINGS

Salmin S.A.

maize, lateral roots, primordia, growth regulation

The formations of lateral roots under the influence of growth regulation were studied with germs of corn. All corn primordiums develop into the lateral roots without dormancy period. Sinthetic auxin stimulates the development of additional primordiums in root zone, where primordiums are forming after the disturbance. It is shown that the time of primordium development does not change under growth regulation influence. Apparently, the development of a primordium into a lateral root proceeds in two stages and they have different regulation.

ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ ЦИТОКИНИНОВ В КЛЕТКАХ КАЛЛУСОВ ПШЕНИЦЫ НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ ОРГАНОГЕНЕЗА *IN VITRO*

Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю., Круглова Н.Н.

ФГБУН Институт биологии УНЦ РАН, пр. Октября, 69, г. Уфа, 450054, Россия,
E-mail: kruglova@anrb.ru

Triticum aestivum L., каллус, органогенез, иммунолокализация, цитокинины

Введение

Органогенез как частный случай морфогенеза – совокупности протекающих в развивающемся организме процессов дифференциации клеток с образованием специализированных тканей и органов [1], остается одной из сложнейших проблем биологии развития растений. Важнейшая задача в этой области – выявление связи между процессами, контролирующими развитие органов на клеточном и организменном уровнях. Анализ экспериментальных данных и теоретических обобщений в области культуры *in vitro* растений дает возможность предложить модельный подход к исследованию органогенеза у растений. Удобной моделью в этом отношении может служить каллус [2].

Механизмы, контролирующие развитие клеток каллусов по конкретному пути морфогенеза *in vitro*, до настоящего времени окончательно не выяснены. Установлено, в частности, что основными координаторами процессов органогенеза *in vitro* являются фитогормоны [1-3]. Сформировалось представление о том, что характер деления и дифференциации клеток, определяющий формирование органов растений, зависит от концентрации фитогормонов в этих клетках [4, 5]. Однако неизвестно, существуют ли какие-то особенности в распределении и накоплении фитогормонов, в том числе цитокининов, в тех клетках недифференцированного каллуса *in vitro*, из которых в дальнейшем сформируются побеги или корни. В связи с этим цель данной работы состояла в выявлении локализации эндогенных цитокининов в каллусах пшеницы на начальных этапах органогенеза *in vitro*.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужил сорт яровой мягкой пшеницы Башкирская 26. Морфогенные каллусы из незрелых зародышей получали и культивировали согласно [6].

Подготовку растительного материала для иммунолокализации цитокининов и иммунное окрашивание проводили согласно [7]. Срезы каллусов получали с помощью ротационного микротомы HM-325 (Microm, Germany). Для цито-гистологического анализа срезы окрашивали толуидиновым синим по [8]. Препараты анализировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Germany).

Результаты и обсуждение

Формирование морфогенных каллусов при культивировании *in vitro* незрелых зародышей наблюдали на 5–7 сут. На начальных этапах развития каллусов (10 сут культивирования *in vitro*) выявлено интенсивное иммунное окрашивание в группах клеток, которые по данным цито-гистологического анализа представляли собой морфогенетические очаги. Клетки, составляющие морфогенетические очаги, характеризуются как меристематические [9]. Хорошо известно, что цитокинины контролируют деление клеток (вместе с ауксинами), а также повышают аттрагирующую способность, как правило, характерную именно для меристематических клеток [3]. Таким образом, локализация цитокининов, обнаруживаемая именно в клетках морфогенетических очагов, логична и ожидаема.

К 14–15 сут культивирования *in vitro* первоначально однородные морфогенетические очаги становились трехслойными и состояли из центральной зоны слабовакуолизованных клеток, промежуточной зоны меристематических клеток и периферической зоны сильновакуолизованных клеток. Иммунное окрашивание выявило локализацию цитокининов в цен-

тральной и промежуточной зонах, при этом окрашивание клеток центральной зоны было относительно слабым. Имеются данные о влиянии цитокининов на процессы дифференциации клеток [10], поэтому низкая интенсивность иммунного окрашивания клеток центральной зоны морфогенетического очага, возможно, являлась индикатором их дифференцированного состояния как паренхиматозных клеток. В то же время интенсивное окрашивание клеток промежуточной зоны подтверждало их меристематический статус.

К 24–26 сут культивирования *in vitro* морфогенетические очаги преобразовывались в меристематическую зону. При этом морфогенетические очаги увеличивались в размерах за счет делений клеток промежуточной зоны; клетки периферической зоны подвергались постепенной деструкции, а под слоем дегенерирующих клеток оформлялась зона, ориентированная параллельно поверхности каллуса. Ранее нами было установлено, что с деятельностью клеток меристематической зоны связана реализация различных путей морфогенеза *in vitro* (в том числе и органогенеза) в каллусах пшеницы разного происхождения [2, 6, 9].

Локализация цитокининов была выявлена именно в меристематической зоне, при этом иммунное окрашивание было равномерным и интенсивным во всех клетках. Это еще раз свидетельствует о потенциале клеток меристематической зоны к дальнейшему морфогенезу *in vitro*. Кроме того, свойство цитокининов повышать способность клеток аккумулировать питательные вещества за счет их транспорта из других тканей [3] может способствовать дальнейшему развитию каллусных клеток по различным путям морфогенеза *in vitro*. Установлено, что при органогенезе *in vitro* в каллусе формирование почек происходило экзогенно – в участках меристематической зоны, вышедших на поверхность каллуса, а формирование корней – эндогенно, в участках меристематической зоны, еще покрытых слоями разрушающихся поверхностных клеток. При этом почки формировались в верхней части каллусов, а корни – в нижней, обращенной к поверхности питательной среды. Иммунное окрашивание наблюдалось и в клетках формирующихся примордиев почек (на 30–32 сут культивирования *in vitro*), и в клетках формирующихся корневых меристем (на 35–38 сут культивирования *in vitro*).

Согласно имеющимся данным [11, 12], ауксины необходимы для формирования корней, а цитокинины – побегов. При этом цитокинины рассматриваются как положительный регулятор роста побега, но отрицательный регулятор роста корня [3]. Однако полученные нами данные позволяют предположить, что цитокинины необходимы и для развития корня. Это согласуется с данными по изучению роли цитокининов в развитии корня в естественных условиях [13–15].

Заключение

Полученные нами данные о иммунолокализации эндогенных цитокининов в клетках морфогенетических очагов и меристематических зон зародышевых каллусов пшеницы, а также в примордиях формирующихся органов свидетельствуют об участии этих гормонов в индукции и регуляции формирования почек и корней с самых ранних этапов органогенеза *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации по программе «Ведущие научные школы России» (2014–2015 гг., № НШ-5282.2014.4, лидер – член-корр. РАН Т.Б. Батыгина).

Литература

1. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Круглова, Н.Н. Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения / Н.Н. Круглова // Известия Уфимского НЦ РАН. – 2011. – № 2. – С. 32–35.
3. Медведев, С.С., Биология развития растений. Т. 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны / С.С. Медведев, Е.И. Шарова. – СПб., 2011. – 253 с.
4. Cheng, Z.J. Pattern of Auxin and Cytokinin Responses for Shoot Meristem Induction Results from the Regulation of Cytokinin Biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3 /

- Z.J.Cheng [et al.] // Plant Physiol. – 2013. – V. 161. – № 1. – P. 240–251.
5. Kakani, A. Role of AUX1 in the control of organ identity during *in vitro* organogenesis and in mediating tissue specific auxin and cytokinin interaction in *Arabidopsis* / A. Kakani, G. Li, Z. Peng // Planta. – 2009. – V. 229. – № 3. – P. 645–657.
6. Круглова, Н.Н. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цито-гистологические аспекты / Н.Н. Круглова, О.А. Сельдиминова. – Уфа: Гилем, 2011. – 124 с.
7. Веселов, С.Ю. Содержание и локализация цитокининов в листьях исходных и трансгенных растений табака / С.Ю. Веселов [и др.] // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – № 1. – С. 34–40.
8. Круглова, Н.Н. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Н.Н.Круглова [и др.]. – Уфа: Гилем, 2013. – 128 с.
9. Сельдиминова, О.А. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллюсах различного происхождения у пшеницы / О.А. Сельдиминова, А.А. Катасонова, Н.Н. Круглова // Физиология и биохимия культ. растений. – 2011. – Т. 43. – № 4. – С. 297–306.
10. Dello Ioio, R. Genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem / R. Dello Ioio [et al.] // Science. – 2008. – V. 322. – № 5906. – P. 1380–1384.
11. Brenner, W.G. Transcript profiling of cytokinin action in *Arabidopsis* roots and shoots discovers largely similar but also organ-specific responses / W.G. Brenner, T. Schmulling // BMC Plant Biol. – 2012. – V. 12. – № 1. – P. 112–142.
12. Yoshida, S. Auxin regulation of embryonic root formation / S. Yoshida, S. Saiga, D. Weijers // Plant Cell Physiol. – 2013. – V. 54. – № 3. – P. 325–332.
13. Высоцкая, Л.Б. Содержание цитокининов в клетках разных зон корней пшеницы / Л.Б. Высоцкая [и др.] // Цитология. – 2011. – Т. 53. – № 11. – С. 884–890.
14. Gupta, S. Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant / S.Gupta, A.M.Rashotte // Plant Cell Rep. – 2012. – V. 31. – № 5. – P. 801–812.
15. Zhao, Y. The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development / Y.Zhao // Curr. Opin. Plant Biol. – 2008. – V.11. – № 1. – P. 16–22.

IMMUNOLocalIZATION OF CYTOKININS IN CELLS OF WHEAT CALLI DURING INITIAL STAGES OF ORGANOGENESIS *IN VITRO*

Seldimirova O.A., Zaytsev D.Yu., Kruglova N.N.

Triticum aestivum L., callus, organogenesis, immunolocalization, cytokinins

The obtained data on endogenous cytokinins immunolocalization in cells of morphogenetic centers and meristematic zones of wheat calli of embryo origin, and also in the primordia of forming in them organs testify to participation of these phytohormones in induction and regulation of formation of shoots and roots from the earliest stages of organogenesis *in vitro*.

**ЦИРКАДНЫЕ И УЛЬТРАДИАННЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ РИТМЫ
ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ДИАЗОТРОФНОЙ ЦИАНОБАКТЕРИИ
*CYANOTHECE SP. ATCC 51142***

Синетова М.А., Червены Я., Валледор Л., Шерман, Л., Маркелова А.Г., Недбал Л.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН Ботаническая ул., 35,
г. Москва, 127276, Россия

Центр изучения глобальных изменений, АН Чешской республики, г. Драсов, 664 24,
Чешская Республика, E-mail: maria.sinetova@mail.ru

Cyanothece, метаболические ритмы, циркадные ритмы, фиксация азота

Дiazотрофная одноклеточная цианобактерия *Cyanothece sp. ATCC 51142* (далее *Cyanothece*) способна осуществлять взаимоисключающие процессы фотосинтеза и фиксации азота, разделяя их во времени. Такое разделение метаболических процессов может регулироваться циркадными часами или иной клеточной программой, ограничивающей во времени один метаболический процесс от другого, не совместимого с ним. Нами было показано наличие у *Cyanothece* ультрадианных (с периодом меньше суток) метаболических ритмов в условиях роста на среде без азота при высоком содержании углекислоты (0,5%) и постоянном освещении с интенсивностью, насыщающей фотосинтез (свыше 110 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹). Было показано, что метаболический цикл состоит из двух фаз – фотосинтеза и фиксации азота. Во время фотосинтетической фазы фиксированный углерод запасается в основном в виде гликогена, так как из-за недостатка азота синтез белка ограничен. Затем клетки переходят к фазе фиксации азота – интенсивность фотосинтеза значительно снижается, а дыхание, наоборот, возрастает. Таким образом, концентрация токсичного для нитрогеназы кислорода снижается и в клетках, и в среде. В качестве субстрата для дыхания используется запасенный гликоген. После накопления необходимого количества АТФ и НАДФН активизируется нитрогеназа, клетки фиксируют атмосферный азот, необходимый для дальнейшего роста. После расходования запасов гликогена клетки возвращаются к фазе фотосинтеза. Ультрадианный метаболический цикл был выражен в периодических изменениях скорости выделения и поглощения кислорода, поглощения углекислоты, рН, флуоресценции пигментов, содержания гликогена, оптической плотности суспензии, процента делящихся клеток. Были показаны также периодические изменения в содержании транскриптов генов железосодержащего белка нитрогеназы *nifH* и белка, отвечающего за синтез Fe-Mo кофактора нитрогеназы *nifB*.

В данной работе была впервые подтверждена независимость циркадных ритмов *Cyanothece sp. ATCC 51142* от температуры. В отличие от циркадных ритмов для ультрадианного ритма была показана зависимость периода метаболического цикла от температуры: от 17 ч при 27°C до 9 ч при 39°C. Период ультрадианного ритма зависит также от освещения – при увеличении освещения амплитуда изменений концентрации растворенного в среде кислорода возрастает, при снижении освещения ниже уровня, насыщающего фотосинтез, период метаболического ритма изменялся с ультрадианного на циркадный. Аналогичная смена ритма происходила при возрастании плотности культуры. На период ультрадианного ритма влияет также содержание углекислоты в подаваемой воздушной смеси: ультрадианный ритм проявляется при насыщающих фотосинтез концентрациях углекислоты от 700 ppm, при этом его период уменьшается с ростом концентрации CO₂, достигая минимума при 5000 ppm, и затем не меняется до 20000 ppm. Из полученных результатов следует, что период ультрадианного ритма зависит не от скорости роста, а от интенсивности процесса фотосинтеза.

Мы предполагаем, что обнаруженный ультрадианный метаболический цикл *Cyanothece* дополняет уже известные циркадные часы в регуляции метаболизма, в частности в регуляции смены фотосинтетической и дыхательной фаз. Ультрадианный метаболический цикл может

отражать реальное метаболическое состояние клетки, зависящее от температуры окружающей среды, интенсивности освещения, доступности CO₂.

Литература

1. Cerveny J., Sinetova M.A., Valledor L., Sherman L.A., Nedbal L. Ultradian metabolic rhythm in the diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142 //Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013, 110(32):13210-13215.

CIRCADIAN AND ULTRADIAN METABOLIC RHYTHMS IN UNICELLULAR NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIUM *CYANOTHECE* SP. ATCC 51142

Sinetova M.A., Cerveny J., Valledor L., Sherman L., Markelova A.G., Nedbal L.

Cyanothece, metabolic rhythm, circadian rhythm, nitrogen fixation

Under continuous high irradiance and in high CO₂ concentration cells of *Cyanothece* 51142 are capable to alternate nitrogen fixation and photosynthesis with temperature-dependent ultradian periodicity. The ultradian metabolic cycle was expressed by rhythmical changes of net O₂ evolution, CO₂ uptake, pH, fluorescence emission, glycogen content, cell division, gene expression and in nitrogenase activities.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМАЛЕММНОЙ H^+ -АТФазы В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ КОНСКОГО КАШТАНА

Синькевич И.А., Литягина С.В., Обручева Н.В.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35,
г. Москва, 127276, Россия, E-mail: obroucheva@ippras.ru

конский каштан, прорастание семян, рост растяжением, плазмалеммная H^+ -АТФаза, 14-3-3 белок, фузикоцин

Введение

Прорастание семян конского каштана *Aesculus hippocastanum* L. осуществляется за счет растяжения клеток зародышевой оси. Известно, что растяжение клеток происходит по механизму так называемого “кислого роста”, в основе которого лежит разрыхление полимеров клеточных оболочек в результате подкисления их ионами водорода, выделяемыми ферментом H^+ -АТФазой (протонной АТФазой) (КФ 3.6.3.6), -- трансмембранным белком, локализованным в плазмалемме клеток. Протонная АТФаза использует гидролиз АТФ как источник энергии для переноса H^+ ионов из цитоплазмы через плазмалемму в клеточные оболочки в обмен на транспортируемые в клетку ионы K^+ .

Целью данной работы было исследовать активность H^+ -АТФазы в прорастающих семенах каштана, а также возможные пути ее регуляции.

Материалы и методы

Семена каштана после холодной стратификации выходили из состояния покоя и прорастали в течение 1-2 дней в оптимальных условиях температуры ($27^{\circ}C$) и водоснабжения.

Гидролитическую активность ванадат-чувствительной H^+ -АТФазы определяли в соответствии с Janicka-Russak M. (2012). Активность фермента представляла собой разницу между вариантами в отсутствие и в присутствии $200 \text{ мкМ } Na_3VO_4$.

Активность протонной АТФазы измеряли по подкислению наружного раствора рН-метром в выделенных из семян зародышевых осях в присутствии $1 \text{ мМ } KCl$ (контроль). В опыте зародышевые оси помещали в чашки Петри в раствор ингибитора $5 \times 10^{-3} \text{ М}$ ортованадата в 5 мМ Mes-буфере, рН 5,5-6,5 или 10^{-6} М ИУК в оптимальные условия ($27^{\circ}C$ в темноте), после чего измеряли степень подкисления наружного раствора. Наличие белков H^+ -АТФазы и 14-3-3 определяли при помощи иммунохимического анализа фракции микросом из осевых органов. Вестерн-блот-анализ проводили с антителами против H^+ -АТФазы плазмалеммы (Agrisera, Швеция), антителами против 14-3-3 белков (K-19) (Santa Cruz Biotechnology, США) и антителами против фосфотреонина (Sigma, США).

Результаты и обсуждение

В микросомальных фракциях выделенных из осевых органов на разных этапах прорастания определяли активность плазмалеммной H^+ -АТФазы по ее способности гидролизовать АТФ (рис. 1). Обнаружено существенное возрастание гидролитической активности у проклюнувшихся (в 2,5 раза) и растущих растяжением осевых органов (в 3,5 раза) по сравнению с непроклюнувшимися. Эти данные полностью соответствуют данным по активации фермента, полученным при измерении способности фермента выделять протоны (рис. 2). Осевые органы из непроклюнувшихся семян подкисляют окружающий раствор очень слабо, осевые органы из проклюнувшихся и растущих семян (длиной до 2 см) подкисляли окружающий раствор значительно сильнее. Способность выделять протоны полностью ингибировалась ортованадатом. Следовательно, на рис. 2 представлена активность ванадат-чувствительной плазмалеммной H^+ -АТФазы которая резко активизируется в растягивающихся клетках зародышевой оси.

При прорастании активируется H^+ -АТФаза, уже имевшаяся в осевых органах зрелых семян, вероятно в результате активации самоингибированной формы. О присутствии белка H^+ -АТФазы в плазмалемме мы судили с помощью вестерн-блот анализа белков фракции микросом с помощью иммунохимического метода. Показано присутствие H^+ -АТФазы плазмалеммы в осевых органах зрелых семян во время набухания, при наклевывании, то есть при инициации роста растяжением, а также во время дальнейшего роста клеток растяжением, причем доля этого белка в белке микросом практически не меняется.

Вопрос о путях активации фермента достаточно сложен. Ожидавшейся активации с помощью ИУК не происходит (рис. 2). Известно, что активность H^+ -АТФазы плазмалеммы могут регулировать 14-3-3 белки, которые у других растительных объектов активируют

С-концевой домен молекулы H^+ -АТФазы, взаимодействуя с остатком треонина, что обеспечивает фосфорилирование и активацию фермента [4]. Как показано иммунохимически, 14-3-3 белки присутствовали в тех же препаратах микросомальных белков, что и H^+ -АТФаза, а именно: в набухающих, начинающих расти и растущих зародышевых осях каштана. Таким образом, белки 14-3-3 могут участвовать в активации фермента. Однако фосфорилирования треонина, необходимого для связывания 14-3-3 с ферментом нам обнаружить, пока не удалось. Не исключено, что в нашем объекте активация происходит путем фосфорилирования серина.

В любом случае, в активации плазмалеммной H^+ -АТФазы в осевых органах- каштана участвует фузикоцин [1], который усиливает и стабилизирует активность комплекса 14-3-3 белок- H^+ -АТФаза [4]. Возможность участия эндогенного фузикоцина в активации фермента следует из накопления фузикоцин-подобных лигандов в осевых органах каштана перед прорастанием [2,3].

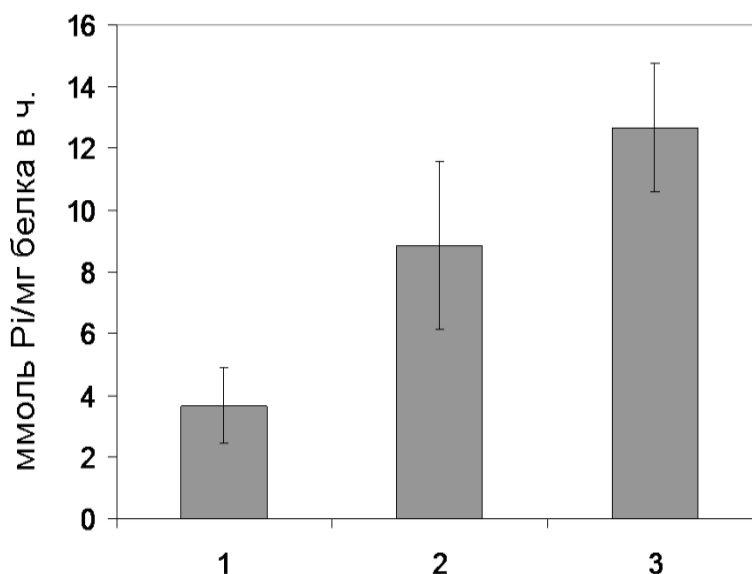


Рисунок 1 - Активность плазмалеммной H^+ -АТФазы по гидролизу АТФ в зародышевых осях прорастающих семян. На оси ординат ммоль P_i /мг белка в ч. 1 - при набухании. 2 - при инициации роста. 3 - при росте зародышевой оси растяжением

Figure 1 - Activity of plasmalemma H^+ -ATPase in terms of ATP hydrolysis in embryo axes of germinating seeds. The ordinate – mMPi/(mg protein×h). 1 - at imbibition; 2 - – at growth initiation; 3 - in embryo axes growing by cell elongation

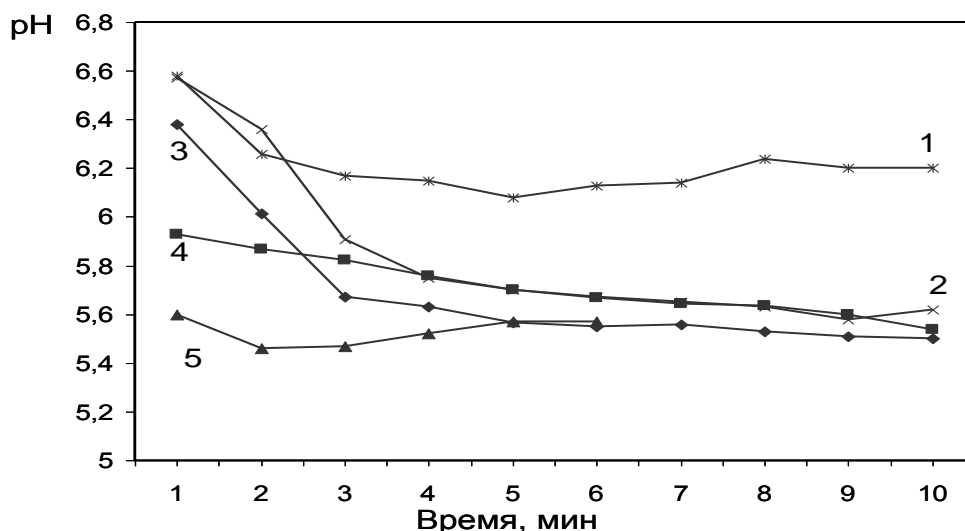


Рисунок 2 - Подкисляющая способность зародышевых осей при прорастании: 1 - при набухании; 2 - при инициации роста; 3 - при росте осевых органов; 4 - обработка растущих осевых органов ИУК; 5 - обработка ванадатом при инициации роста

Figure 2 - Acidifying capacity of embryo axes during germination: 1 - at imbibition; 2 - at growth initiation; 3 - in growing embryo axes; 4 - IAA, growing embryo axes; 5 - vanadate, at growth initiation

Литература

1. Обручева Н.В., Синькевич И.А., Литягина С.В., Новикова Г.В. Активация “кислого” роста в прорастающих семенах конского каштана // Физиология растений, 2013. Т. 60. С. 452-456.
2. Антипова О.В., Бартова Л.М., Вобликова В.Д., Калашникова Т.С., Муромцев Г.С., Обручева Н.В. Фузикоцин-подобные лиганды в осевых органах конского каштана // Физиология растений, 1999. Т. 46. С. 29-33.
3. Antipova O.V., Bartova L.M., Kalashnikova T.S., Obroucheva N.V., Voblikova V.D., Muromtsev G.S. Fusicoccin-induced cell elongation and endogenous fusicoccin-like ligands in germinating seeds // Plant Physiol. Biochem. 2003. V. 41. P. 157-164.
4. Camoni L., Visconti S., Aducci P. The phytotoxin fusicoccin : a selective stabilizer of 14-3-3 interaction?// IUBMB Life, 2003. V. 65. P. 513-517.
5. Janicka-Russak M., Kabala K., Wdowikowska A., Klobus G. Response of plasma membrane H^+ ATPase to low temperature in cucumber roots// J Plant Res. 2012. V.125. P. 291-300.

CHARACTERIZATION OF PLASMALEMMA H^+ -ATPase IN GERMINATING HORSE CHESTNUT SEEDS

Sinkevich I.A., Lityagina S.V., Obroucheva N.V.

horse chestnut, seed germination, cell elongation, plasmalemma H^+ -ATPase, protein 14-3-3, fusicoccin

The paper describes activation of plasmalemma H^+ -ATPase in the course of cell elongation in germinating seeds. Proton excretion is vanadate-sensitive, but IAA-insensitive. Embryo axes of mature, imbibing and germinating horse chestnut seeds contain the enzyme and 14-3-3 proteins, as well as fusicoccin-like ligands, the interaction of which can provide the enzyme activation.

**МЕЛАТОНИН–ЗАВИСИМЫЙ РОСТ ПРОРОСТКОВ
ARABIDOPSIS THALIANA (L.) HEYNH. НА СЕЛЕКТИВНОМ СВЕТУ**

Соловьева Е.В., Головацкая И.Ф.

ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»,
пр. Ленина, 36, г. Томск, 634050, Россия, E-mail: CaterinaSoloveva@gmail.com*Arabidopsis thaliana*, мелатонин, синий свет, зеленый свет, красный свет

В настоящее время существует большое количество работ, показывающих присутствие мелатонина в различных органах растений, таких как корень, стебель, лист, цветок, плод и семя. Содержание мелатонина в растениях очень сильно варьирует от $9,5 \pm 3,2$ у вида *Asparagus officinalis* (спаржа обыкновенная) до $5288,1 \pm 368,3$ пг/г ткани у вида *Festuca aurundinacea* (овсяница тростниковая), что усложняет интерпретацию функций этого вещества в растении. Уже известны некоторые аспекты физиологической роли мелатонина в растении, в том числе влияние на цветение *Chenopodium rubrum*, жизнеспособность клеток *Daucus carota* при холодовом стрессе, толерантность водного гиацинта (*Eichhornia crassipes*) при воздействии токсичными органическими веществами и тяжелыми металлами [1–3].

В связи с тем, что мелатонин является гормоном сна человека, встает вопрос о динамике его эндогенного уровня в растении на свету. К настоящему времени показано, что содержание мелатонина изменяется в растениях, подверженных воздействию селективного света и высоких доз ультрафиолетового излучения. При этом установлена зависимость концентрации мелатонина в корне растения *Glycyrrhiza uralensis* от спектрального состава света. Максимальный уровень мелатонина отмечен при воздействии на растение УФ-В излучения (280–315 нм). Более высокий уровень мелатонина обнаружен в корнях растений, выращенных на красном свету. Наименьший уровень показан для корней растений, выращенных на синем и белом свету. Предполагают, что гормон в *Glycyrrhiza uralensis* играет роль защиты от окислительного повреждения, вызванного УФ-излучением [4].

Свет служит не только источником энергии для фотосинтеза, но и сигналом, регулирующим жизнедеятельность растений и переключающим основные эндогенные механизмы развития растений. Эти механизмы обеспечивают адекватные реакции растений на свет разного спектрального состава, прежде всего через изменение уровня эндогенных гормонов, скорости роста и развития [5]. Поскольку не изучена роль мелатонина в ростовых процессах растений, то целью нашей работы было установление роли мелатонина в морфогенезе проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. на селективном свету.

Исследования проводили на 7-дневных проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа Columbia дикого типа Col и его мутантной линии *axr1-3*. Проростки *A. thaliana* выращивали на синем (СС), зеленом (ЗС) и красном (КС) свету ($125 \text{ мкмоль фотонов/м}^2\text{с}$) на безгормональной 50%-ной питательной среде Мурасиге–Скуга (MS) в стерильных условиях. В среду MS перед высевом стерилизованных семян добавляли мелатонин (Мел) в концентрации 10 пМ и/или DMSO.

Выбор мутанта был обусловлен тем, что предшественником мелатонина, вещества индольной природы, служит аминокислота триптофан. Триптофан является также предшественником хорошо изученного гормона растений индоллил-3-уксусной кислоты. Существование общих звеньев в пути биосинтеза этих двух соединений, позволяет предполагать взаимосвязь между ними. Установлено также, что мутации по гену *AXR1* определяют патологию развития растений, которая может быть обусловлена нарушением или механизма действия ауксина на растительные клетки, или его полярного транспорта [6]. Стало известно, что ген *AXR1* (*AUXIN RESISTANT 1*) кодирует белок, связанный с убиквитин-активирующим ферментом E1, а не рецептор ауксина, как предполагали ранее [7].

В результате исследований было показано, что на СС формировался низкорослый проросток Col с длинным корнем и крупными семядолями, тогда как на КС гипокотиль удлинялся, но уменьшались длина корня и поверхность семядоли. Эффективность ЗС в регуляции роста была несколько

ниже эффективности КС. У мутанта по гену *AXR1* отметили изменение фенотипа в ответ на действие селективного света по сравнению с исходной линией. Проростки *axr1-3* имели более длинный корень на СС, но более короткий корень на КС и бóльшие семядоли на ЗС, чем у Col.

Введение Мел на СС уменьшало площадь поверхности семядоли, причем в два раза эффективнее у дикого типа (32%), чем у мутанта (16%), одновременно укорачивался гипокотиль у мутанта. На ЗС Мел тормозил растяжение корня у проростков обеих линий с небольшим преимуществом у Col. На КС Мел в два раза эффективнее увеличивал площадь семядоли у Col (22%), чем у *axr1-3*. При этом Мел укорачивал корень у дикого типа, но увеличивал его длину у мутанта. Различия эффектов КС и СС на рост семядоли могли быть обусловлены эндогенным уровнем мелатонина, который увеличивался на КС [4].

Таким образом, нами установлено, что действие мелатонина на морфогенез проростка *Arabidopsis thaliana* зависело от генотипа и спектрального состава света. Мелатонин снижал эффективность СС и повышал эффективность КС в регуляции роста семядолей. Мутация гена *AXR1* снижала эффективность действия СС и КС на рост семядолей и ЗС – на корень, но увеличивала эффективность действия ЗС на рост семядолей.

Литература

1. Kolar J., Macharckova I., Eder J. et al. Melatonin: occurrence and daily rhythm in *Chenopodium rubrum* // *Phytochemistry*. 1997. Vol. 44. P. 1407–1413.
2. Lei X.Y., Zhu R.Y., Zhang G.Y., Dai Y.R. Attenuation of cold induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells: the possible involvement of polyamines // *J. Pineal Res.* 2004. Vol. 36. P. 126–131.
3. Tan D.X., Manchester L.C., Masico P. et al. Novel rhythms of N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation // *Journal FASEB*. 2007. Vol. 21. P. 1724–1729.
4. Afreen F., Zobayed S.M.A., Kozai T. Melatonin in *Glycyrrhiza uralensis*: response of plant roots to spectral quality of light and UV-B radiation // *J. Pineal Research*. 2006. Vol. 41, is. 2. P. 108–115.
5. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф. Гормональный статус, рост и фотосинтез растений, выращенных на свету разного спектрального состава // *Физиология растений*. 1998. Т. 45, вып. 6. С. 925–934.
6. Lincoln C. Britton J.H., Estelle M. Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 1990. Vol. 2. P. 1071–1080.
7. Leyser H.M.O., Lincoln C.A., Timpte C. et al. *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1 // *Nature*. 1993. Vol. 364. P. 161–164.

MELATONIN-DEPENDENT GROWTH OF SEEDLING OF *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. ON SELECTIVE LIGHT

Solovyeva E.V., Golovatskaya I.F.

Arabidopsis thaliana, melatonin, blue light, green light, red light

Action of melatonin on morphogenesis of seedling *Arabidopsis thaliana* depend on a genotype and spectral structure of light. Melatonin reduced efficiency of blue light and increased efficiency red light in regulation of cotyledons growth. The mutation of gene *AXR1* reduced efficiency of action blue light and red light on cotyledons growth and green light – on root growth, but increased efficiency of action green light on cotyledons growth.

ЭВОЛЮЦИОННОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВСтадничук И. Н.¹, Тропин И. В.²¹ФГБУН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН Ленинский проспект, 33,
г. Москва, 119071, Россия, E-mail: stadnichuk@mail.ru²ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,
ул. Менделеева, 1, г. Москва, 119234, Россия*прокариоты, фикобилисомы, хлоропласты, цианобактерии, эволюция, эндосимбиоз, эукариоты*

История биосферы складывается из 2-х этапов: первоначального восстановительного (бескислородного) и окислительного (кислородного), первые фотосинтезирующие организмы возникли на бескислородном этапе и, вероятнее всего, были анаэробами [1]. Кислородный фотосинтез цианобактерий сформировался около 2.6-2.5 млрд. лет назад, почти на 1 млрд. лет позднее анаэробного фотосинтеза фотобактерий-анаэробов. Общие принципы организации фотосинтетического аппарата, состоящего из реакционных центров (РЦ), антенных светособирающих комплексов, электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) и набора ферментов фиксации углерода [1], указывают на единые эволюционные корни фотосинтезирующих про- и эукариотов. Сложившаяся предварительно ЭТЦ была унаследована фотосинтетиками от ранее появившихся хемоавтотрофов. Генеральным путем фиксации CO₂ в ходе эволюции стал цикл Бенсона-Кальвина, который смог покрыть возросшие, в сравнении с анаэробами, потребности в усвоении углерода у цианобактерий и эукариотных фотосинтетиков. Известны РЦ двух типов: в РЦ типа I разделенный заряд стабилизируется с участием Fe/S-центров, а в РЦ типа II - с участием феофитин/хинонового кластера. Первоначальный РЦ возник на стадии формирования основных кластеров эубактерий и был, вероятно, по своему окислительно-восстановительному потенциалу чем-то средним между РЦ типов I и II. [1]. Анаэробные фотосинтетики различных бактериальных фил содержат либо один, либо другой тип РЦ; объединение которых, приведшее к образованию фотосистем (ФС) I и II и к возможности фоторазложения воды, произошло в клетках протоцианобактерий. Основным пигментом кислородного фотосинтеза является хлорофилл а, и анаэробного – бактериохлорофилл а. Как известно, “последовательность реакций биосинтеза есть рекапитуляция эволюционных событий”, в соответствии с чем многоступенчатые пути синтеза хлорофиллов и бактериохлорофиллов служат отражением эволюции пигментной системы фотосинтеза. В отношении фотосинтеза это верно, если учесть, что биосинтез хлорофилла а, имеющий меньшее число стадий, в ходе эволюции сложился позднее за счет элиминации нескольких последних предшественников в цепи клеточного синтеза бактериохлорофилла а [2].

Эндосимбионтные включения прокариот в клетки предшественников современных эукариот являются фундаментальными событиями клеточной эволюции. Эукариотная клетка возникла за эволюционно растянутый срок около 1.5 млрд. лет назад в значительной мере благодаря фаготрофному поглощению и сохранению меньших по размеру прокариотных клеток. Согласно теории эндосимбиогенеза, пластиды ведут начало от трансформировавшихся цианобактерий. Гипотеза эндосимбионтного происхождения хлоропластов, насчитывая более сотни лет, в настоящее время стала общепризнанной теорией. Ее подтверждают 1) бинарное деление хлоропластов; 2) наличие двойной мембраны, сходной с двойной мембраной грамм-отрицательных клеток цианобактерий; 3) собственная кольцевая ДНК; 4) внутрипластидный синтез белка на собственных рибосомах; 5) совпадения в нуклеотидных последовательностях геномов цианобактерий, пластид и ядерных геномов различных фотоавтотрофных эукариот, причем за счет передачи большинства пластидных генов в ядерный аппарат клетки-хозяина геномы пластид сокращаются примерно до ста-двухсот генов [3].

Эндосимбиоз проэукариотной клетки с цианобактерией рода *Synechococcus*, поглощенной, но не переваренной, привел к образованию хлоропласта с двумя мембранами и был назван первичным. В эволюции разошлись три линии хозяев двумембранных пластид: зеленые, красные и глаукофитовые водоросли. Другие хемогетеротрофные клетки-хозяева смогли позже поглотить и удержать

меньшую по размерам фотосинтезирующую эукариотную клетку, используя ее как целое в виде хлоропласта. При этом сохранение фагосомальной мембраны хозяйинной клетки и плазмалеммы поглощенного эукариота сделало хлоропласт четырехмембранным. Новая эукариотная клетка вследствие подобного, вторичного, эндосимбиоза уподобилась матрешке: внутри, под защитой плазмалеммы, находится эукариотный симбионт, а в нем – прокариотный эндосимбионт. Вторичный эндосимбиоз, по данным геномики, имел место в двух линиях, идущих от предковых зеленых и красных одноклеточных водорослей. Присутствие нуклеоморфа (остаточного ядра с редуцированными хромосомами) в пространстве между второй и третьей мембраной в хлоропластах криптофитовых и хлорорахниофитовых водорослей служит убедительным цитологическим доказательством вторичного эндосимбиоза. Хлоропласты динофлагеллят и эвгленоидных водорослей стали трехмембранными вследствие редукции наружной, четвертой мембраны [4]. Часть видов, относимых по иерархическим признакам к динофлагеллятам, утратила собственный хлоропласт, заместив его другим, полученным от криптофитовых или гаптофитовых водорослей, что получило название третичного симбиоза. Имел место и обратный процесс – утрата хлоропластов и переход ряда одноклеточных водорослей к гетеротрофному образу жизни, если в среде обитания накапливалась избыточная органическая масса [4].

В составе комплексов ФС I и ФС II в ходе эволюции шло увеличение числа белков и хромофоров с формированием собственных коровых антенн, состоящих только из хлорофилла а. Эволюционно более позднее появление дополнительной антенны является очевидным, так как предформирование такой антенны в клетках, не имеющих коровых комплексов, не дает селективных преимуществ. При одинаковом наборе компартментов фотосинтетического аппарата главное различие трех пигментных групп окислительных фотосинтетиков заключается в строении дополнительной антенны. У цианобактерий, красных и глаукофитовых водорослей антенной служат фикобилисомы (ФБС) – гигантские (вдвое больше рибосом) внемембранные комплексы, состоящие из фикобилипротеинов – пигментированных белков, с которыми ковалентно связаны несколько различных линейных тетрапирролов-фикобилинов. Антенны хлорофитных водорослей представляют собой пигмент-белковые комплексы, в состав которых могут входить представители более чем 10 различных групп мембранных протеинов, образуемых одним–четырьмя трансмембранными α -спиральными доменами и несущих нековалентно связанные с белком хлорофиллы а и b (иногда только хлорофилл а), а также каротиноиды. Гомологичные хлорофилл а/b-протеинам белки многочисленных групп хромофитных водорослей содержат соединенные с апопротеинами антенны хлорофиллы а и с.

Чтобы объяснить в русле симбиогенеза наличие у эукариот трех пигментных типов пластид, содержащих в сочетании с хлорофиллом а ФБС, хлорофилл b или хлорофилл с при отсутствии последних пигментов у цианобактерий, было выдвинуто предположение о существовании еще двух пигментных групп предковых вымерших окислительных бактерий-фототрофов, аналогичных цианобактериям. Обнаружение *Prochloron* 'а, а в последующие годы еще нескольких аналогичных видов бактерий, содержащих вместо ФБС хлорофилл b, казалось бы, подтверждали подобные представления, но оказалось, что хлорофилл а/b-содержащие белки-светосборщики прохлорофитных цианобактерий родственны CP-43 и CP-47 протеинам ФС II и негомологичны хлорофилл а/b-протеинам высших растений и зеленых водорослей. Ряд штаммов *Prochlorococcus* содержат наряду с хлорофиллами а и b некоторые количества хлорофилла с, и еще ряд штаммов обладают дивинилхлорофиллом а. Можно полагать, что хлорофилл b у прохлорофитных цианобактерий возник конвергентно, хотя на прокариотном и эукариотном уровнях просматривается гомология фермента, отвечающего за его биосинтез на основе хлорофиллида а. Очевидно, разновидности антенных комплексов, снабженных разными пигментами, дополняющими хлорофилл а, могли в ходе эволюции появляться неоднократно. Тем самым на этапе трансформации цианобактерий в пластиды и появлении фотосинтезирующих эукариот произошла утрата ФБС с их заменой на хлорофилл а/b- и хлорофилл а/с-протеины. Одно из самых убедительных доказательств происшедшей смены антенны предоставляют хромофитные жгутиковые водоросли-криптомонады. Хлоропласты криптомонад содержат хлорофилл а/с-протеин и сохраняют отдельные фикобилипротеины, которые, согласно данным о первичной структуре, гомологичны фикобилипротеинам в составе ФБС у цианобактерий

и красных водорослей. Поэтому в хромофитной линии водорослей хлоропласты криптонад представляют собой промежуточную эволюционную форму организмов с частично редуцированными ФБС. Аналогично криптонадам, у глубоководных морских прохлорофитных цианобактерий сохранился один из фикобилипротеинов – фикоэритрин, а у хлорофилл d- и f-содержащих цианобактерий сохранились агрегаты фикоцианина и аллофикоцианина.

Принцип оптимальности в биологии подразумевает рассмотрение эволюционных факторов в их совокупности. ФБС сохраняются как антенна в тех случаях, когда их функциональные преимущества преобладают над имеющимися недостатками. Причину замены ФБС, обладающих наилучшими возможностями поглощения света в широком спектральном диапазоне в сравнении с другими антеннами, следует искать в оптимизации энергетических трат клетки в ходе эволюции и в усложнении тилакоидной системы хлоропластов. Важнейшей причиной утраты ФБС следует считать увеличение потребности растительных клеток в усвоении CO₂, вызванное появлением клеточной стенки. Из 30 x 10⁹ т углерода, усваиваемого в виде углекислого газа ежегодно высшими растениями, примерно треть приходится на образуемую целлюлозу. Ферменты фиксации CO₂ составляют значительную часть белка клетки, и клеточные расходы на поддержание автотрофного метаболизма вступают в противоречие с затратами на поддержание пигментного аппарата. На его содержание клетке приходится тратить заметную часть получаемой от него же энергии [5]. В совокупности с избыточными расходами на биосинтез фикобилипротеинов перечисленные факторы привели к избавлению от ФБС при всем совершенстве выполнения ими непосредственных функций антенны. Сохранение ФБС у двух групп эукариот, красных и глаукофитовых водорослей, коррелирует с недоразвитостью их клеточных стенок.

Литература

1. Olson J.M. Thinking about the evolution of photosynthesis / J.M. Olson J.M., R.E. Blankenship // *Photosynth. Res.* - 2004. - V. 80. - P. 373-386.
2. Granick S. Speculations on the origins and evolution of photosynthesis / S. Granick // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* - 1957. - V. 69. - P. 292-298.
3. Заварзин Г.А. Роль комбинаторных событий в развитии биоразнообразия / Г.А. Заварзин // *Природа.* - 2002. - № 1. - С. 12-19.
4. Archibald J.M. Recycled plastids: “A Green Movement” in eukaryotic evolution / J.M. Archibald, P.J. Keeling // *TRENDS Gen.* - 2002. - V. - 18. - P. 577-584.
5. Marosvölgyi M.A. Cost and color of photosynthesis / M.A. Marosvölgyi, H.J. van Gorkom // *Photosynth. Res.* - 2010. - V. 103. - P. 105-109.

EVOLUTIONAL ORIGIN OF CHLOROPLASTS

Stadnichuk I.N., Tropin I.V.

chloroplasts, cyanobacteria, endosymbiosis, eucaryotes, evolution, phycobilisomes, prokaryotes

All compartments of photosynthetic apparatus ensuring the photosynthesis were formed at the prokaryotic stage of evolution. Plastids were formed later as a result of endosymbiosis of eucaryotic cell and cyanobacteria. In chloroplasts and chlorophytic algae as well as of higher plants phycobilisome-antenna was substituted by chlorophyll a/b- and chlorophyll a/c-containing pigment-protein complexes.

**ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ
АРАБИДОПСИСА ПРИ ДЕФИЦИТЕ ФОСФОРА В ПИТАТЕЛЬНОМ РАСТВОРЕ**

Трекозова А.В., Высоцкая Л.Б., Кудоярова Г.Р.

ФГБУН Институт биологии УНЦ РАН, проспект Октября, 69, г. Уфа,
450054, Россия, E-mail: vysotskaya@anrb.ru*арабидопсис, дефицит фосфора, гормональный сигналинг, рост корней*

Изменение скорости роста и развития корней играет решающую роль в обеспечении растений элементами минерального питания. На сегодняшний день существуют разные подходы в исследовании механизмов ростового ответа растений на содержание ионов: как вычленение влияния отдельных питательных макроэлементов, так и влияние на растение тотального дефицита [1]. Особое внимание в последнее время привлекают ионы фосфора, поскольку было замечено, что большая часть растений арабидопсиса имеет характерную ростовую реакцию корня на дефицит фосфатов [2]. Участие гормонов в регуляции роста и развития корней и побегов растений не вызывает сомнений [3]. В свою очередь уровень и распределение ионов влияет на гормональную систему растений [4]. Но в основе большинства современных работ лежат опыты с мутантными или трансгенными растениями с нарушениями гормонального метаболизма или сигналинга или с нарушениями ростовой реакции на дефицит макроэлементов. Очевидна недостаточность косвенных подходов и необходимость оценки уровня эндогенных гормонов в этих экспериментах. Кроме того, свою регуляторную функцию гормоны осуществляют во взаимодействии друг с другом [3], что диктует необходимость анализа нескольких гормонов одновременно. Это, как правило, вызывает сложности, связанные со сбором и анализом достаточного количества образцов, особенно, при работе с традиционным объектом исследований - растениями арабидопсиса. В данной работе нами были подобраны условия выращивания арабидопсиса на жидкой питательной среде, что позволило нам не только моделировать дефицит фосфора, но и проанализировать в динамике при помощи высокоспецифичного метода иммуноферментного анализа содержание ИУК, АБК и цитокининов.

Растения арабидопсиса экотипа *col* (Columbia) проращивали в чашках Петри, пересаживали в стаканчики с пропитанным 100%-ным раствором Хогланда – Арнона (Х-А) песком и выращивали до двух-трех настоящих листьев. Затем пересаживали на плотки из полистирола с отверстиями, плотки с растениями переносили на разные по составу питательные среды (10 и 50% растворы Х-А, 10% Х-А не содержащий K_2HPO_4 и содержащий NaH_2PO_4 вместо K_2HPO_4). В контрольных временных точках взвешивали корни и побеги, измеряли длину главного корня и определяли количество боковых корней. Пробы на гормоны собирали через 2 и 5 дней от начала эксперимента. Определение содержания фитогормонов после экстракции проводили с помощью ИФА [5].

На первом этапе нами были подобраны условия для выращивания растений арабидопсиса на жидкой питательной среде. Оказалось, что максимальная масса растений была характерна для 10% раствора Х-А, в то время как на 50% растворе рост растений ингибировался, и уже через две недели половина листьев была сухой. Для изучения дефицита фосфора из питательного раствора Х-А исключали K_2HPO_4 . Чтобы нивелировать влияние уменьшения содержания ионов калия в качестве контроля использовали среду, в которую добавляли не K_2HPO_4 , а NaH_2PO_4 . Результаты экспериментов показали, что замена K_2HPO_4 на NaH_2PO_4 не вызывала достоверных различий в накоплении сырой массы побегов и корней и практически не влияла на ветвление корней. В последующих экспериментах эта среда была использована в качестве контрольной.

Через 5 дней после исключения из питательного раствора ионов фосфора (дефицит фосфора) не было достоверных различий по массе целого растения, но уже существенно изменялось соотношение корень/побег в пользу корня ($0,14 \pm 0,05$ и $0,37 \pm 0,06$ у контрольных и дефицитных по фосфору растениях, соответственно), при этом его длина также была больше по сравнению с контрольными растениями примерно на 30%, а по числу боковых корней лишь только наметилась тенденция в сто-

рону его увеличения. На восьмые сут. дефицита фосфора наиболее яркие различия были обнаружены по числу боковых корней. Дефицит фосфора приводил к активации их образования ($10,8 \pm 2,9$ и $16,9 \pm 2,8$ боковых корней на контрольное и дефицитное по фосфору растение, соответственно).

Регуляцию роста корней, прежде всего, связывают с ауксинами [6]. И действительно в наших экспериментах ростовой реакции (перераспределения массы в пользу корня и его удлинение) на пятые сут. предшествовало двукратное увеличение концентрации в них ауксинов на третьи сутки. Однако через 5 сут. не было различий по содержанию ауксинов между контролем и вариантом с дефицитом фосфора. Тем не менее, именно в этот период времени должна была происходить закладка и активация роста примордиев боковых корней, поскольку заметное увеличение их числа мы обнаружили через 8 суток. В этой ситуации важно было определить динамику содержания АБК и цитокининов, поскольку их роль в регуляции роста корней доказана, хотя и менее понятна. Мы обнаружили именно через 5 дней после начала воздействия дефицита снижение содержания АБК (примерно на треть) в корнях по сравнению с контролем. Этот гормональный сигнал предшествовал ростовому ответу (активации закладки и роста боковых корней), который мы обнаружили через 8 суток. Это не противоречит данным литературы и свидетельствует в пользу того, что рост корня зависит от взаимодействия гормонов. Что касается цитокининов, то наши данные позволяют предположить, что их участие в регуляции роста корня могло осуществляться через регуляцию роста побега. Так перераспределению сырой массы в пользу корня предшествовало почти трехкратное снижение содержания цитокининов в побеге. Таким образом, мы обнаружили взаимодействие изученных гормонов, регулирующих рост растений арабидопсиса при дефиците фосфора. При этом каждый из них мог играть определенную роль на разных стадиях ростового ответа растений.

Исследования поддержаны грантом РФФИ №12-04-01111-а

Литература

1. Vysotskaya L.B., Korobova A.V., Veselov S. Y., Dodd I.C., Kudoyarova G.R.. ABA mediation of shoot cytokinin oxidase activity: assessing its impacts on cytokinin status and biomass allocation of nutrient deprived durum wheat // *Functional Plant Biology*. - 2009. - V. 36. - P. 66–72.
2. Niu Y.F., Chai R.S., Jin G.L., Wang H., Tang C., Zhang Y.S. Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review // *Annals of Botany*. – 2013. - 112. –P. 391–408.
3. Fukaki H., Tasaka M. Hormone interactions during lateral root formation // *Plant Mol. Biol.* - 2009. - V. 69. - P. 437–449.
4. Kiba T., Kudo T., Kojima M., Sakakibara H. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin // *J. Exp. Bot.* - 2011. - V. 62. - P. 1399–1409.
5. Vysotskaya L.B., Korobova A.V., Veselov S.Y., Dodd I.C., Kudoyarova G.R. ABA mediation of shoot cytokinin oxidase activity: assessing its impacts on cytokinin status and biomass allocation of nutrient deprived durum wheat // *Functional Plant Biology*. - 2009. - V. 36. - P. 66–72.
6. Casson S.A., Lindsey K. Genes and signaling in root development // *New Phytol.* - 2003. - V. 158. - P. 11-38.

HORMONAL REGULATION OF ROOT GROWTH OF ARABIDOPSIS UNDER PHOSPHOROUS DEFICIT IN THE NUTRIENT MEDIUM

Trekozova A.V., Vysotskaya L.B., Kudoyarova G.R.

phosphorous deficit, Arabidopsis, hormonal signalling, root growth

Under phosphorous deficit in the nutrient medium accumulation of auxin was detected in roots and cytokinins – in shoots of Arabidopsis plants preceding the changes in root/shoot mass ratio. Subsequent increase in the number of lateral roots was observed after the decline in ABA concentration.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВИДОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ОЛИГОСАХАРИНОВ
КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ РАСТЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ РИЗОГЕННЫМ ЭФФЕКТОМ**

Трофимова О.И., Ларская И.А.

ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН,
ул. Лобачевского 2/31, а/я 30, г. Казань, 420111, Россия, E-mail: trofimova@mail.knc.ru*ризогенез, клеточная стенка, олигосахарины***Введение**

Клеточная стенка растений, наряду с другими функциями, выполняет роль продуцента определенного класса регуляторных молекул – олигосахаридов, которые являются низкомолекулярными полисахаридными фрагментами. По своему множественному действию на растения олигосахариды напоминают фитогормоны, однако их активность проявляется при значительно более низких концентрациях (до 10^{-10} М). Показано, что они участвуют в регуляции разнообразных функций растительного организма [1] и вовлечены в такие процессы как приобретение устойчивости к патогенам [2], морфогенез [3], формирование низкотемпературной устойчивости [4]. Несмотря на интенсивное изучение олигосахаридов в течение нескольких десятилетий, многое об условиях их возникновения, механизмах действия, транспортировке и метаболизации в растении все еще остается не известным. Поэтому любые исследования в этом направлении, которые могут добавить новые детали для характеристики этих регуляторных молекул продолжают оставаться актуальными. С этой целью было исследована способность олигосахаридов, выделенных из растений, принадлежащим разным классам - однодольные (пшеница) и двудольные (горох), стимулировать процесс образования адвентивных корней на различных модельных системах.

Материалы и методы

Для выделения олигосахаридовых фракций использовали 12-дневные проростки гороха (*Pisum sativum* L.), и корни 5-дневных проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выращенных на водопроводной воде при 23-25° и 12-часовом фотопериоде. Очистка олигосахаридов представляла последовательные этапы с использованием различных типов хроматографии. Более детальное описание метода представлено в ранее опубликованных работах [5].

Тестирование на биологическую активность проводили на эксплантах из гипокотилей гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench) и отрезках гипокотилей табака (*Nicotiana tabacum*), которые культивировали на жидкой среде MS/2 с добавлением ИУК и фракций олигосахаридов. Все работы по проращиванию гипокотилей, приготовлению и культивированию эксплантов выполнялись стерильно. Концентрации эффекторов указаны в подписях под рисунками. Подсчет количества корней проводили в препаратах эксплантов гипокотилей табака под световым микроскопом (PZO (Poland) Jenamed (histology) Karl Zeiss Jena) с 125-кратным увеличением.

Результаты и обсуждение

Методология выделения и очистки, основанная на высокой гидрофильности нейтральных олигосахаридов и отсутствии у них зарядов была разработана в лаборатории, что подтверждено Патентом 2100177 (Ru). Все условия подбирались с таким расчетом, чтобы сохранить целостность олигосахаридов в процессе извлечения их из растительной ткани. Полученные олигосахариды (ОС) имели природное происхождение, поскольку выделялись из буферорастворимой фракции без предварительного гидролиза клеточных стенок. Олигосахариды, выделенные из проростков гороха имели степень полимеризации ~10-12 и состояли преимущественно из глюкозы, галактозы и арабинозы, а активные фракции, выделенные из корней пшеницы имели степень полимеризации ~12 и состояли из глюкозы и ксилозы. Тестирование, проведенное на различных модельных системах показало, что ОС, выделенный из проростков

гороха стимулировал ИУК-индуцируемое корнеобразование адвентивных корней на эксплантах, полученных из гипокотилей гречихи (рис. 1), и на отрезках гипокотилей табака (рис. 2).

Такой же способностью повышать количество корней обладала фракция олигосахаридов, выделенная из корней пшеницы. Стимулирующий эффект проявлялся как на эксплантах, полученных из гипокотилей гречихи (рис. 3), так и на отрезках гипокотилей табака (рис. 4).

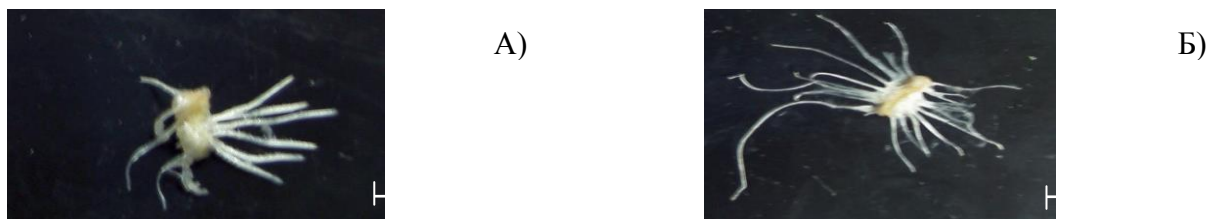


Рисунок 1 - Влияние фракции олигосахарина, полученной из проростков гороха на образование адвентивных корней на эксплантах из гипокотилей гречихи: А - ИУК, Б — ИУК + олигосахарин. Концентрация ИУК – 3 мкМ, концентрация ОС – 5 мкг/мл. Подсчет корней проводили на 6 день культивирования. Масштабная линейка – 1 см

Figure 1 - Effect of oligosaccharins fractions obtained from pea seedlings on the adventitious roots formation on the buckwheat hypocotyls explants: А - IAA, В – IAA + oligosaccharins. The concentration of IAA - 5 mkM, concentration OS - 5 mkg/ml. Roots were counted on 6th day. Scale - 1 cm

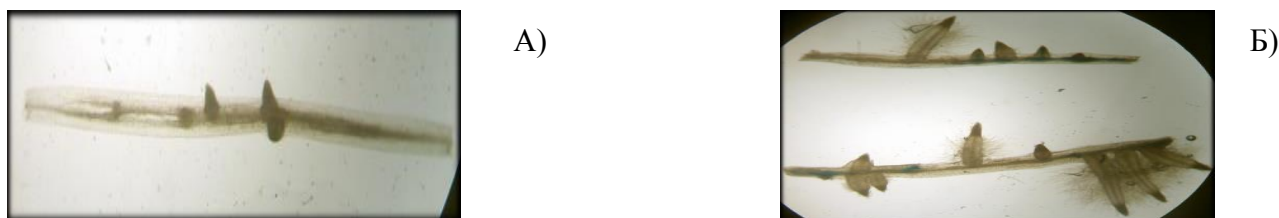


Рисунок 2 - Влияние фракции олигосахарина, полученной из проростков гороха на образование адвентивных корней на отрезках гипокотилей табака: А - ИУК, Б - ИУК + олигосахарин. Концентрация ИУК – 0,4 мкМ, концентрация ОС – 1 мкг/мл

Figure 2 - Effect of oligosaccharins fractions obtained from pea seedlings on the adventitious roots formation on the hypocotyls segments of tobacco: А - IAA, В – IAA + oligosaccharins. Concentration of IAA - 0.4 mkM, the concentration of OS - 1 mkg/ml

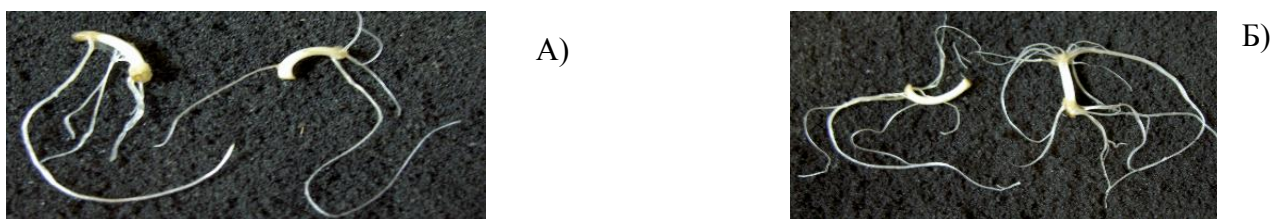
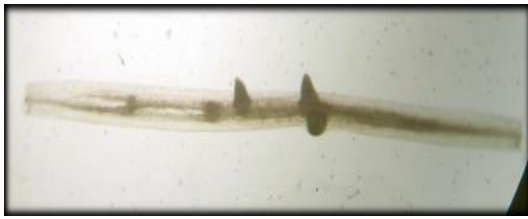
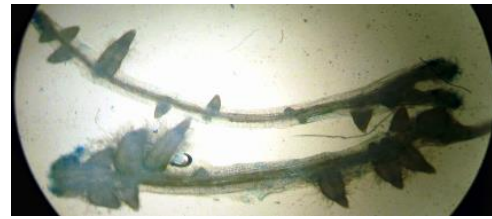


Рисунок 3 - Влияние фракции олигосахарина, полученной из корней пшеницы на образование адвентивных корней на эксплантах из гипокотилей гречихи: А - ИУК, Б - ИУК + олигосахарин. Концентрация ИУК – 3 мкМ, концентрация ОС – 1 мкг/мл. Корни подсчитывали на 6 день. Масштабная линейка – 1 м

Figure 3 - Effect of oligosaccharins fractions obtained from on wheat roots on the adventitious roots formation on the buckwheat hypocotyls explants: А - IAA, В - IAA + oligosaccharins. Concentration of IAA - 3 mkM, concentration OS - 1 mkg/ml. Roots were counted on 6th day. Scale - 1 cm.



A)



B)

Рисунок 4 - Влияние фракции олигосахаринов, полученных их корней пшеницы на образование адвентивных корней на отрезках гипокотилей табака: А - ИУК, Б - ИУК +олигосахарин. Концентрация ИУК – 0,4 мкМ, концентрация ОС – 1 мкг/мл.

Figure 4 - Effect of oligosaccharins fractions obtained from on wheat roots on the adventitious roots formation on the hypocotyl segments of tobacco: А - IAA, В - IAA + oligosaccharins. The concentration of IAA - 0.4 mkM, concentration OS - 1 mkg/ml.

Таким образом, олигосахарины, полученные из растений, относящимся к разным классам (двудольные и однодольные) обладали схожим эффектом на ИУК-индуцируемое формирование корней, показывая отсутствие видовой специфичности у олигосахаринов, стимулирующих корнеобразование, что может свидетельствовать об универсальности механизмов действия этих биологически активных веществ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (14-04-01591)

Литература

1. Seifert G. J., Blaukopf C. Irritable Walls: The Plant Extracellular Matrix and Signaling // Plant Physiology, 2010, V. 153, P. 467–478.
2. Cote F., Hahn M. Oligosaccharins: structures and signal transduction // Plant Mol. Biol., 1994, V. 26, P. 1379-1411.
3. Tran Thanh Van K., Toubart P., Cousson A., Darvill A.G., Gollin D.J., Chelf P., Albersheim P. Manipulation of the morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins // Nature, 1985, V. 314, P. 615-617.
4. Zabolin A.I., Barisheva T.S., Larskaya I.A., Toroshina T.E., Trofimova O.I., Hahn M.G., Zabolina O.A. Oligosaccharins – a new systemic factor in the acquisition of freeze tolerance in winter plants. // Plant Biosystems, 2005, №1, P. 139-145.
5. Заботина О.А., Гурьянов О.П., Малихов Р.Г., Аюпова Д.А., Белдман Г., Ворраген А. Дж. Г., Лозовая В.В. Выделение олигосахаринов из побегов гороха и их физиологическая активность // Физиология растений, 1995, Т. 42, № 3. С. 416-422.

INVESTIGATION OF THE SPECIFIC PECULIARITY OF THE OLIGOSACCHARINS FROM CELL WALL THAT STIMULATE THE PROCESS OF ROOT FORMATION

Trofimova O.I., Larskaya I.A.

rhizogenesis, cell wall, oligosaccharins

After the multiple step chromatographic technology the endogenous neutral oligosaccharide fraction (OS-RG) from the pea's seedlings was able to stimulate the adventitious roots formation on the thin-layer explants received from dicotyledonous plants (buckwheat, tobacco). The oligosaccharin was isolated from monocotyledonous - the roots of wheat also had a stimulating effect on rooting of explants received from hypocotyls of buckwheat and tobacco.

НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ПЕРЕХОД СВЕТОВОЙ ЭНЕРГИИ В ХИМИЧЕСКУЮ В ПРОЦЕССЕ ФОТОСИНТЕЗА

Трутнев А.Ф.

Самарская обл., г. Кинель, 446430, Россия, E-mail: proston-inbors@yandex.ru

фотосинтез, световая и темновая стадии, фотосистемы, фотолиз воды, резонансный перенос, материя и пространство, силовые линии, энергия

Введение

Процесс фотосинтеза многоступенчатый [1, с.117-135]. Он состоит из световой и темновой стадий. Световая стадия протекает в 2 этапа. На первом происходит поглощение световой энергии пигментами растительных клеток, сопровождающееся фотохимическим разложением молекул воды с выделением свободного кислорода [2, с.248]. Второй этап состоит из окислительно-восстановительных реакций и сводится к переносу по электронотранспортной цепи электронов за счет световой энергии с образованием АТФ и НАДФН. В темновой стадии фотосинтеза происходит восстановление диоксида углерода до углеводов за счет световой энергии, запасенной в ходе реакций в световой стадии.

По современным представлениям [3, с.143-178] общепризнанным механизмом переноса световой энергии между молекулами пигментов является резонансный перенос, при котором одна возбужденная молекула индуцирует возбуждение в другой. Но и он полностью не раскрывает ход глубоких процессов, протекающих в молекулах при переносе энергии, оставляя ряд вопросов к его отдельным звеньям. По мнению автора, углубленное понятие его сущности может дать использование смоделированной системы взаимодействия материи и пространства.

Методика

Реалии (R) окружающего нас мира можно представить, как:

$R = W + P$, где, W—материя, P—пространство.

Пространство в смоделированной системе представлено совокупностями отрицательно заряженных частиц, организованных в силовые линии, которые образуют своеобразную «сеть», равномерно напряженную во всех направлениях за счет сил отталкивания одноименных зарядов, а материя совокупностью положительно заряженных частиц (гравитонов), размещенных определенным образом между силовыми линиями пространства. Все материальные тела движутся в силовых линиях пространства и деформируют их. Протон сжимает силовые линии пространства и при это выделяется энергия пространства, а электрон их расширяет с выделением энергии материи

Согласно базовым принципам смоделированной системы переход световой энергии в химическую происходит следующим образом.

Результаты

Квант световой энергии (рис.1), падающий на листовую поверхность, проникает в молекулы светособирающего комплекса (ССК), а так как энергия света - это материальная энергия, то она переходит в пространственную и сжимает силовые линии пространства вокруг молекул. Степень сжатия нарастает при переходе от одной молекулы к другой и возрастает вокруг основной молекулы Р680 реакционного центра ФС II и молекулы его первичного акцептора (ПА) до величин, способных оторвать электроны с их внешних орбит.

Потеряв 2 электрона, молекула Р680 ФС II возбуждается, степень сжатия силовых линий пространства вокруг неё значительно возрастает, границы повышенной степени сжатия расширяются и охватывают своим влиянием молекулы воды (рис.1). Для окисления воды такой степени сжатия силовых линий пространства ещё недостаточно. Фотолиз молекулы воды осуществляется с помощью мембранного комплекса, который доводит степень сжатия силовых линий окружающего молекулу воды пространства до величины превышающую таковую в водородных связях в молекуле воды и электроны двух атомов молекулы воды разрывают ковалентную связь с двумя электронами кислорода и движутся к молекуле Р680, в силовых линиях пространства, расширяя их снижают степень их

сжатия вокруг реакционного центра. Достигнув зоны эффективного действия ядерных сил молекулы, они занимают места ушедших электронов, и молекула из возбужденного переходит в основное состояние.

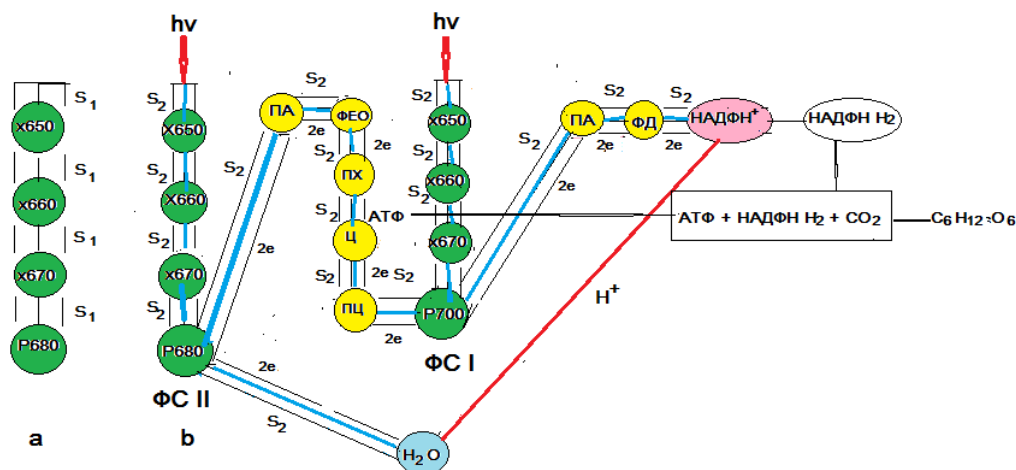


Рисунок 1 - Схема перехода энергии материи в энергию пространства при фотосинтезе.

a - степень сжатия (S_1) силовых линий пространства в ССК и реакционных центрах фотосинтетического аппарата зеленых растений до начала фотосинтеза, b - (S_2) то же после начала фотосинтеза. ФС – фотосистема. - - - - энергия материи. - - - - энергия пространства.

Figure 1 - Transition diagram of the energy of matter in space energy in photosynthesis. a - squeezing degree (S_1) power lines of space in SCQ and the reaction center of the photosynthetic kettle of green plants prior to the beginning of photosynthesis b - (S_2) too after the photosynthesis beginning. FS – photosystem, - - - - energy matter, - - - - energy of space.

Два электрона, покинувшие молекулу P680, расширяя силовые линии пространства, достигают молекулы первичного акцептора (ПА) и замещают в нем два электрона, покинувшие её в результате повышения степени сжатия силовых линий пространства вокруг этой молекулы (рис.1), а те по электротранспортной цепи, находящейся в зона активного воздействия ФС I и ФС II, переносятся молекулами переносчиками к реакционному центру ФС I. В начале на феофитин (ФЕО), затем на пластохинон (ПХ), на цитохромы (Ц), в дальнейшем на пластоциан (ПЦ), который и восстанавливает окисленный P700. Перенос электронов по молекулярной цепочки сопровождается расширением электронами сжатых силовых линий пространства и соответствующим выделением материальной энергии, часть которой тратится на синтез богатого энергией соединения АТФ. Синхронно с ФС II включается в процесс фотосинтеза фотосистема ФС I. Поглотив световую энергию, ССК ФС I сжимает силовые линии пространства вокруг реакционного центра (P700) фотосистемы, и она возбуждается. Электроны, находящиеся на внешней орбите, преодолев ядерное притяжение, двигаясь в направлении более высокой степени сжатия, покидают молекулу и захватываются молекулой первичного акцептора (ПА), затем переносчиками передаются на ферредоксин (ФД), который с помощью фермента ферредоксин НАДФ—редуктазы (ФНР) переносит их на конечный акцептор НАДФ⁺ (рис. 1).

Протоны, образовавшиеся при разложении молекулы воды, накапливаются внутри тилакоидов, а электроны, оторвавшиеся от молекул переносятся молекулами переносчиками за его пределы. Находящиеся внутри тилакоидного пространства протоны сжимают силовые линии пространства по обе стороны тилакоида, а электроны, находящиеся на его внешней мембране, расширяют их, создавая тем самым определенную уравновешенную степень их сжатия, при которой не происходит их сближение. Как только, степень сжатия превысит таковую в атомном пространстве водорода, протоны и электроны начинают сближаться.

Протоны движутся по «протонному каналу», связанному с ферментами АТФ—синтетаза. Энергия сжатия протонами силовых линий пространства — это энергия материи и её ферменты ис-

пользуют для синтеза АТФ. При выходе протонов на поверхность тилакоидов они переносятся на конечный акцептор НАДФ⁺, где вместе с принесенными по электронтранспортной цепи двумя электронами восстанавливают его до НАДФ Н₂, который участвует вместе с АТФ в синтезе органических веществ в темновой стадии фотосинтеза.

Темновая стадия протекает в 3 этапа в строме хлоропластов при участии продуктов реакций световой стадии АТФ, НАДФ Н₂ и ферментов—катализаторов, а также углекислого газа, поступающего из воздуха. Конечным продуктом темновой стадии является восстановление углерода до глюкозы.

Заключение

Косвенными доказательствами правомерности существования предлагаемого механизма могут служить следующие факты, имеющие место в действительности.

1. При боковом освещении зеленых растений их листья принимают пространственное положение, при котором угол падения на них световых лучей максимально приближен к 90 градусам. Это объясняется тем, что в этом случае энергии большинства фотонов становится достаточным, чтобы сжать силовые линии пространства до величины, достаточной для фотолиза воды. При значительных отклонениях угла падения количество таких фотонов уменьшается и интенсивность фотосинтеза падает. По этой же причине листья зеленых растений имеют плоскую форму.

2. Устройство фотосинтетического аппарата зеленых растений предполагает разделение функций между ССК и реакционным центром. Это разделение позволяет увеличить эффективность перехода солнечной энергии в химическую, за счет нарастания степени сжатия силовых линий пространства при её переходе от одной молекулы ССК к другой.

Литература

1. Андрианова Ю.Е. Хлорофилл и продуктивность растений . - М.: Наука, 2000.-117-135 с.
2. Альбертис, Брей Д. Молекулярная биология клетки. – М.: Мир, 1994.- 248 с.
3. Якушкина Н.И. Физиология растений. - М.: Просвещение, 1980. 143-178 с.

NEW VIEW ON TRANSFORMATION OF LIGHT ENERGY INTO CHEMICAL ENERGY IN THE PROCESS OF PHOTOSYNTHESIS

Trutnev A.F.

photosynthesis, light and dark stages, photosystems, water photolysis, resonant transport substance and space, interaction, power lines, energy, deformation

The system of interaction of a substance and space is simulated. On its base principles the mechanism of transition of light energy in chemical on essentially new bottom is opened.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ КОДЫ ЭФФЕКТИВНОЙ ТРАНСЛЯЦИИ И СТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКОВ ПРИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХТюрин А.А.^{1,2}, Мустафаев О.¹, Бердичивец И.Н.¹, Садовская Н.С.¹, Павленко О.С.²,
Фадеев В.С.¹, Голденкова-Павлова И.В.¹¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35,
г. Москва, 127276, Россия; E-mail: irengold58@gmail.com²ФГБОУ ВПО «РГАУ - МСХА им. К.А. Тимирязева», Тимирязевская ул., 49,
г. Москва, 127550, Россия, E-mail: alexjofar@gmail.com*экспрессия генов, трансляция, стабильность, белки, растения*

Создание экспериментальных моделей трансгенных растений для функциональной геномики, как и успех в создании новых форм растений с заданными свойствами или использовании их в качестве продуцентов, зависят от эффективности работы перенесенных генов. Эффективность экспрессии генов регулируется на разных уровнях: транскрипции, трансляции, и стабильности белкового продукта переносимого гена. Следует отметить, что многочисленные данные продемонстрировали, что при гетерологичной экспрессии генов в растениях корреляция между уровнями мРНК транскриптов и уровнями белка более, чем скромная. Более удивительно, что даже изменение в уровне мРНК гетерологичного гена не обязательно приводит к ожидаемому изменению уровня соответствующего белка [1]. Неполное соответствие между уровнями мРНК и белка определяется в первую очередь вариабельностью трансляции и стабильности белка. Вышеизложенное свидетельствует о важности регуляции трансляции и стабильности белков, поскольку белковые продукты имеют критическое значение для жизнедеятельности растений. Несмотря на бурное развитие генной инженерии растений доступных и охарактеризованных растительных регуляторных элементов эффективной трансляции и стабильности белковых продуктов невелико, поэтому их поиск и анализ являются актуальным направлением исследований.

Материалы и методы

Для биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей применен информационный ресурс FlowGene.az, разработанный в лаборатории, который имеет программное обеспечение, позволяющее формировать произвольные выборки нуклеотидных последовательностей генов с целью их дальнейшего анализа по различным параметрам. Для молекулярного клонирования применяли стандартные процедуры и протоколы ПЦР. В качестве инструмента для экспериментальной работы использована серия модельных векторов, сконструированная нами ранее [2], В работе использованы растения табака *Nicotiana benthamiana*, выращенные при температуре 25°C в условиях 16-часового светового дня и освещенности 1000-2000 Лк, штамм *E. coli* XL1-Blue ("Stratagene", США) и штамм агробактерий GV3101. Для трансформации клеток бактерий использовали стандартные методики. Бактериальные клетки для агроинфильтрации растений табака *N. benthamiana* предварительно ресуспендировали в буфере, и инфильтрировали в нижнюю часть листа шестинедельных растений *N. benthamiana* с помощью шприца без иглы. Результат оценивали на четвертые сут. после агроинфильтрации.

Результаты и обсуждение

Первым регуляторным мотивом выбрана 5'-нетранслируемая область — сегмент мРНК, предшествующий стартовому кодону. Данная область встречается у большинства генов и контролирует экспрессию гена этапе инициации трансляции. Первоначально, проанализировали распределение количества генов в зависимости от размера 5'-НТО. Было продемонстрировано, что размер данной области у большинства генов модельного организма варьирует от 70 до 120 п.н. Следует отметить, что такая закономерность сохраняется и для групп генов с

разным уровнем экспрессии. Далее мы оценили содержание гуанина и цитозина в этой области, и показали, что среднее содержание гуанина и цитозина в 5'-НТО генов составляет 37%. Анализ генов с высоким уровнем экспрессии позволил вывести консенсусную последовательность 5'-НТО, содержащую наиболее часто встречающиеся мотивы, характерные для подобных регуляторных мотив растительных генов. Исходя из полученных результатов, высказано предположение, что консенсусная последовательность 5'-НТО может позитивно влиять на экспрессию гетерологичных генов в растениях. Для практической верификации выдвинутых гипотез был сконструирован вектор, в котором консенсусная 5'-НТО локализована перед геном бирепортерного белка. В качестве контроля использовался аналогичный вектор, не содержащий консенсусной 5'-НТО. Сравнительные результаты уровня накопления бирепортерного белка при транзientной экспрессии в растениях показали, что относительное содержание бирепортерного белка увеличивается на 20-25%. Эти результаты позволяют предположить, что уровень накопления гетерологичных белков в растениях можно существенно увеличить, целенаправленно меняя состав 5'-НТО, добавляя или исключая регуляторные элементы и мотивы.

Вторым важным этапом трансляции является элонгация полипептидной цепи. На данном этапе важную роль играет кодоновый состав гетерологичного гена, поскольку в силу вырожденности генетического кода пул транспортных РНК и кодоновый состав генов у различных организмов может значительно варьировать. Это может приводить к снижению уровня или полному ингибированию экспрессии гетерологичных генов на уровне элонгации трансляции. Важность этого фактора подтверждается рядом экспериментальных фактов. Так при создании растений, проявляющих устойчивость к насекомым за счёт экспрессии гена Δ -эндотоксина, успех был достигнут только после приведения кодонового состава данного гена в соответствие с кодоновым составом самих растений. Как правило, для модификации кодонового состава используются два подхода: оптимизация по предпочтительным кодонам и метод Монте-Карло, а также их сочетания. В нашей работе использован новый алгоритм изменения кодонового состава целевого гена, суть которого заключается в приведении частоты встречаемости триплетов в модельном гене в соответствие с частотой встречаемости кодонов в целом по геному организма-реципиента. На наш взгляд, подобный подход позволяет с меньшими изменениями в метаболических путях организма-хозяина внедрить ещё один функционирующий ген, не отвлекая тРНК, необходимые для важных клеточных процессов. В качестве модельных использованы гены эритропоэтина и интерферона- α -2А человека. Оптимизацию проводили на основе генома *A.thaliana*. Для проверки выдвинутых гипотез гены с модифицированным кодоновым составом были синтезированы и клонированы в экспрессионные вектора. Отметим, что с целью точной оценки уровня накопления целевых белков, использовали подход, основанный на транскрипционно-трансляционном слиянии последовательностей целевых генов с последовательностью гена термостабильной лихеназы. В качестве контроля использовались вектора, несущие нативные, т. е. не подвергнувшиеся модификации модельные гены. Транзientная экспрессия полученных векторов в растениях табака позволила установить, что уровень накопления целевых белков, которые кодируются модифицированными последовательностями генов с оптимальным для экспрессии в растениях кодоновым составом, увеличивается на 35-40%.

Триплет для второй аминокислоты в составе белковой молекулы исследован как последовательность, определяющая стабильность целевых белков в растительной клетке. Выбор базируется на так называемом правиле N-конца, которое гласит, что время жизни белка определяется тем, какой аминокислотный остаток находится во втором положении полипептидной молекулы. Как было показано в ряде исследований, все аминокислоты в зависимости от их вклада в обеспечение стабильности белковой молекулы можно разделить на две группы: стабилизирующие и дестабилизирующие, последние, в свою очередь, в зависимости от степени проявления их свойств также делятся ещё на три подгруппы.

Для того, чтобы выяснить как влияет на уровень накопления гетерологичного белка второй аминокислотный остаток, нами был сконструирован вектор, несущий бирепортерный ген со вторым триплетом, кодирующим дестабилизирующий аминокислотный остаток — аргинин. В качестве контроля был использован вектор, также несущий бирепортерный ген, но его второй триплет кодировал стабилизирующую аминокислоту — глицин. Сравнительные результаты уровня накопления бирепортерного белка при транзientной экспрессии в растениях показали, что использование кодона, соответствующего дестабилизирующему аминокислотному остатку, приводит к снижению уровня накопления целевого белка на 25-30%.

Таким образом, экспериментальная верификация функциональной значимости размера и состава 5'-нетранслируемой области, кодового состава гетерологичного гена, а также триплетов, кодирующих вторую аминокислоту, показала, что эти регуляторные коды вносят значимый вклад в экспрессию гетерологичных генов на уровне трансляции и стабильности белков в растениях.

Полученные результаты продемонстрировали, что подход, основанный на поиске и апробации регуляторных кодов эффективной трансляции и стабильности белков, позволяет разработать оптимальные системы экспрессии гетерологичных генов в растениях и создать оптимальные экспериментальные модели трансгенных растений, перспективные для фундаментальных исследований и биотехнологии.

Литература

1. von Arnima A. G., Jia Q., Vaughna J. N. Regulation of plant translation by upstream open reading frames. *Plant Science*. 2014. V. 214. P.1– 12.
2. Вячеславова А.О., Мустафаев О.Н., Тюрин А.А., Шимшилашвили Х.Р., Бердичевец И.Н., Шаяхметова Д.М., Голденков М.А., Фадеев В.С., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Серия модульных векторов для стабильной и транзientной экспрессии гетерологичных генов в растениях. *Генетика*. 2012. Т. 48. № 9. С. 1046-1056.

REGULATORY SIGNATURES OF EFFICIENT TRANSLATION AND PROTEIN STABILITY AT THE HETEROLOGICAL EXPRESSION OF GENES IN PLANTS

Tyurin A.A., Mustafaev O., Berdichevets I.N., Sadovskaya N.S., Pavlenko O.S., Fadeev V.S., Goldenkova-Pavlova I.V.

gene expression, translation, stability, protein, plants

Experimental verification of the functional importance of the size and structure 5'-UTR, codon usage of a heterological gene, as well as the triplets encoding the second amino acid, showed that these regulatory codes make a significant contribution to an expression of heterological genes at the level of translation and stability of proteins in plants. The results showed that the approach based on search and approbation of regulatory codes for effective translation and protein stability, allows to develop optimum systems of an expression of heterological genes in plants and to create optimum experimental models of transgene plants, perspective for basic researches and biotechnology.

ВХОД ПРОТОНОВ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ФОТОСИНТЕЗ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Шерстнева О.Н., Сурова Л.М., Катичева Л.А., Гущина Е.В., Сухов В.С.

ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского – национальный исследовательский университет», Гагарина пр-т, 23, г. Нижний Новгород, 603950, Россия, E-mail: sherstneva-oksana@yandex.ru

Pisum sativum, фотосинтез, переменный потенциал, протонная сигнальная система

Введение

В ответ на генерацию и распространение электрических сигналов у растений развиваются функциональные ответы, конечным результатом которых является повышение устойчивости к действию неблагоприятных факторов. В то же время, остаётся неизвестным механизм преобразования электрических сигналов в функциональный ответ и, в частности, пути индукции ответа фотосинтеза. В качестве одной из гипотез рассматривается участие протонной сигнальной системы в этом процессе [1]. В то же время, вопрос возможности такого влияния остаётся дискуссионным.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на 2-3-недельных проростках гороха посевного (*Pisum sativum* L.).

Переменный потенциал (ВП) индуцировался ожогом открытым пламенем. Регистрация электрической активности осуществлялась с помощью стандартной электрофизиологической установки с экстраклеточным отведением.

Исследование параметров фотосинтеза осуществлялось с помощью измерительной системы, включающей РАМ-флуориметр Dual-РАМ-100, газоанализатор GFS-3000, а также измерительный блок Dual-РАМ gas exchange Cuvette 3010-Dual.

В качестве модельной системы для анализа влияния закисления цитоплазмы на параметры фотосинтеза использовался лист интактного растения, погружённый в водный раствор (стандартный раствор, MES-КОН буфер, pH=6,0). Для имитации входа протонов в клетку добавлялся протонофор КЦХФГ, итоговая концентрация которого в кювете составляла 25 мкМ. Изменения фотосинтетической активности проводились с помощью РАМ-флуориметра Dual-РАМ-100 в модификации для работы с водными растворами.

Для ратиометрического анализа изменения pH в цитоплазме использовался pH-чувствительный флуоресцентный зонд BCECF-AM. Интенсивность флуоресценции зонда (525 нм) регистрировалась с помощью спектрофлуориметра Shimadzu RF-5301PC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) и специального выносного блока для твердых образцов. Для анализа использовалось отношение интенсивности флуоресценции на длинах волн возбуждающего света 490 нм и 450 нм I_{490}/I_{450} .

Для регистрации изменения pH апопласта применялся флуоресцентный зонд FITC-декстран, локализующийся в апопласте растения. Для исследования использовалось отношение интенсивности флуоресценции на длинах волн возбуждающего света 490 нм и 460 нм I_{490}/I_{460} . Интенсивность флуоресценции регистрировалась с помощью спектрофлуориметра Shimadzu RF-5301PC и специального выносного блока для твердых образцов.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования влияния электрических сигналов на функциональное состояние растения было показано, что ожог листа вызывал распространяющиеся электрические сигналы по типу переменного потенциала. При прохождении ВП в исследуемый лист наблюдалось снижение уровня ассимиляции CO_2 , уменьшение эффективности переноса электронов в цепи и рост нефотохимического тушения. В отдельных случаях ВП не проходил в исследуемый лист и выраженных изменений параметров фотосинтеза не наблюдалось. Это свиде-

тельствует о том, что электрический сигнал является обязательным условием изменений фотосинтетической активности при нанесении локального повреждения.

Далее были исследованы параметры изменений рН, сопровождавших развитие ВП. Внутриклеточный рН оценивался с помощью флуоресцентного зонда VCECF-AM и в покое составлял 7.1 ± 0.2 . Вариабельный потенциал, вызванный локальным повреждением, вызвал обратимое снижение рН цитоплазмы. рН апопласта, регистрируемый с использованием рН-чувствительного зонда FITC-декстрана, в покое составлял 5.7 ± 0.1 . Развитие ВП в исследуемом листе сопровождалось обратимым повышением рН апопласта. ВП в листьях, содержащих зонд, соответствовал ВП в контроле. При этом амплитуда ВП коррелировала с величиной сдвига рН цитоплазмы ($R=0.80$, $p<0.05$). В то же время, корреляция между амплитудой ВП и изменений рН апопласта оказалась недостоверной ($R=0.61$, $p>0.05$). Такие изменения могут быть связаны с инактивацией H^+ -АТФазы при генерации ВП [2].

Для анализа участия изменений внутриклеточного рН в формировании фотосинтетического ответа был имитирован вход протонов в клетку добавлением протонофора КЦХФГ в среду, омывающую лист интактного растения. При этом было показано, что в ответ на добавление КЦХФГ наблюдалось снижение квантовых выходов фотосистем I и II и рост нефотохимического тушения. Такие изменения соответствуют данным, полученным при генерации ВП, индуцированной локальным повреждением.

Заключение

Таким образом, полученные результаты показывают, что развитие фотосинтетического ответа, индуцированного ВП, по-видимому, обусловлено входом протонов в клетку. Влияние изменений концентрации протонов может быть связано с изменением активности карбоангидраз [1], аквапоринов [3], ферментов цикла Кальвина [4], изменением соотношения CO_2 и HCO_3^- [5], транслокацией и изменением активности ферредоксин:НАДФ⁺-редуктазы [6], а также ростом нефотохимического тушения [7].

Работа поддержана грантами РФФИ № 14-04-01899 А и № 13-04-97152 р_поволжье_а

Литература

1. Grams T.E.E., Lautner S., Felle H.H., Matyssek R., Fromm J. Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf // *Plant, Cell & Environment*. 2009. V. 32. P. 319–326.
2. Stahlberg R., Cleland R.E., Van Volkenburgh E. Slow wave potentials – a propagating electrical signal unique to higher plants // *Communication in Plants. Neuronal Aspects of Plant Life* / Eds Baluska F., Mancuso S., Volkmann D. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. P. 291–309.
3. Gallé A., Lautner S., Flexas J., Ribas-Carbo M., Hanson D., Roesgen J., Fromm J. Photosynthetic responses of soybean (*Glycine max* L.) to heat-induced electrical signalling are predominantly governed by modifications of mesophyll conductance for CO_2 // *Plant, Cell & Environment*. 2013. V. 36. P. 542–552.
4. Wolosiuk R.A., Ballicora M.A., Hagelin K. The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO_2 assimilation: enzyme modulation // *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1993. V. 7. P. 622–637.
5. Bulychev A.A., Cherkashin A.A., Rubin A.B., Vredenberg W.J., Zykov V.S., Müller S.C. Comparative study on photosynthetic activity of chloroplasts in acid and alkaline zones of *Chara corallina* // *Bioelectrochemistry*. 2001. V. 53. P. 225–232.
6. Alte F., Stengel A., Benz J.P., Petersen E., Soll J., Groll M., Bölter B. Ferredoxin:NADPH oxidoreductase is recruited to thylakoids by binding to a polyproline type II helix in a pH-dependent manner // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2010. V. 107. P. 19260–19265.
7. Müller P., Li X.-P., Niyogi K.K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy // *Plant Physiology*. 2001. V. 125. P. 1558–1566.

**PROTON CELLULAR INFLUX AS A PROBABLE MECHANISM OF VARIATION
POTENTIAL INFLUENCE ON PHOTOSYNTHESIS IN HIGHER PLANTS**

Sherstneva O.N., Surova L.M., Katicheva L.A., Guschina E.V., Suckhov V.S.

Pisum sativum, photosynthesis, variation potential, proton signaling system

In this study, proton participation in the influence of VP on photosynthesis in pea was investigated. VP, induced by local heating, inactivated photosynthesis and was accompanied with pH increases in apoplast and decreases in cytoplasm. Imitation of H⁺ influx induced a photosynthetic response that was similar with a VP-induced response. The present results showed that proton cellular influx was the probable mechanism of VP's influence on photosynthesis in pea.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ АФК АПОПЛАСТНЫМИ ПЕРОКСИДАЗАМИ РАСТЕНИЙ

Часов А.В., Викторова Л.В., Миннибаева Ф.В.

ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН,
ул. Лобачевского 2/31, а/я 30, г. Казань, 420111, Россия, E-mail: chasov@mail.knc.ru

пероксидаза, активные формы кислорода, апопласт, НАДН, феруловая кислота, фенолы

Известно, что апопласт выступает в качестве резервуара информации о биотическом и абиотическом окружении клетки и вовлечен в генерацию и/или рецепцию стрессовых сигналов и последующий контроль роста и защиты растительных клеток [1]. В настоящее время считается установленным фактом, что активные формы кислорода (АФК) являются вторичными посредниками, необходимыми при росте, развитии и старении растений [2, 3]. Известно, что при воздействии разнообразных стрессоров как абиотической, так и биотической природы в различных органах и тканях растений может происходить усиленное образование АФК и активирование пероксидазы (РОХ). Вероятно, что активирование РОХ в стрессовых условиях обусловлено присутствием в плазмалемме и клеточной стенке высокомолекулярных слабо- и ионносвязанных изоформ данного фермента [4]. В раннем стрессовом ответе не происходит высвобождение из цитоплазмы вновь синтезированных или существующих внутриклеточных РОХ. РОХ, активируемая в апопласте, является одним из основных компонентов, вовлеченных в образование АФК на клеточной поверхности [3]. Но функционирование данной ферментативной системы остается до сих пор не выясненной. В настоящей работе обсуждаются возможные механизмы, приводящие к образованию АФК апопластными РОХ растений.

Материалы и методы

Объектом исследования служили корни проростков яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казанская Юбилейная. Растительный материал выращивали и обрабатывали согласно методике [4]. Экстраклеточную пероксидазу очищали по описанному ранее методу [5]. Спектральный анализ проводили на Lambda 25 (Perkin Elmer, США) от 1100 нм до 190 нм в течение 125 мин при скорости сканирования 1920 нм/мин с периодом в 5 мин. Спектр поглощения измеряли в смеси (500 мкл): 0,73

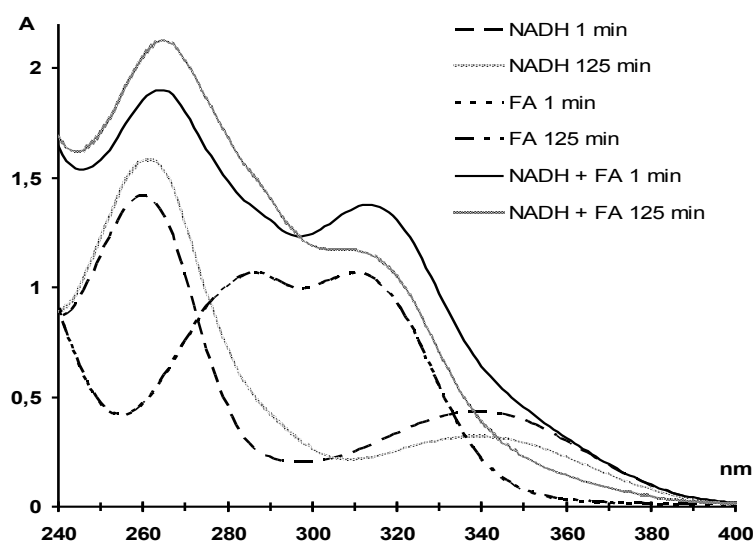


Рисунок 1 - Спектры поглощения при окислении пероксидазой 0,1 мМ феруловой кислоты (FA), 0,1 мМ НАДН и смеси этих веществ при отсутствии экзогенной H_2O_2 .

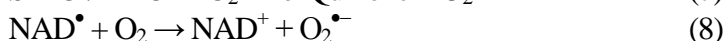
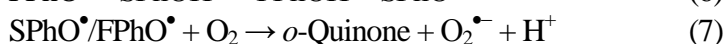
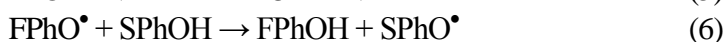
Figure 1 - The absorption spectra of 0.1 mM ferulic acid (FA), 0.1 mM NADH, and mixtures of these substances oxidized by peroxidase in the absence of exogenous H_2O_2 .

мкМ Na-цитратный буфер pH 5.5, 50 мкл частично очищенной РОХ (60 kDa, pI 4.4) с добавлением 0,11 мМ НАДН или 0,1 мМ феруловой кислоты, или смеси этих веществ.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 показано, что частично очищенная РОХ в отсутствие экзогенной H_2O_2 не окисляла феруловую кислоту, но окисляла НАДН. При совместном окислении РОХ этих веществ происходило как окисление феруловой кислоты, так и усиление окисления НАДН, о чем свидетельствует значительное снижение оптической плотности в областях 311 нм и 338 нм, являющихся максимумами для феруловой кислоты и НАДН соответственно. Известно, что РОХ обладает НАДН оксидазной функцией, при этом может происходить образование

H_2O_2 , уравнение (1) [6, 7]. Предполагается, что при образовании H_2O_2 в качестве восстановителя, кроме пиридиннуклеотидов, также могут выступать аскорбиновая кислота и тиолы [6]. Появление H_2O_2 может запускать реакции по схеме Чанса [7-9], в результате которых образуются радикальные продукты субстратов, уравнения (2-4). Ниже приведена схема предполагаемых реакций:



где, POX, CoI, CoII, CoIII – различные состояния пероксидазы, FPh и SPh – быстрый и медленный фенольный субстрат соответственно.

Таким образом, NADH или какой-либо другой восстановитель выступает в качестве триггера последующей цепи реакций. Мы предполагаем, что одним из субстратов при образовании АФК пероксидазой может являться феруловая кислота [10]. Известно, что при наличии субстрата-активатора концентрации соединений CoI и CoII выше, чем в его отсутствие, поэтому и происходит эффект усиления образования радикалов субстрата, уравнения (3, 4) [8]. В наших экспериментах в качестве активатора выступала феруловая кислота. Известно, что POX имеет широкую специфичность в отношении субстратов, которые могут отличаться по своей реакционной способности [8, 11]. Их условно подразделяют на быстрые и медленные. При совместном окислении двух субстратов наблюдается их взаимовлияние. Ранее с использованием POX пшеницы нами было показано, что феруловая кислота и кониферилловый спирт активировались вторым, более быстрым, субстратом (*o*-дианизидином) [10]. А окисление дианизидина подавлялось феруловой кислотой и кониферилловым спиртом. При совместном окислении субстратов POX с резко различающейся реакционной способностью наблюдаются эффекты взаимной активации или ингибирования [8]. При этом происходит активация окисления медленно окисляемого субстрата и частичное или полное ингибирование превращения быстро окисляемого субстрата (активатора) [8, 11]. Можно полагать, что окисление феруловой кислоты стимулирует окисление NADH посредством образования радикальных форм феруловой кислоты. Таким образом может осуществляться неферментативный путь образования радикала субстрата/восстановителя при взаимодействии с радикалом активатора, уравнения (5, 6). Роль пероксидазы в этом случае сводится к генерированию промежуточных свободнорадикальных частиц, а полуокисленные субстраты (свободные радикалы) находятся в растворе и не связаны с ферментом [8]. В результате этого, фенольные радикалы могут взаимодействовать между собой и с кислородом, образуя супероксид и ортохинон, уравнения (5-7) [8, 11]. В свою очередь, радикальная форма восстановителя также может взаимодействовать с кислородом, уравнение (8) [7, 9]. Хотя для окисления NADH до NAD^+ требуется перенос двух электронов, полуокисленный восстановитель (NAD^\bullet) будет быстрее взаимодействовать с кислородом, образуя $\text{O}_2^{\bullet-}$, уравнение (8), чем с промежуточным соединением фермента, как показано с использованием POX хрена [9].

Вероятно, что значительное активирование АФК-образующей POX в стрессовых условиях обусловлено субстрат – субстратным взаимодействием, имеющим решающее значение для стресс-индуцированного окислительного взрыва в растительных клетках. Неспецифичность действия пероксидазы заключается в том, что любое воздействие стрессора приводит к модификации плазмалеммы, изменению ионных потоков, сдвигу pH апопласта в щелочную сторону и выходу восстановителей, что является необходимым условием для апопластного окислительного взрыва, в котором участвует POX [3, 12]. Поскольку в апопласте всегда присутствует пул растворимых пероксидаз и медленно окисляемых субстратов, можно полагать, что для мгновенного ответа достаточно высвобождения небольшого количества быстро окисляемого субстрата/восстановителя, кофактора или индуктора. Последующее нарастание ответа может осуществляться как за счет высвобождения до-

полнительного количества фермента, так и появления субстратов. Таким образом, ключевая роль экстраклеточных РОХ заключается в регуляции баланса АФК в апопласте растительных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 13-04-00865, № 14-04-00205), гранта президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ-825.2012.4), программы фундаментальных исследований Президиума РАН по "Молекулярной и клеточной биологии" (руководитель А.Н. Гречкин).

Литература

1. Dumas B, Bottin A, Gaulin E, Esquerré-Tugayé MT. Cellulose-Binding Domains: Cellulose Associated-Defensive Sensing Partners? // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 160-164.
2. Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов Вл.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 2. С. 163-178.
3. O'Brien J.A., Daudi A., Butt V.S., Bolwell G.P. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism // Planta. 2012 V. 236. № 3. P. 765-779.
4. Часов А.В., Минибаева Ф.В. Методические подходы к исследованию редокс-активности апопласта. 1. Механизмы высвобождения пероксидаз // Физиология растений. 2014. Т. 61. № 4. С. 1-9.
5. Minibayeva F., Mika A., Lüthje S. Salicylic acid changes the properties of extracellular peroxidase activity secreted from wounded wheat (*Triticum aestivum* L.) roots // Protoplasma. 2003. V. 221. P. 67-72.
6. Bolwell G.P., Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of oxygen species in plant defence – a broad perspective // Physiol. Mol. Plant Pathol. 1997. V. 51. P. 347-366.
7. Halliwell B. Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols // Planta. 1978. V. 140. P. 81-99.
8. Лебедева О.В., Угарова Н.Н. Механизм пероксидазного окисления. Субстрат-субстратная активация в реакциях, катализируемых пероксидазой хрена. // Изв. АН, серия химия. 1996. № 1. С. 25-32.
9. Лебедева О.В., Угарова Н.Н. Стационарная кинетика реакции окисления NADH пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена // Биохимия. 1997. Т. 62. Вып. 2. С. 249-253.
10. Часов А.В., Минибаева Ф.В. Действие экзогенных фенолов на супероксидобразующую способность экстраклеточной пероксидазы корней проростков пшеницы // Биохимия. 2009. Т. 74. Вып. 7. С. 946-955.
11. Takahama U. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions // Phytochemistry Rev. 2004. V. 3. P. 207-219.
12. Bolwell G.P., Bindschedler L., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S., Gerrish C., Minibayeva F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. № 372. P. 1367-1376.

PUTATIVE MECHANISMS OF ROS GENERATION BY PLANT APOPLASTIC PEROXIDASES

Chasov A.V., Viktorova L.V., Minibayeva F.V.

peroxidase, reactive oxygen species, apoplast, NADH, ferulic acid, phenols

Apoplastic peroxidases oxidize NADH but not ferulic acid in the absence of exogenous H₂O₂. Simultaneous application of NADH and ferulic acid into the reaction mixture induces first, the oxidation of ferulic acid and then stimulates NADH oxidation by peroxidase. These findings decipher the mechanisms of the production of reactive oxygen species by apoplastic peroxidases during oxidative burst.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТОННЫХ ПОМП ПЛАЗМАЛЕММЫ И ТОНОПЛАСТА НА ТРАНСКРИПЦИОННОМ УРОВНЕ

Чень Т., Прокопьева Ю.П., Емельянов В.В., Шишова М.Ф.

ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Университетская наб., 7-9, г. Санкт-Петербург, 199034, Россия, E-mail: mshishova@mail.ru

рост растяжением, H⁺-АТФаза, плазмалемма, тонопласт

Введение

В клетках растений имеется большое число ферментов, которые катализируют разнообразные биохимические процессы. Среди этих ферментов особое место принадлежит H⁺-АТФазе плазмалеммы. Данная ферментная система выполняет, казалось бы, весьма непримечательную роль, гидролизуя молекулы АТФ. Но наряду с этим она осуществляет и необычную функцию. H⁺-АТФаза использует энергию, освобождающуюся при гидролизе АТФ для того, чтобы переносить через клеточную мембрану ионы водорода. Тем самым создается электрохимический градиент ионов водорода, который имеет огромное значение в поддержании жизнеспособности растительной клетки.

Уникальное свойство растительных клеток, существенно отличающее их от животных – рост растяжением. Этот тип роста рассматривается как разновидность движения растений. В качестве примера можно привести процессы, лежащие в основе целого ряда морфофизиологических изменений, получивших название тропизмов. Ключевую роль в процессе растяжения играет H⁺-АТФаза плазмалеммы.

Рост растяжением – это интегральный процесс, в реализацию которого включены все компартменты клетки и в первую очередь – вакуоль. Следовательно можно предположить, что наряду с H⁺-АТФазой плазмалеммы в реализации роста растяжением принимает участие H⁺-АТФаза тонопласта и вакуолярная H⁺-пирофосфатаза, так как эти ферменты являются важнейшими компонентами протонной сигнальной системы и рН-стата клетки.

В связи с тем, что данные о возможном соподчинении активности H⁺-помп плазмалеммы и тонопласта, а также зависимости такового от физиологического статуса клетки данное исследование нацелено на изменение активности H⁺-АТФаз плазмалеммы и тонопласта, а также вакуолярной H⁺-пирофосфатазы в ходе роста растяжением на примере клеток суспензионной культуры табака VBI-0.

Материалы и методы

Растительный материал. Модельным объектом является клеточная популяция, взятая из сердцевины *Nicotiana tabacum* (VBI-0-культура, *Virginia Bright, Italia*). Существенным преимуществом является то, что эта клеточная культура состоит из физиологически однородных клеток и характеризуется синхронным переходом из одной фазы клеточного цикла в другую, т.е. от деления к росту растяжением и т.д. (Zazimalova et al., 1993). Суспензию культивировали в темноте, при температуре 25°C, при постоянном перемешивании на ротационном шейкере (при 90 оборотах в минуту). Пересадку суспензионной культуры на свежую среду проводили через 4 недели. Для исследования активности H⁺-АТФазы и экспрессии генов использовались клетки суспензии в возрасте 7, 14 и 21 суток.

Количественный анализ экспрессии генов оценивали с помощью стандартной процедуры ПЦР с детекцией в реальном времени.

Получение общей микросомальной фракции проводили с помощью дифференциального ультрацентрифугирования.

Определение содержания белка в мембранной фракции проводили микрометодом М. Бредфорд.

Гидролитическую активность фракции оценивали по накоплению неорганического фосфата спектрофотометрическим методом.

Определение числа ферментных комплексов в микросомальной фракции оценивали с помощью Вестерн-блотт анализа.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования показано усиление экспрессии генов *PMA1*, *PMA2*, *PMA3*, *PMA5*, кодирующих H^+ -АТФазу плазмалеммы на 2 неделю развития суспензионной культуры табака. Наряду с этим выявлено усиление экспрессии гена *NtVaB*, кодирующего В субъединицу H^+ -АТФазы тонопласта. Вестерн-блотт анализ доказал, что усиление экспрессии генов, кодирующих H^+ -АТФазу плазмалеммы, соответствует увеличению содержания фермента в составе фракции плазмалеммы, полученной из клеток табака. Аналогично - усиление экспрессии гена, кодирующего В субъединицу H^+ -АТФазы тонопласта, коррелирует увеличением содержания фермента в составе обшемикросомальной фракции. И, наконец, максимальной гидролитической активностью характеризуется фракция плазматической мембраны, полученная из клеток суспензионной культуры на 2 неделю развития при максимальной интенсивности роста растяжением.

Заключение

На модельной системе, представленной синхронизированными клетками суспензионной культуры табака VBI-0, выявлено нелинейное изменение активности H^+ -АТФаз как плазмалеммы, так и тонопласта, что обусловлено не только пост-трансляционными изменениями ферментов, но и вовлечением транскрипционной регуляции. Было показано, что экспрессия ряда генов, кодирующих протон-транспортирующие ферменты или их субъединицы, усиливается на этапе активного роста растяжением, что приводит к увеличению ферментных комплексов в составе соответствующих мембран.

Литература

1. Zazimalova E, Opatrny Z, Brezinova A, Eder F The effect of auxin starvation on the growth of auxin-dependent tobacco cell culture: dynamics of auxin-binding activity and endogenous free IAA content // J. Exp. Bot. 1993. 46. 1205-1213.

THE REGULATION OF PROTON PUMPS IN PLASMA MEMBRANE AND TONOPLAST AT THE TRANSCRIPTION LEVEL

Chen T., Prokopieva Ju., Yemelyanov V., Shishova M.

elongation growth, H^+ -ATPase, plasma membrane, tonoplast

The results, obtained with tobacco cell culture VBI-0, showed an increase in the expression of genes encoding H^+ -ATPases or its subunits at the stage of the most intensive elongation growth. This phenomenon was accompanied with the increase in number of the enzymes in the plasma membrane and tonoplast. Thus the complex scheme in regulation of H^+ -ATPases of plant cell during elongation growth is suggested.

УПРАВЛЕНИЕ ПРОДУКЦИОННЫМИ ПРОЦЕССАМИ РАСТЕНИЙ ЧЕРЕЗ ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АПОПЛАСТНОЙ ИНВЕРТАЗЫ

Чиков В.И., Баташева С.Н.

ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН,
ул. Лобачевского 2/31, а/я 30, г. Казань, 420111, Россия, E-mail: vichikov@bk.ru

фотосинтез, транспорт ассимилятов, апопласт, инвертаза, продукционный процесс

Введение

Фотосинтез, как основа продукционного процесса растения, в большой мере зависит от транспорта сахаров из листьев в потребляющие продукты фотосинтеза органы. При этом интенсификация фотосинтеза невозможна без повышения оттока сахаров из листьев (Чиков, 2008). При выходе сахарозы из фотосинтезирующих клеток во внеклеточное пространство (апопласт) для «загрузки» в сосуды флоэмы она частично гидролизуется апопластной инвертазой до глюкозы и фруктозы, которые возвращаются в клетки мезофилла (Курсанов, 1984), и могут ингибировать фотосинтез по принципу обратной связи (Paul, Pellny, 2003). Это свидетельствует о большом значении апопластной инвертазы в регуляции фотосинтеза и транспорта ассимилятов. Поскольку внеклеточная инвертаза – фермент активный только в кислой среде, то для подавления его активности необходимо прижизненно и на длительный срок функционирования листьев повысить в них рН внеклеточной жидкости. Решение такой задачи позволит интенсифицировать отток сахаров из листьев и увеличить эффективность фотосинтеза в формировании урожая

Материалы и методы

Для решения задачи увеличения рН в апопласте за основу нами были взяты ионы тяжелых металлов (медь и цинк). Ионы металлов, при сохранении своего положительного заряда и в адсорбированном на полимере состоянии, должны выталкивать из водной среды апопласта положительно заряженные ионы водорода (т.е. повышать рН). Такая ситуация была реализована нами путем использования комплексных соединений металлов с аммиаком (аммиакаты). Поскольку присутствующие в составе аммиакатов ионы металла внутри листа находятся постоянно в адсорбированном состоянии на поверхности клеточных стенок, то для изменения рН их требуется очень мало, и эффективная концентрация составляет $10^{-5} - 10^{-6}$ М и не может оказывать негативного влияния на окружающую среду. Аммиакаты – это комплексы металлов с аммиаком. Их общая формула:

$[\text{Металл} \cdot (\text{NH}_3)_n]^{+m} \cdot (\text{Анион})^{-m}$, где в качестве металлов были использованы медь и цинк, а в качестве анионов - карбонат CO_3^{2-} или остаток яблочной кислоты

Известно, что тяжелые металлы адсорбируются на полимерах клеточной стенки (Blinda et al., 1997), и в случае аммиакатов это должно, по-видимому, происходить следующим образом. При образовании аммиакатов ионы меди (или цинка) притягивают к себе молекулы аммиака путем смещения их электронных облаков в сторону Cu^{2+} . Ион металла, окруженный молекулами аммиака, сохраняет свой общий положительный заряд $2+$ и в адсорбированном состоянии и, тем самым, повышают рН среды.

Для проверки влияния аммиакатов на фотосинтез и фотосинтетический метаболизм углерода раствор аммиаката меди вводили с транспирационным током воды в срезанный побег льна-долгунца, как это было описано в работе [Chikov et al., 2001], а затем изучали характер распределения ^{14}C среди продуктов 3-х минутного фотосинтеза $^{14}\text{CO}_2$. Поскольку инвертаза апопласта влияет на экспорт сахарозы из листа, то было проверено влияние аммиакатов на накопление сахарозы в корнеплоде и урожай сахарной свеклы в мелко деляночных опытах. Также проверено действие аммиакатов на ростовые процессы гороха, яровой и озимой пшеницы.

Результаты и обсуждение

Введение в побег льна-долгунца раствора аммиакатов цинка и меди вызвало существенные изменения в распределении ^{14}C среди продуктов 3-х минутного фотосинтеза $^{14}\text{CO}_2$ (табл. 1). Независимо от возраста листьев увеличилось отношение сахароза/гексозы, а гликолатный путь становился

более замкнут на цикл Кальвина, о чем свидетельствует снижение отношения серин/глицерат. Обращает на себя внимание повышение у опытных растений радиоактивности малата, который участвует в циркуляции калия, переносящего нитратный ион из корней в листья [Липс, 1997]. Таким образом, комплексы ионов меди и цинка с аммиаком оказывают влияние на фотосинтез и транспорт сахаров. На основании этого следовало ожидать и интенсификации продукционного процесса. Первым объектом для такой проверки нами была выбрана сахарная свекла, так как у этого растения и запасание в хозяйственно важном органе происходит в виде сахарозы.

Таблица 1 - Влияние введения раствора аммиаков цинка и меди (10^{-6} М) с транспирационным током воды в апопласт побега на распределение ^{14}C среди меченых продуктов 3 минутной фотоассимиляции $^{14}\text{CO}_2$ листьями льна-долгунца (% радиоактивности водо-этанольной фракции)

Table 1 - The influence of feeding zinc and cuprum ammoniate solutions (10^{-6} M) into the shoot apoplast through the transpiration water stream on ^{14}C partitioning among the labeled products of 3 min photosynthetic assimilation of $^{14}\text{CO}_2$ by leaves of flax (% radioactivity of water-ethanol soluble fraction)

Меченые соединения	Зрелые листья (экспортеры)		Ювенильные листья (акцепторы)	
	контроль (вода)	аммиакаты	контроль (вода)	аммиакаты
Сахароза	59,4± 1,6	59,3± 1,1	40,1± 1,5	45,4 ±1,7
Гексозы	4,3± 0,5	3,3± 0,1	8,3 ±0,6	6,1 ±0,7
Сахароза/гексоза	14,4	18,0	4,8 ± 0,5	7,4 ± 0,6
Аминокислоты	22,0 ± 1,2	19,3 ± 1,1	30,0 ±1,7	27,3± 1,6
Серин	5,7 ± 0,3	4,8 ± 0,3	9,5 ± 0,4	7,2 ± 0,5
Малат	1,8± 0,1	3,9± 0,3	4,5 ±0,2	5,6± 0,3
Глицерат	0,8 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,7 ± 0,3	3,6 ± 0,3
Олигосахара	2,9± 0,2	2,3± 0,1	4,0± 0,3	0,6 ±0,1

Опрыскивание листьев сахарной свеклы раствором аммиаков цинка и меди повышало сахаристость сока сахарной свеклы (табл. 2). Однако это действие было непродолжительным и сохранялось не более 10-15 дней после обработки, что вероятно соответствует времени функционирования обработанных листьев.

Таблица 2 - Влияние обработки посева сахарной свеклы аммиакатами на сахаристость (%) сока корнеплодов при различных сроках опрыскивания

Table 2 - The influence of spraying of sugar beet plantings at different times with ammoniates on sugar content (%) in root crop juice

Вариант, срок обработки	14 августа	28 августа	10 сентября	24 сентября
Контроль	18,0 ± 0,3	20,2 ± 0,1	20,0 ± 0,2	20,5 ± 0,2
Обработка 14 августа	-	21,0 ± 0,3	20,8 ± 0,2	20,1 ± 0,3
Обработка 10 сентября	-	-	-	23,6 ± 0,3

Интенсификация оттока сахаров из листьев способствовала не только повышению содержания сахара в корнеплоде, но и ростовым процессам всего растения. Более ранняя обработка растений не оказала особого влияния на сахаристость корней, но существенно увеличила массу растения. Это означает, что при создании благоприятных условий растение действует по экстенсивному сценарию. Сначала развивается мощность фотосинтетического аппарата растения, а уже потом увеличивается репродуктивный или запасающий продукты фотосинтеза орган. Важно, что эффект от обработки аммиакатами оказался зависимым от уровня вносимых в почву азотных удобрений. При более низких дозах азотных удобрений положительное влияние аммиаков возрастало. В результате оказалось, можно увеличить урожайность при одновременном снижении использования минеральных азотных удобрений. Расчет баланса азота в системе почва-растение показал, что по-

явилось некоторое количество дополнительного азота. Величина этого избыточного количества азота уменьшалась (с 59 до 47кг/га) с увеличением количества вносимых с весны азотных минеральных удобрений (рис. 1).

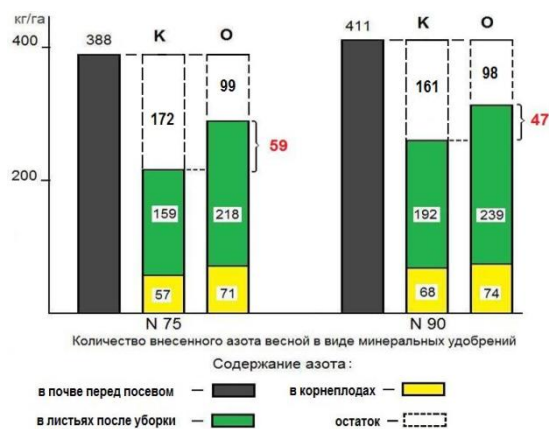


Рисунок 1 - Влияние обработки посева сахарной свеклы на баланс азота в системе почва-растение при разном уровне вносимых в почву минеральных азотных удобрений

Figure 1 – The effect of sugar beet treatment on the nitrogen balance in the system soil - plant under the different levels of mineral N-fertilizers

Усиление потока ассимилятов в корни обеспечивает дополнительным питанием и микробов-свободных азотфиксаторов. Известно, что активность свободных азотфиксаторов в почве подавляется нитратами.

Таблица 3 - Влияние аммиакатов на сырую массу растений (г) сахарной свеклы (в числителе - масса целого растения, в знаменателе - масса корнеплодов).

Table 3 - The influence of ammoniates on fresh weights (g) of sugar beet plants (the weight of a whole plant is written in a numerator, and this of a root crop – in a denominator)

Вариант опыта	Сроки анализа			
	14.08	28.08	10.09	24.09
Контроль	$\frac{579 \pm 70}{284 \pm 38}$	$\frac{756 \pm 61}{426 \pm 39}$	$\frac{776 \pm 74}{474 \pm 50}$	$\frac{730 \pm 106}{512 \pm 42}$
Обработка 14.08	-	$\frac{761 \pm 123}{418 \pm 75}$	$\frac{950 \pm 66}{614 \pm 43}$	$\frac{1056 \pm 151}{671 \pm 100}$
Обработка 14.08 + 28.08	-	-	$\frac{884 \pm 107}{566 \pm 81}$	$\frac{1046 \pm 64}{641 \pm 46}$
Обработка 10.09	-	-	-	$\frac{821 \pm 79}{562 \pm 56}$

Таким образом, используя аммиакаты, можно при уменьшении использования минеральных удобрений увеличивать продуктивность растений и количество органического вещества в почве, повышая, тем самым, ее плодородие.

CONTROL OVER PLANT PRODUCTIVITY BY CHANGING APOPLASTIC INVERTASE ACTIVITY

Chikov V.I., Batasheva S.N.

photosynthesis, assimilate transport, apoplast, invertase, productivity

A means of regulation of assimilate export from leaves by changing the pH of extracellular media with cuprum and zinc ammoniates is proposed. It was shown that feeding ammoniates into the shoot apoplast through the transpiration water stream or spraying native plants with ammoniate solutions resulted in increased carbohydrate synthesis from $^{14}\text{CO}_2$ in photosynthesis, the higher labeled sucrose to hexoses ratio, enhanced growth processes and productivity.

МНОГООБРАЗИЕ РЕГУЛЯЦИИ ПРОТОННЫХ ПОМП ПЛАЗМАЛЕММЫ И ТОНОПЛАСТА В ХОДЕ РОСТА РАСТЯЖЕНИЕМ

Шишова М.Ф.

ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Университетская наб., 7-9, г. Санкт-Петербург, 199034, Россия, E-mail: mshishova@mail.ru

рост растяжением, H⁺-АТФаза, H⁺-пирофосфатаза, ауксин, протонная сигнальная система

Введение

Многokратное увеличение клетки, как и любой морфофизиологический процесс, затрагивает все компартменты клетки. Рост растяжением включает в себя несколько этапов, заключающихся в последовательном соизменении тургорного и осмотического давления, размягчении клеточной стенки, усилении синтетических процессов, приводящих к удлинению плазмалеммы, тонопласта, формированию вторичной клеточной стенки и т.п. Изменение тургорного давления и размягчение клеточной стенки опосредовано активацией H⁺-АТФазы плазмалеммы. Резкое изменение объема вакуоли, отражающее изменение осмотического давления, невозможно без вовлечения протонных насосов тонопласта. Следует подчеркнуть, что все перечисленные процессы связаны с энергизацией (изменением величины трансмембранного потенциала) на плазмалемме и тонопласте, а, следовательно, являются процессами энергетически затратными и определяются физиологической активностью клетки. Концентрация макроэргов и осмотически активных соединений определяется стадией развития клетки и, тем самым, может приводить к перераспределению функций протонных насосов плазмалеммы и тонопласта в ходе роста растяжением. Предыдущие исследования позволили предложить схему изменения активности H⁺-АТФаз плазмалеммы и тонопласта, а также вакуолярной пирофосфатазы. Полученные ранее результаты (Рудащевская и др., 2005; 2009; Шишова и др., 2012) свидетельствуют о нелинейном изменении активности протонных насосов клетки в ходе роста растяжением. Тем не менее, не ясно, связано ли изменение активности транспортеров с изменением числа ферментных комплексов, а, следовательно, с регуляцией на транскрипционном уровне, или опосредовано изменением их свойств в результате пост-транскрипционных перестроек. В связи с этим особой интерес представляет собой проведение исследований на модельных объектах с расширенным геномом.

Будет представлен сравнительный анализа изменения экспрессии генов, кодирующих H⁺-АТФазы плазмалеммы и тонопласта, а также вакуолярную пирофосфатазу в ходе роста растяжением и при действии фитогормона ауксина. Впервые будет предложена модель многоуровневой регуляции работы H⁺-помп плазмалеммы и тонопласта на транскрипционном и пост-трансляционном уровнях.

Материалы и методы

Растительный материал. Семена *Arabidopsis thaliana* (экопип Columbia) высаживали на стерильную минеральную среду Мурасиге и Скуга (2,2 г/л) с добавлением сахарозы (5 г/л), содержащую в качестве твердого носителя агар (7 г/л), pH среды 5,7-5,8. В каждую чашку Петри (диаметр 100 мм) и содержащую 30 мл среды высаживали по 50 семян в два ряда. Проростки выращивали в стерильных условиях, вертикально в темноте при комнатной температуре в течение 9 дней

Количественный анализ экспрессии генов оценивали с помощью стандартной процедуры ПЦР с детекцией в реальном времени.

Получение общей микросомальной фракции проводили с помощью дифференциального ультрацентрифугирования.

Определение содержания белка в мембранной фракции проводили микрометодом М. Бредфорд.

Определение числа ферментных комплексов в микросомальной фракции оценивали с помощью Вестерн-блотт анализа.

Результаты и обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что на этапе, предшествующем удлинению клеток, преимущественно усиливается транскрипция гена, кодирующего H^+ -пирофосфатазу — фермент, обуславливающий поддержание рН цитоплазмы и транспортные процессы на тонопласте в отсутствие или при значительно сниженной концентрации АТФ и преобладании пирофосфата. Последующее развитие клетки и переход к росту растяжением сопровождаются усилением экспрессии генов, кодирующих H^+ -АТФазы плазмалеммы и тонопласта, что увеличивает число этих ферментов в составе соответствующих мембран, а, следовательно, обеспечивает механизм реализации ростовых процессов.

Выводы

Результаты, полученные на транскрипционном уровне, полностью подтверждают предложенную ранее модель изменения активности протон-транспортирующих ферментов плазмалеммы и тонопласта. Рассматривается роль фитогормона ауксина в модуляции работы основных ферментных систем протонной сигнальной системы растительных клеток в ходе инициации и реализации роста растяжением.

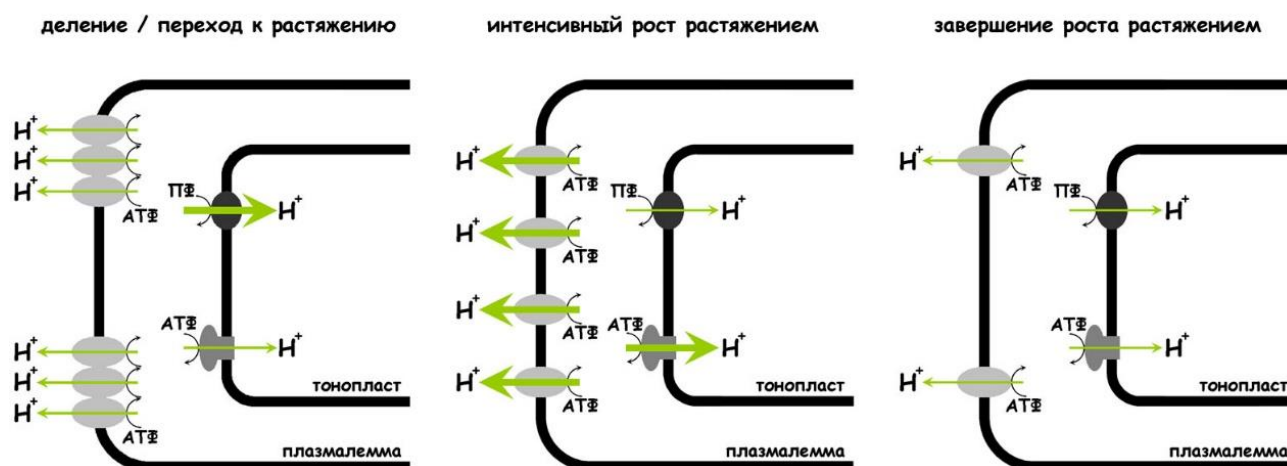


Рисунок 1 - Гипотетическая модель перераспределения функций между основными протон-транспортирующими насосами растительной клетки в процессе роста растяжением (Шишова и др., 2012).

Figure 1 - Hypothetical scheme of the redistribution of functions between the most important proton-transporting pumps of plant cells during elongation growth (Shishova et al., 2012).

Литература

1. Рудашевская Е.Л., Кирпичникова А.А., Шишова М.Ф. Активность H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток coleoptилей в процессе развития проростков кукурузы // Физиол.раст. 2005. 52 (4). 566-572.
2. Шишова М.Ф., Танкелюн О.В., Рудашевская Е.Л., Емельянов В.В., Шахова Н.В., Кирпичникова А.А., Изменение транспортной активности протонных насосов клеток coleoptилей на ранних этапах развития проростков кукурузы. // Онтогенез 2012, 3(6), 413-424.

THE VARIETY IN REGULATION OF PROTON PUMPS IN PLASMA MEMBRANE AND TONOPLAST DURING ELONGATION GROWTH

Shishova M. F.

elongation growth, H⁺-ATPase, H⁺-pyrophosphatase, auxin, proton signaling

The results, obtained at transcriptional level, prove early suggested model of the shift in the activity of proton-transporting enzymes of plasma membrane and tonoplast. The role of phytohormone auxin in the modulation of the main enzymes of plant cell proton signaling network during initiation and further realization of elongation growth is discussed.

**РЕАКЦИЯ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ ЛИСТЬЕВ
BETULA PENDULA ROTH НА УДОБРЕНИЯ**

Шуляковская Т.А., Ильинова М.К.

Учреждение РАН Институт леса КарНЦ РАН, ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, 185910,
Россия, E-mail: tashulyak@gmail.com

береза повислая, карельская береза, ауксибласты, брахибласты, жирные кислоты, линолевая кислота, линоленовая кислота, азотные удобрения, комплексные удобрения

Введение

Главная функция мембранных липидов состоит в том, что они формируют бислойный матрикс, с которым взаимодействуют белки. Важным параметром, определяющим активность большинства мембранных ферментов, безусловно, является физическое состояние бислоя. Увеличение содержания ненасыщенных липидов ведет к уменьшению плотности упаковки липидов в мембране и, таким образом, поддерживает текучесть мембраны. Липиды действуют как аллостерический регулятор, модулирующий активность ферментов [1]. Одной из важнейших биологических функций мембранных липидов является функция приспособительная, адаптационная [2].

Мембраны хлоропластов показывают высокую степень пластичности и адаптации к различным условиям, важным для их эффективного функционирования. Главный механизм для адаптации – изменение жирнокислотного состава мембранных липидов.

Гликолипиды входят в состав мембран хлоропластов, главной жирной кислотой которых является α -линоленовая кислота (18:3), участвующая в биогенезе хлоропластов [3,4]. Она служит для поддержания цепи транспорта электронов и взаимосвязанного с ним процесса фосфорилирования [5]. В работах на ячмене было показано, что фотосинтетическая активность листьев зависит от соотношения жирных кислот линоленовая /линолевая (18:3/18:2). Мембраны хлоропластных тилакоидов поддерживают стабильность фотосинтетического механизма [6]. Повышение содержания триеновых кислот, в частности линоленовой (18:3) обеспечивает более высокий уровень фотосинтетических процессов [4,7].

Целью настоящей работы было исследование жирнокислотного состава мембранных липидов – гликолипидов - листьев двух типов побегов (ауксибластов и брахибластов) саженцев двух форм березы *Betula pendula* Roth в естественных (контрольных) условиях в различные периоды развития листьев, а также при подкормках азотными удобрениями и комплексными удобрениями NPK.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись 6-летние (в 2012 году) и 5-летние (в 2013 году) саженцы карельской березы *Betula pendula* Roth var. *carelica* и обычной березы повислой *B. pendula* var. *pendula*. Были выделены по три группы двух форм березы, в каждой из которых подобраны по три дерева одного класса развития. Первая из групп представляла контроль, саженцы которой росли без удобрений. Вторая группа – это растения, удобрявшиеся азотными удобрениями (азотнокислым аммонием) и третью группу подкармливали комплексными удобрениями NPK. В 2012 году внесли за сезон по 56 г азота на дерево (6 внесений в течение июня – июля), а в 2013 году по 40 г азота на дерево по действующему веществу. В комплексном удобрении азот также был в виде NH_4NO_3 , фосфор в виде P_2O_5 , калий – в виде K_2CO_3 , исходя из соотношения элементов 100:10:50 (20г:2г:10г на дерево). Отбор листьев на анализ производили в начале июня, когда шел активный рост листовой пластинки, в начале июля, когда лист полностью сформировался, в середине июля – в период активного оттока сахарозы из листьев. Листья выдерживали в камере глубокой заморозки при -75°C , высушивали в лиофильной сушилке. Высушенный материал измельчали на электрической мельнице,

просеивали на сите в 1 мм и далее проводили экстракцию липидных соединений. Суммарные липиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола в соотношении 2:1 по объему. Фракционирование суммарных липидов осуществляли методом колоночной хроматографии с силикагелем Davisil 100-200 mesh. Гликолипиды (ГЛ) элюировали ацетоном. Жирные кислоты гликолипидов исследовали в виде их метиловых эфиров, которые получали переэтерификацией липидов метанолом в присутствии ацетилхлорида, и разделяли на хроматографе «Хроматэк – Кристалл-5000.1» (Йошкар-Ола, Республика Марий Эл).

Результаты и обсуждение

Опыты с применением удобрений двух видов по составу показали, что подкормки NPK приводили к заметному росту содержания линоленовой кислоты в гликолипидах листьев ауксипластов 6-летних саженцев карельской березы, причем, чем дольше проводилась подкормка, тем выше поднимался уровень линоленовой кислоты. Внесение азотных удобрений под саженцы карельской березы приводило к росту содержания линоленовой кислоты только в начальный период подкормок. Подобно содержанию кислоты под влиянием комплексных удобрений изменялось и соотношение линоленовой и линолевой кислот в гликолипидах листьев карельской березы (рис. 1Б).

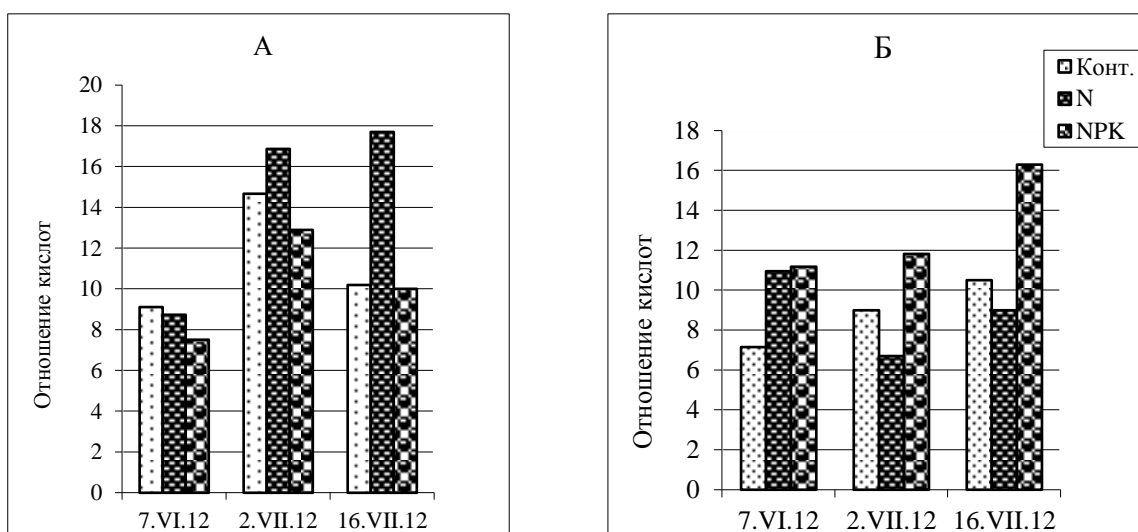


Рисунок 1 - Соотношение содержания C₁₈ – кислот в гликолипидах листьев ауксипластов 6-летних саженцев березы повислой (А) и карельской березы (Б) при удобрении

Figure 1- Ratio of C₁₈ – acids from glycolipids of auxiblasts leaves of the 6-year-old seedlings of silver birch (A) and curly birch (B) during fertilization

У саженцев березы повислой повышение соотношения этих ключевых жирных кислот происходило под влиянием азотных удобрений (рис.1А). Подобная реакция на удобрения наблюдалась и в листьях брахибластов: у карельской березы соотношение линоленовой и линолевой кислот было выше в варианте с комплексной подкормкой, у березы повислой – с подкормкой азотом. Эксперименты с азотными и комплексными удобрениями были продолжены в 2013 году на 5-летних саженцах берез. К концу периода формирования листьев проявилась та же закономерность, что и в 2012 году: величина соотношения C₁₈- кислот выросла в листьях березы повислой под влиянием азотных подкормок, а у карельской березы под воздействием комплексных удобрений.

Таким образом, саженцы двух форм березы (обычной березы повислой и карельской березы), произрастая в одинаковых условиях и получая одинаковые подкормки, по-разному реагировали на них. Об этой реакции мы судили по отношению ключевых C₁₈- кислот (линоленовой 18:3 и линолевой 18:2) в основных мембранных липидах хлоропластов – гликолипидах, учитывая тот факт, что α-линоленовая кислота участвует в биогенезе хлоропластов, а соотношение кислот 18:3 / 18:2 отражает фотосинтетическую активность листьев. Под влия-

нием подкормок мембраны хлоропластов приспособляются к новым условиям произрастания (к поступлению из почвы минеральных элементов в новом соотношении) путем изменения жирнокислотного состава мембранных липидов (гликолипидов), оптимизируя фотосинтетическую активность листьев саженцев березы.

Заключение

Обычная береза повислая заметней реагирует на дополнительное поступление азота в корни, а карельская береза показывает рост соотношения C₁₈- кислот в гликолипидах листьев в ответ на внесение комплексного удобрения. Разная реакция растений на одинаковые воздействия говорит о различиях в их метаболизме, о разных требованиях к условиям произрастания для формирования ассимиляционного аппарата листьев. Значит, карельская береза, которая в возрасте 5-6 лет только начинала проявлять внешние особенности строения ствола данной формы, может развиться в типичное растение *Betula pendula* Roth var. *carelica* при наличии соответствующих условий произрастания, что является желательным результатом.

Литература

1. Геннис Р. «Биомембраны: Молекулярная структура и функции». М.:Мир, 1997. 622с
2. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука, 1981. 339 с.
3. Somerville C. and Browse J. Plant Lipids: Metabolism, Mutants and Membranes// Science. 1991. V.252. P.80-87.
4. Hugly S., Somerville C. A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature // Plant Physiol. 1992. V.99. P.197-202.
5. Laskay G., Lehoczki E. Correlation between linolenic acid deficiency in chloroplast membrane lipids and decreasing photosynthetic activity in barley // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 849. N1. P. 77-84.
6. Routaboul J.-M., Fischer S.F., Browse J. Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures // Plant Physiol. 2000. V.124. P.1697-1705.
7. Liu X.-Y., Li B., Yang J.-H., Sui N., Yang X.-M., Meng Q.-W. Overexpression of tomato chloroplast omega-3 fatty acid desaturase gene alleviates the photoinhibition of photosystems 2 and 1 under chilling stress // Photosynthetica. 2008. V.46(2). P.185-192.

REACTION OF MEMBRANE LIPIDS OF THE *BETULA PENDULA* ROTH LEAVES ON FERTILIZERS

Shulyakovskaya T.A., Iljinova M.K.

silver birch, curly birch, auxiblasts, brachyblasts, fatty acids, linoleic acid, linolenic acid, nitrogen fertilizer, combined fertilizer

We have studied the effect of additional nitrogen and NPK fertilizing on the fatty acid composition of glycolipids of silver birch and curly birch leaves. It has been discovered that the amount of linolenic acid and linolenic and linoleic acids ratio from glycolipids increase in silver birch leaves under the influence of nitrogen fertilizer, in curly birch leaves - under the influence of NPK fertilizer.

**ЭНЕРГООБМЕН У МУТАНТНЫХ ФОРМ *ARABIDOPSIS THALIANA*
ПО ОСНОВНЫМ ФОТОРЕЦЕПТОРНЫМ БЕЛКАМ**Якушенкова Т.П.¹, Скачовски А.М.², Рут Г.Р.², Стрзалка К.³¹ФГОАУ ВПО «Казанский (Приволжский) Федеральный университет», ул. Кремлевская, 18,
г. Казань, 420008, Россия, E-mail: tyakushe@ksu.ru²Педагогический университет в Кракове, г. Краков, 30-084, Польша³Ягеллонский университет, г. Краков, Польша*фитохром, криптохром, фототропин, энергообмен*

Свет вызывает разнообразные эффекты у всех низших и высших растений, независимо от их способности к фотосинтезу. Регуляторная роль света проявляется не только в контроле роста и развития растений, но и в метаболизме и функциях. На молекулярном уровне охарактеризованы ответственные за фотовосприятие света фоторецепторы покрытосеменных растений. Это прежде всего фитохромы, криптохромы, фототропины. В последнее время появились работы касающиеся трансдукции светового сигнала. Вопрос о физиологической роли отдельных фоторецепторов в большей степени остается открытым. В работах К. Холлидей и М. Сысоевой [1,2] показано, что фитохром В участвует в регуляции морозоустойчивости у растений. Физиологическая роль других фоторецепторов пока не выяснена. Целью нашего исследования явилось изучение скорости теплопродукции и дыхания у мутантных по основным фоторецепторным белкам растений *Arabidopsis thaliana*.

Растения выращивали в условиях фитотрона. Тепловыделение регистрировали дифференциальным темновым изотермическим микрокалориметром ТАМШ при температуре 25°C, согласно процедуре, описанной [3]. Дыхание измеряли на инфракрасном газоанализаторе ADC Bio Scientific Ltd, Англия. Объектом исследования были дефицитные мутанты *Arabidopsis thaliana* по PhyA, PhyB, Phot1, Cry1, Cry2.

Для изучения энергетического баланса у трансгенных растений проводили определение дыхания и тепловыделения. Определения проводили в 2-х кратной биологической и 3х кратной аналитической повторностях. Данные обрабатывали с использованием программы «Статистика 10».

Дыхание – центральное звено массо- и энергообмена растений. Энергия, выделяющаяся при дыхании, тратится как на процессы роста, так и на поддержание в активном состоянии уже закончивших рост органов растения. Изучение дыхания позволяет оценить функциональную активность направленность метаболизма. Дыхание растений сильно варьирует в зависимости от объекта, стадии онтогенеза, физиологического состояния и действия факторов окружающей среды. Показана важная роль дыхания в адаптации растений к изменяющимся условиям среды, поскольку необходимы дополнительные затраты энергии для приспособления организмов к новым условиям существования [4,5]. Нами было проведено исследование дыхания на целых растениях. Наибольшая интенсивность дыхания наблюдалась у дефицитных по PhyB мутантов. Дефицитные мутанты по Cry1 отличались низким уровнем интенсивности дыхания. Отсутствие апопротеинов phot1, phyA, cry2 – не оказывало существенного влияния на процесс дыхания. Совокупность биохимических реакций строго координирована во времени и пространстве. Именно такая упорядоченность допускает эффективное и контролируемое использование энергии, продуцируемой энерговырабатывающими системами клетки. С другой стороны, поддержание необходимой упорядоченности (высокой степени организации как в отношении структуры, так функциональной активности) требует непрерывного притока энергии, т.е. является энергозависимым процессом. Снижение функциональной активности и способности живой системы совершать работу, уменьшение запаса свободной энергии приводит к необратимым изменениям в организме.

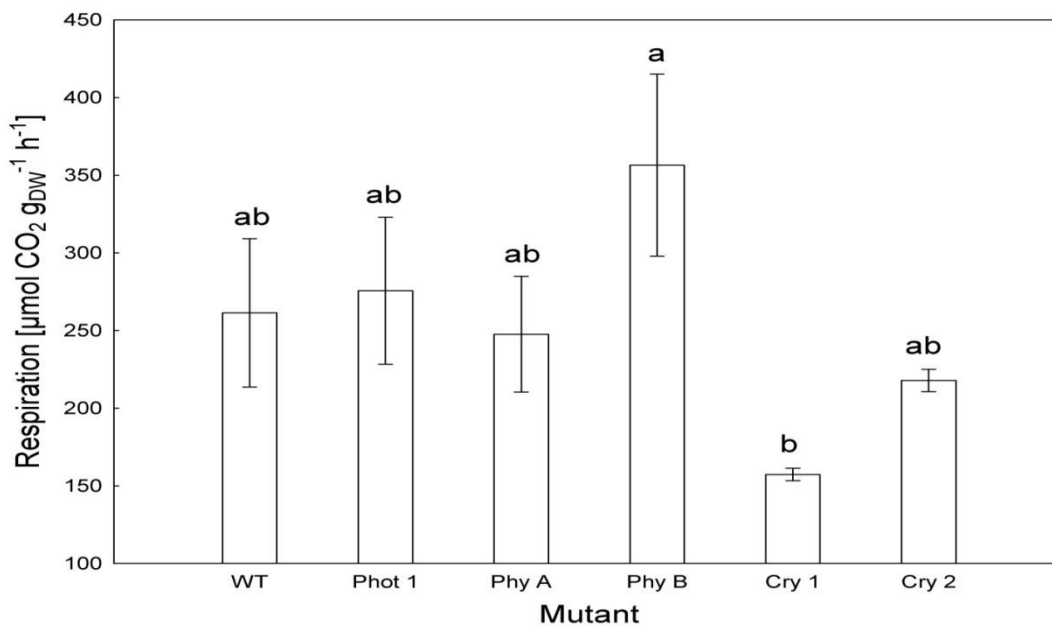


Рисунок 1- Дыхание (R_{CO_2}) дефицитных мутантов *Arabidopsis thaliana*
 Figure 1 - Respiration of scarce mutants *Arabidopsis thaliana*

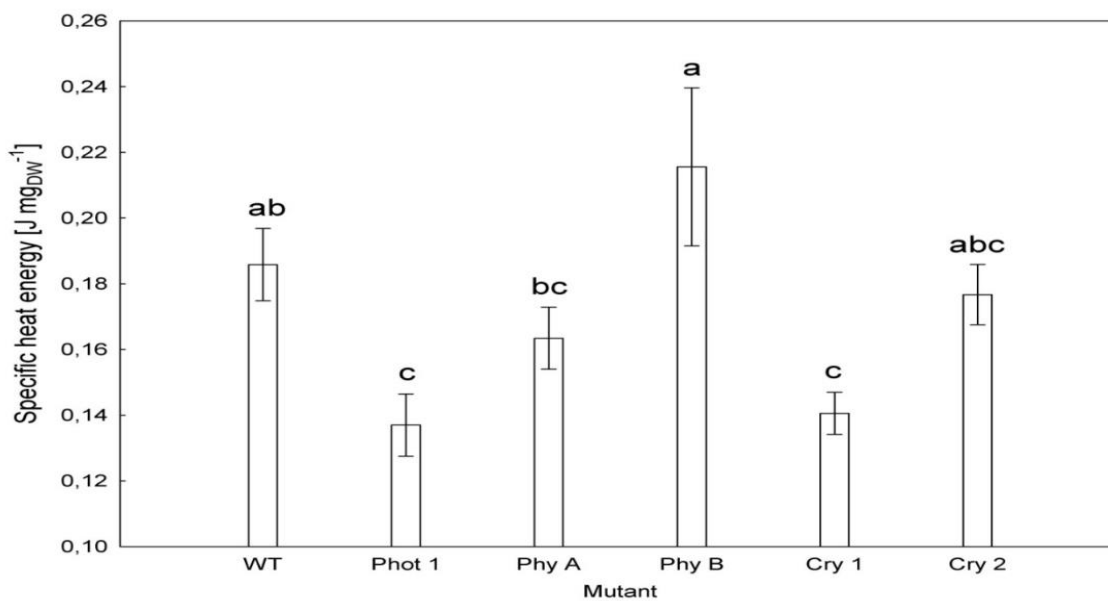


Рисунок 2 - Интенсивность тепловыделения у дефицитных мутантов *Arabidopsis thaliana*
 Figure 2 - Specific heat energy scarce mutants *Arabidopsis thaliana*

В силу этого, представляется логичным изучение скорости теплопродукции, которая отражает изменение всех анаболических и катаболических процессов, происходящих в растительном организме [6]. Тепловыделение – один из интегральных и важных показателей функционального состояния растительных тканей и клеток. Экспериментальные данные показали, что наибольшее тепловыделение наблюдалось у дефицитных по PhyB, фоторецептору. Наименьшее тепловыделение наблюдали у дефицитных мутантных форм Cry1, Phot1. Интенсивность выделения метаболического тепла у дефицитных мутантов по фоторецептору синего света Cry2и фоторецептору красного света PhyA оставалась на уровне растений, не имеющих мутации (контроль). В целом интенсивность тепловыделения имела прямую зависимость от интенсивности дыхания. Наиболее эффективную метаболическую активность имели растения дефицитные по мембранному фоторецептору

синего света Phot 1. У этих мутантов наблюдался достаточно высокий уровень дыхания и низкий уровень тепловыделения.

Таким образом, отсутствие одно из фоторецепторов приводило к изменениям в энергетическом обмене растений. Наиболее существенные изменения в энергообмене наблюдались у дефицитных мутантов по фоторецептору красного света PhyВ и фоторецептору синего света Phot1.

Литература

1. Сысоева М.И., Марковская Е.Ф., Шерудило Е.Г. Роль фитохрома В в формировании холодоустойчивости растений огурца на свету и в темноте//Физиология растений. Т.60, №3.2013. С.393-398.

2. Foreman J., Johansson H., Hornitschek P., Josse P., E.M. Fankhauser C., Halliday K.J. Light receptor action is critical for maintaining plant biomass at warm ambient temperatures //The Plant Journal. 2011. V.65 (3). P.444-452.

3. Stoklosa A., Janeczko A., Skoczowski A., Kiec J. Isothermal calorimetry as a tool for estimating resistance of wild oat (*Avena fatua* L.) to aryloxyphenoxypropionate herbicides//Termochimica Acta 441. С.203-206.

4. Семихатова О.А. Энергетика дыхания растений в норме и при экологическом стрессе. -Л.: Наука, 1990. 72 с.

5. Семихатова О.А., Чиркова Т.В. Физиология дыхания растений. - СПб.: Изд-во СПбГУ, 2001. 224 с.

6. Kemp R.B., Loseva N.L. et al. The energetic stress response of the microalga *Chlorella vulgaris* as a model system for plant-pathogen interaction//Termochimica Acta.1995.P.37-47.

ENERGY EXCHANGE AT MUTANT FORMS *ARABIDOPSIS THALIANA* OF THE MAIN PHOTORECEPTORS

Yakushenkova T.P., Skoczowski A.M., Rout G. R., Strzalka K.

phytochrome, cryptochrome, phototropin, energy exchange

At the result of energy metabolism researches at mutant forms *Arabidopsis thaliana* it was established that the most essential deviations were observed at mutant phytochrome B, phototropin 1.

AGGREGATION OF LHCII DEPENDS ON LIPID SURROUNDING

Gieczewska K.^{1,2}¹Department of Biophysics, Institute of Physics, Maria Curie-Skłodowska University, Maria Curie-Skłodowska 1, sq. 20-031, Lublin, Poland²Department of Plant Anatomy and Cytology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Ilja Miecznikow 1, 02-096 Warsaw, Poland, E-mail: kat.gieczewska@biol.uw.edu.pl*LHCII, protein aggregation, lipid-protein interactions, free fatty acid***Introduction**

Various interactions between proteins and their lipid surrounding are responsible for many features, like optimal efficiency of a protein, its function or proper incorporation into a membrane [1]. In case of photosynthetic efficiency both in natural and artificial systems the main photosynthetic antenna complex (the light-harvesting pigment-protein antenna of photosystem II complex (LHCII) can be a good example of such dependence. Isolated LHCII is often used as a model system to study the photosynthetic apparatus under different conditions [2]. In this case we will try to show that different lipid surrounding can affect the level of LHCII aggregation and, eventually, its efficiency. We will try to study LHCII in most natural of still highly controllable conditions - incorporated into the liposome system - 200 nm unilamellar liposomes built from plant galactolipids: monodigalactosyldiacylglycerol (MGDG), digalactosyldiglycerol (DGDG) and phosphatidylglycerol (PG) with 5% (w/w) addition of free fatty acids.

Materials and Methods

LHCII was isolated according to the previously described method by W.I.Gruszecki [3]. First, lipids solved in chloroform-methanol (1:1 v/v) mixture were put together into a glass vial and evaporated under argon. Then 10 mM Tricine pH 7.8 was added. Liposomes were formed with liposome extruder (Avanti Polar Lipids, Inc.) equipped with a 200 nm pore membrane. After the formation of liposomes LHCII was added, stirred and centrifuged. The excess of non-incorporated protein was removed. For more details about the procedure see [3]. Two kinds of free fatty acid was added before liposome formation: C14:0 - myristic acid and C14:1 - myristelaidic acid (Fig.1.). All measurements were performed both in non-aggregating and aggregating conditions (0 mM and 6 mM MgCl₂, respectively). Low-temperature (77K) fluorescence measurements as well as ATR-FTIR measurements were performed according to [4]. The obtained data were processed with Grapher8 and GRAMSAI software.

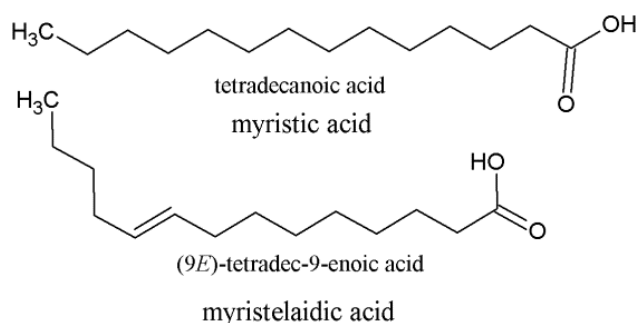


Figure 1 - Chemical structures of free fatty acids added to MGDG/DGDG/PG proteoliposomes

Results and Discussion

Light spectroscopy is a grateful and noninvasive method that can be applied for studies on isolated complexes, especially the ones whose function is actually based upon interactions with light radiation. Just as for the previous measurements of aggregating thylakoids, we applied a few spectroscopic methods – low-temperature (77K) fluorescence and ATR-FTIR (attenuated total reflection Fourier transformed infrared spectroscopy) [4]. The first one allowed us to determine unobstructed fluorescence of chromophores in liquid nitrogen, while the other revealed the interaction between proteins and lipids within the membrane. The long wavelength fluorescence showed a strong temperature dependence and it may be absent in room temperature [5]. The aggregation of LHCII, both in natural and artificial conditions, was found to

have profound effect on its functionality as an energy harvesting processor as it changes the properties of bound pigments [2]. The obtained data suggest that it is not only the aggregation itself but also the lipid content that may have some influence on LHCII complex performance. We used carefully planned lipid mixture as a background of our liposomes. We took MGDG, DGDG and PG, of which thylakoid membranes are built. Although first two are galactolipids, MGDG forms reversed hexagonal structure while DGDG is bilayer forming lipid. Due to its packing parameter, MGDG can facilitate protein incorporation into the membrane and its undisturbed functioning [6]. The PG is necessary for optimization of LHCII function, because proteins are often dependent on the presence of specific, usually anionic lipids [7]. We added two C14 fatty acids: the saturated one and the mono-unsaturated one for our study. Chemical structures of the lipids are shown in Fig.1. The fluorescence spectrum of the proteoliposomes with C14:0 addition revealed a broad long-wavelength fluorescence band at 700 nm (Fig. 2, blue panel), which usually serves as a fingerprint of aggregation [4] and is correlated with the extent of fluorescence quenching [8]. In case of C14:0 enriched liposomes LHCII complexes aggregated both in presence and in absence of magnesium ions, although in the more aggregating conditions the level of even longer wavelength at 730 nm is about ten percent higher than in 0 mM Mg buffer (Fig. 2, lower panel).

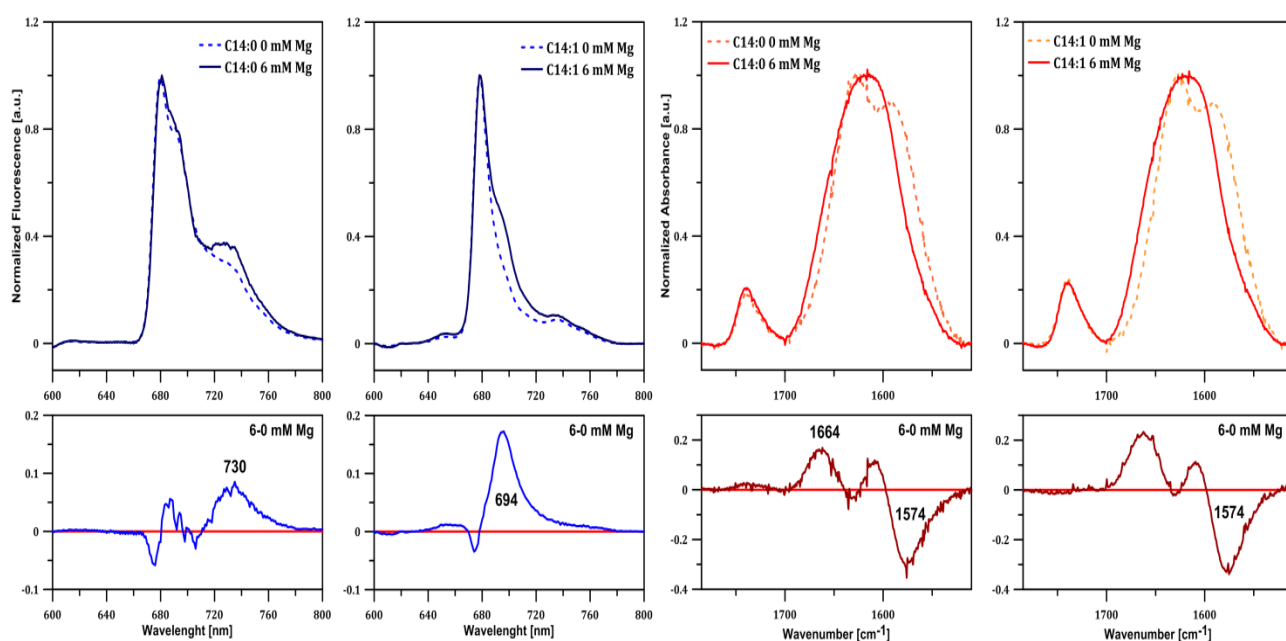


Figure 2 - The influence of C14 fatty acid addition on low-temperature (77K) fluorescence (blue panel) and FT-IR spectra of Amid I region of aggregating proteoliposomes. The spectra were normalized to 1 at maximum absorption. The 77K excitation wavelength was at 470 nm

The positive fluorescence at 730 nm can be explained by excitonic interaction between the chlorophyll molecules during LHCII aggregation [9]. In case of C14:1 fatty acid such a change did not occur. The band did appear at 694 nm during the aggregation, but there are no excitonic interactions between complexes, and at 0 mM Mg LHCII is mainly in its monomeric state.

There, our results suggest that the function of protein aggregates is not directly dependent on the relative protein structure inside the membrane as the FTIR spectra of Amid I region were the same for both fatty acids (Fig. 2.). In the differential spectrum we observed a positive contribution in the band assigned to turns and loops (1664 cm^{-1}), and in the one assigned to aggregates at 1610 cm^{-1} . More studies should be conducted on ascribing the negative band at 1574 cm^{-1} , since it may be correlated with proper protein incorporation. We observed a 20% increase in the relative content of lipids in case of the C14:0 proteoliposomes (Fig.3.). This fact combined with the analysis of the region corresponding to deforming stretching vibrations of CH₂ and CH₃ groups of membrane lipid acyl chains (Fig. 4.) revealed the character of protein placement within the membrane. The changes

in fatty acyl chains disorder correspond to the upshifted frequency of the symmetric stretching band of CH₂ groups ($\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$) at around 2850 cm⁻¹, which were observed in both C14 proteoliposomes during aggregation.

Furthermore, the band centered at 2830 cm⁻¹ can be assigned to the symmetric C—H stretching vibrations of acyl chains of lipids in the domains characterized by relatively low molecular motions, e.g. due to the interactions with proteins [10]. These results suggest that both structural lipid disorder and lipid–protein interaction were affected by MgCl₂ presence but not by saturation of fatty acids. However, they also suggest that the stability of the membrane is equally important, since under higher surface pressure the lateral mobility of lipids also decreases.

What causes the difference between the studied fatty acids' effect? Well, it may be the spacial structure of a particular lipid – both of them are shorter than the fatty acids coupled with MGDG or DGDG, so they can move freely inside the membrane, but because of one unsaturated bond C14:1 may cause some problems with the optimal adjustment of LHCII monomers.

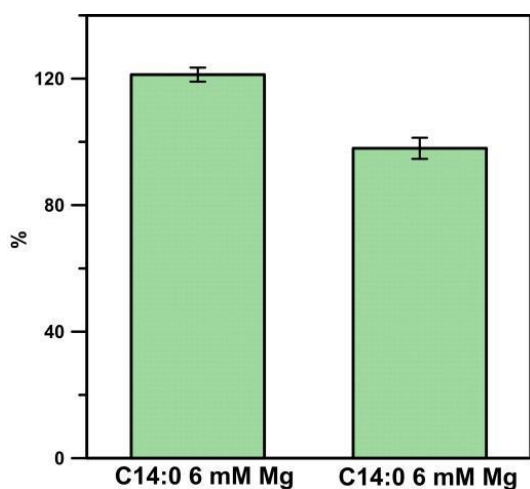


Figure 3 - Relative lipid content of C=O ester region of infrared spectra of liposomes in aggregating conditions. Normalized to 100% in 0 mM Mg conditions

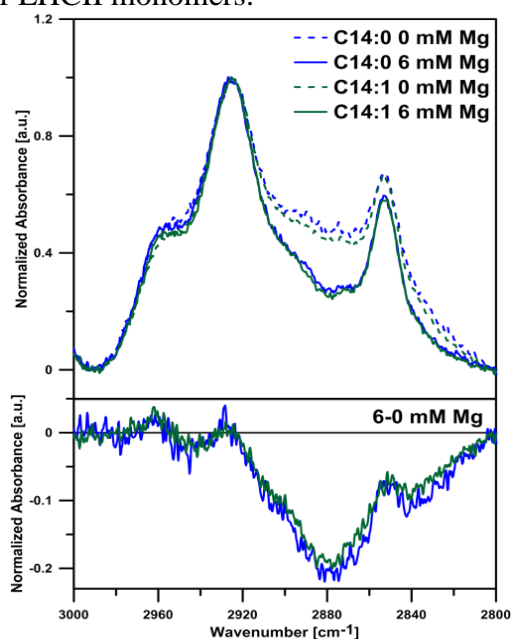


Figure 4 - Normalized absorption spectra in the lipid ester region

In the future this observation may help determine the content of proteins surrounding. To sum up, we proved that even a small amount of free fatty acid can change the functional properties of protein complexes. More study on the details of reaction mechanisms should be performed, since they may be used for further optimization of artificial lipid-protein systems.

Acknowledgements

Presented work was financed by FUGA2 grant no 2013/08/S/NZ1/00823 from National Centre of Science, Poland.

References

1. Lee A.G., Lipid-protein interactions, *Biochemical Society transactions*, 39 (2011) 761-766.
2. Gruszecki W.I., Structure-Function Relationship of the Plant Photosynthetic Pigment-Protein Complex LHCII Studied with Molecular Spectroscopy Techniques, *Advances in protein chem and structural biology*, 93 (2013) 81-93.
3. Gruszecki W.I., Incorporation and analysis of LHCII in model systems, *Methods Mol Biol*, 274 (2004) 173-181.
4. Rumak I., K. Gieczewska, B. Kierdaszuk, W.I. Gruszecki, A. Mostowska, R. Mazur, M. Garstka, 3-D modelling of chloroplast structure under (Mg²⁺) magnesium ion treatment. Relation-

ship between thylakoid membrane arrangement and stacking, *Biochimica et biophysica acta*, 1797 (2010) 1736-1748.

5. Horton P., M. Wentworth, A. Ruban, Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: the LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching, *FEBS letters*, 579 (2005) 4201-4206.

6. Schaller S., D. Latowski, M. Jemiola-Rzeminska, C. Wilhelm, K. Strzalka, R. Goss, The main thylakoid membrane lipid monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) promotes the de-epoxidation of violaxanthin associated with the light-harvesting complex of photosystem II (LHCII), *Biochimica et biophysica acta*, 1797 (2010) 414-424.

7. Lee A.G., Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective, *Biochimica et biophysica acta*, 1612 (2003) 1-40.

8. Janik E., Bednarska J., Zubik M., Puzio M., Luchowski R., Grudzinski W., Mazur R., Garstka M., Maksymiec W., Kulik A., Dietler G., Gruszecki W.I., Molecular architecture of plant thylakoids under physiological and light stress conditions: a study of lipid-light-harvesting complex II model membranes, *The Plant cell*, 25 (2013) 2155-2170.

9. Miloslavina Y., A. Wehner, P.H. Lambrev, E. Wientjes, M. Reus, G. Garab, R. Croce, A.R. Holzwarth, Far-red fluorescence: a direct spectroscopic marker for LHCII oligomer formation in non-photochemical quenching, *FEBS letters*, 582 (2008) 3625-3631.

10. Szalontai B., Membrane protein dynamics: limited lipid control, *PMC biophysics*, 2 (2009).

MORPHOSES INDUCED BY ETHYLENE FOR ADAPTIVE RESISTANCE BARLEY TO LODGING AND PRODUCTIVITY

Vashchenko V.F.¹, Serkin N.V.²

¹Research Institute of Environmental Problems, Russia

²Krasnodar Research Institute of Agriculture named Lukyanenko, st. Musorskogo, 3, Lipetsk, 398059, Russia, E-mail: vashenko56@mail.ru

inhibitor, adapting, lodging, hormone, morphogenesis, internode

Introduction

Producer hormone ethylene 2-chloroethylphosphonic acid no effect on the yield of the short semidwarf of barley varieties (Dahnous K., Vigue G.T., Law A.G. 1982). Only has been reported to reduce lodging increases resistance to lodging. Was reduced the elongation of plants (Al-Jamali A.F., M.A. Turk, A.R.M. Tawaha 2002). For tall locally adapted varieties and farming practices can be a positive impact on productivity. Especially effective for the formation of elements of productivity hormone deficit ethylene inhibitor before may be possible lodging. At this time, it is clearly dominates the auxin in the balance of hormones in the main stem (Defling A. 1982). In phase 49 (Zadoks) apex morphogenesis can significantly reduce the length of the main stem by the last internode (Ma B.L, Smith, DL 1992). Nitrogen fertilizers and excess of assimilates in the crop with insufficient productive stalks can cause appearance unproductive stems in this phase. The correlation between the stems can be passed along to the apical dominance and productivity growth tillers without danger lodgings (Wareing, P.F., Phillips, I.D., Waring J. 1970). Adaptation to stress and increase productivity may be associated biological correlation is positive for tall varieties.

Materials and Methods

In field experiments on 6 tall stem winter barley variety in barley breeding department Krasnodar Research Institute of Agriculture named. Lukyanenko. Ethephon were explicated at the late boot stage. Rate was 11/ha ethylene maker 48% by 2-chloroethylphosphonic acid treated before the formation of the last internode to reduced the elongation of plants. All accessions are tall varieties Samson genotype adapted to the conditions of the steppes of Krasnodar Region. Soil - a powerful black earth. Weather in 2010-2012 conditions was contributed to maximize yield of barley.

Results

Treatment before sowing growth last internode - boot flag leaf of the main stem 49 to the EU in the plant and crop flattened stems and increased grain content and plant adaptation to lodging resistance (table 1).

Table 1 - Yields of winter barley in the processing by 2-chloroethylphosphonic acid in phase 49 EU

Species	Control	application 2-chloroethylphosphonic acid	Additional yield, t / ha
1	59,8	66,1	+ 0,63
2	60,0	65,6	+ 0,56
3	47,5	55,5	+ 0 ,80
4	49,4	67,8	+ 1,84
5	62,9	73,0	+ 1,01
6	74,7	79,3	+ 0,54
Average	59,1	67,9	+ 0,80

Increased lodging in point for their 10 was 5-6 to 7-9 and was not absolute and sole cause of increasing yields (table.1). There were no losses on the control and the experimental version when

harvesting. Formation of increase of productivity to 1,84 t/ha provided not only by achieving accessions maximum resistance to lodging. Lodging resistance increased only in 60% of varieties. Morphogenesis by inhibiting ethylene apical dominance of the main stem levels tillers and the main stem of the plant and crop. Under favorable weather conditions, increased to a maximum level of productivity above the adaptive capacity of species. It suffices for the action of growth inhibition of the growth of correlation between the plant stems. If retardant reduces the height without changing the productivity, the growth inhibitor of ethylene has no decrease in weight of 1000 seeds, hollow-ness shall grain, grain content and physiological functions, immunity in this phase, and in the environment. Phase of plant development of application, weather and tall variety - biologically related. This is the rationale for adapting to lodging and max level of productivity above the adaptive capacity of the tall varieties. Formation of increase of productivity is due to productive tillering and weight of 1000 seeds in all cases. In dry and hot weather conditions yield increase is absent, only increases the biological value of seeds by weight. Under conditions conducive to lodging of crops increases the number of grains per plant. Application in phase two leads to internode unrealizable productive tillering hence - hollowness shall grain. Following internode elongation lengthened. The increase in the processing phase late boot stage only two variety indicates optimality phase application inhibitor. Lodging of this phase is usually not yet occurs. No phototoxic effect on photosynthesis as leaf flag leaf has erect form. Its effect was prolonged compared with the control. Flag leaf has an intense green color. No negative physiological action. Not appear unproductive stems in a dense planting the stem. Stem height to achieve stability and sowing limited once in a short period of time.

Discussion

Inhibition of hormone ethylene combined with the attractant power seeds in all stems barley plants to implement existing assimilates elements in productivity. Yield increase was not formed from yield losses in the control but in redistribution of nutrients within the plant due to the correlation between the growth stems, expanding productive capacity. The number of grains in the main spike is reduced minimally by 0.6 pc./spike that indicates an increase in resistance to the inhibitor in this phase. Inhibition of hormone gibberellins regulator during growth first interlude less efficient in size and having to reapply, limited long-acting single phase. Return the balance of hormones in the next period of growth in the normal kept of the previous value increases the length of the next internode, to reduce progress in elucidating hormone synthesis stems. Ethylene in balance with growth stimulants communicates with the environment, and the actual yield practically affects all level of harvest and resistance to lodging. The activities of hormone pathways can depend on each other (Wolters H., Jurgens G. 2009). Inhibition only height stems by hormone ethylene is not possible. Biological basis of the further formation elements of yield is to transfer dominance auxin growth promoter in the tillers by ethylene inhibitor. Effective influence on the morphology of tillers through the apex and the initial cells promotes formation yields in favorable weather conditions to a new adaptive potential yield (Wolters H., Jurgens G, 2009). Productivity of all varieties with genes tall inhibitor from launches one hormone inhibitor development productivity tillers without additional genes and transcription. Adaptation to lodging and yield increase can be correlated positively related to plant and crop.

Conclusions

1. Inhibition of ethylene in favorable weather conditions increase yield to maximum potential implements adaptive tall varieties.
2. Exogenous inhibition in ontogenesis and in an environment not conducive to a balanced inhibitor is biologically justified on the morphogenesis of the apex and the correlation between the stems.

References

1. Dahnous K. ,Vigue G.T., Law A.G., Konzak C.F. Height and Yield Response of Selected Wheat, Barley, and Triticale Cultivars to Ethephon // Agronomy Journal 1982. 74 V. 3, P. 580-58

2. Al-Jamali A.F., M.A. Turk, A.R.M. Tawaha. Effect of ethephon spraying at three developmental stages of barley planted in arid and semiarid Mediterranean locations // J. Agronomy Crop Science. - 2002. - № 188. - P.254 - 259.
3. Ma B.L , Smith, DL Growth regulator effects on aboveground dry matter partitioning during grain fill of spring barley // Crop Science. 1992. P.741–746.
4. Defling A. Hormones of plants.1982 P. 236
5. Wareing, P.F., Phillips, I.D .. Waring J. Growth and Differentiation in Plants Oxford, New York, Pergamon Pres,s 1970 P.331
6. Santner A., Calderon-Villalobo L.I.A, Estelle M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth // Nature Chemical Biology (Review) V. 5, I. 5, 2009, P. 301
7. Wolters H.. Jurgens G. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development// Rev. Genet., 10 (2009), pp. 305–317

M.G. Kholodny Institute of Botany of the NASU, Tereshchenkivska Str., 2, Kyiv, 01601, Ukraine,
E-mail: vedenicheva@ukr.net

Equisetum arvense L., cytokinins, growth, cryptogamous plants, organs, sporophyte

Introduction

Due to the lack of data concerning the phytohormones localization, metabolism and dynamics during the growth and development of many plants groups, especially cryptogamous plants, attempts taken to follow the evolution of the plants hormonal system are few [1, 2]. That is why the representative of vascular cryptogamous plants – horse-tail – is of a great interest to scientists in their studies of the formation and improvement of hormonal mechanisms of plant growth regulation in the process of living world evolution. Plants of the *Equisetum* genus are very ancient. They appeared in the Devonian of Palaeozoic Age and were most widely distributed in Carboniferous. Those gigantic plants became extinct at the beginning of the Age of Reptile (Mesozoic). Now the *Equisetum* genus includes 25 species. The mechanisms of these plants growth regulation have been studied very poorly although they deserve attention because they have made it possible for the *Equisetum* genus to survive for the period of 300 million years.

An important place in the plant growth and development regulation is taken by cytokinins. These hormones stimulate the meristem formation and activity, control the attractive capacity of tissues, retard leaves senescence, inhibit roots growth and branching as well as participate in seed germination and stress responses [3].

There are few reports about endogenous cytokinin content in some cryptogamous plants species including *Equisetum* sp. and about exogenous cytokinins effects on their development *in vitro*. For the first time the cytokinins in *Equisetum arvense* L. were chemically identified in 1983: isopentenyladenosine was isolated from fertile fronds and isopentenyladenine from sterile and fertile fronds of *E. arvense* by the combined gas chromatography-selected ion monitoring [4]. BAP was shown to stimulate the sporophyte shoot formation from gametophyte tissues [5]. BAP addition to the cultural medium was absolutely necessary for *E. arvense* sporophyte growth initiation *in vitro* [6], spores germination was controlled by cytokinins [7].

Cytokinins distribution in organs of *E. arvense* sporophyte and vegetative shoots at different developmental stages was presented in our previous report [8]. Some similarities in the cytokinins status between this ancient plant and higher vascular plants, namely cytokinins qualitative composition, free forms dynamics during ontogenesis, presence of cytokinins biosynthesis local places were shown. The specificity of *E. arvense* includes a higher conjugate content at the earlier developmental stages, different types of cytokinins distribution along vegetative and generative shoot vertical axis [8].

Our next study deals with the investigation of cytokinins seasonal fluctuations in *E. arvense* organs.

Materials and Methods

E. arvense plants were grown in natural conditions on a loamy soil in the Kiev region with good sun daylight. Temperature and moisture conditions were correspondent with the average statistical ones typical of the climatic zone of Ukrainian forest-steppe.

Plant samples were homogenized with 80 % ethanol. After alcohol removal the water extract was frozen during 24 h and centrifuged at 15 000 g. Cytokinins were extracted by butanol at pH 8 and purified by ion-exchanging chromatography on Dowex 50Wx8 column and by TLC chromatography on Silicagel plates. For the stages of purification in detail see [9]. Cytokinins amounts were measured by HPLC (Agilent 1200 LC, USA) using Eclipse XDB-C 18 column (2,1x150 mm), par-

ticles size 5 μm . Elution was carried out with solvents system methanol:water (37:63). Data were analyzed and processed by software Chem Station, version B.03.01 on line.

Results and Discussion

The samples for analysis were gathered in the period when *E. arvense* plants were in the quiescent state (from November to April) and at the beginning of sporophyte development (middle of the April). At this time only underground organism parts were available. Sporophyte (termed “winter bud”) was small in size (1-2 cm). It consisted of stem with differentiated strobile and leaf primordia.

Table 1 - Cytokinin content in different *Equisetum arvense* L. parts, ng/g fresh weight

Таблица 1 - Содержание цитокининов в различных частях *Equisetum arvense* L., нг/г сырого вещества

Plant material	Z*	ZR*	iPa*	iP*	ZG*
23.11.2011					
Winter buds	10,0 \pm 0,5	0	55,4 \pm 2,4	18,4 \pm 0,8	0
Rhizomes	0,0	23,4 \pm 1,1	13,4 \pm 0,6	6,2 \pm 0,3	10,3 \pm 0,4
21.12.2011					
Winter buds	8,7 \pm 0,4	16,8 \pm 0,8	188,8 \pm 9,3	4,9 \pm 0,2	27,6 \pm 1,3
Rhizomes	19,1 \pm 0,8	17,9 \pm 0,8	12,2 \pm 0,5	12,1 \pm 0,5	19,1 \pm 0,8
22.03.2012					
Winter buds	70,0 \pm 3,1	36,5 \pm 1,3	11,3 \pm 0,5	12,4 \pm 0,5	20,1 \pm 1,0
Rhizomes	119,0 \pm 5,7	62,3 \pm 2,9	0	2,4 \pm 0,1	0
3.04.2012					
Underground shoots with strobiles	139,2 \pm 6,7	60,8 \pm 2,9	0	41,5 \pm 1,9	25,7 \pm 1,1
Rhizomes	140,4 \pm 6,9	45,1 \pm 1,9	0	11,9 \pm 0,4	28,6 \pm 1,1
13.04.2012					
Internodes with fronds rings	0	0	87,7 \pm 4,2	2,6 \pm 0,1	11,0 \pm 0,5
Strobiles	0	137,9 \pm 6,7	0	0	22,2 \pm 1,1
Rhizomes	194,2 \pm 9,5	38,3 \pm 1,9	0	182,3 \pm 8,9	8,8 \pm 0,4

* Z – Zeatin, ZR - Zeatin riboside, iPa – Isopentenyladenosine, iP – Isopentenyladenine, ZG – Zeatin-O-glucoside

Both the winter bud and rhizomes contained a low cytokinin levels at the very beginning of plant transition to the quiescent state (November) with the predominance of isopentenyladenosine (Table 1). Later on (December) the total cytokinins content increased. Isopentenyladenosine remained the most abundant cytokinin in the winter bud. Some cytokinins amount was stored in the form of zeatin-O-glucoside. These data showed the presence of certain metabolism of cytokinins in *E. arvense* tissues even in a cold winter time. Levels of zeatin and zeatin riboside increased considerably whereas isopentenyladenine and isopentenyladenosine content decreased in spring (March). At that time the amount of Z-type cytokinins was about twice more in rhizomes than in winter buds. This indicates that *E. arvense* root system is capable of producing cytokinins like that of higher vascular plants [10]. Thus, it can be assumed that root functions associated with the cytokinins production emerged in plants at the beginning of evolutionary development and are preserved till now. In April the winter bud transformed into young growing sporophyte appearing over ground. By this time Z-type cytokinins and zeatin-O-glucoside accumulation occurred whereas isopentenyladenosine disappeared. When sporophyte growth intensified (in the middle of April) zeatin was not there detected. At this time we found a considerable content of zeatin riboside in strobile and isopentenyladenosine – in internodes with fronds rings. A high cytokinins level was maintained in rhi-

zomes. The above data are in agreement with the results of our previous work [8] where we have established that conjugated cytokinins are dominant in growing *E. arvense* organs.

Conclusion

The results obtained support the assumption about a regulatory role of cytokinins in the vascular cryptogamous plant *E. arvense*. Both free and bound cytokinins were found to be present in different plant parts during quiescent period. Fluctuations in their content indicated that some metabolic changes directed at the support of active and rapid sporophyte growth in the early spring were present.

References

1. Ross J.J. Evolution of growth-promoting plant hormones / J.J. Ross, J.B. Reid // *Functional Plant Biology*. – 2010. – V. 37. - № 9. – P. 795 - 805.
2. Hartung W. The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen / W. Hartung // *Functional Plant Biology*. – 2010. – V. 37. - № 9. – P. 806 - 812.
3. Романов Г.А. Как цитокинины действуют на клетку / Г.А. Романов // *Физиология растений*. – 2009. – Т. 56. - № 2. – С. 295 - 319.
4. Yamane H. Identification of cytokinins in two species of Pteridophyte sporophytes / H. Yamane, M. Watanabe, Y. Satoh, N. Takahashi, K. Iwatsuki // *Plant and Cell Physiology*. – 1983. – V. 24. - № 6. – P. 1027 – 1031.
5. Kuriyama A. Roles of inorganic nitrogen in gametophytic growth and in initiation and development of sporophytic shoots of *Equisetum arvense* / A. Kuriyama, M. Takeuchi, F. Kawai, M. Kanamori // *Plant and Cell Physiology*. – 1992. – V. 33. - № 5. – P. 647 - 650.
6. Kuriyama A. Inhibitory effect of jasmonic acid on gametophytic growth, initiation and development of sporophytic shoots in *Equisetum arvense* / A. Kuriyama, F. Kawai, M. Kanamori, W. Dathe // *Journal of Plant Physiology*. – 1993. – V. 141. - № 6. – P. 694 - 697.
7. Kuriyama A. Direct production of sporophytic plants from spores of *Equisetum arvense* / A. Kuriyama, M. Maeda // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1999. – V. 58. - № 1. – P. 77 - 79.
8. Веденичова Н.П. Локалізація і динаміка цитокінінів у різних частинах рослин *Equisetum arvense* L. / Н.П. Веденичова, К.М. Ситник // *Доповіді НАН України*. – 2013. - № 11. – С. 150 - 156.
9. Мусатенко Л.И., Веденичева Н.П., Васюк В.А. и др. Комплекс фитогормонов в проростках различных по устойчивости к повышенным температурам гибридов кукурузы / Л.И. Мусатенко, Н.П. Веденичева, В.А. Васюк и др. // *Физиология растений*. – 2003. - Т. 50. - № 4. - С. 499 - 504.
10. Sakakibara H. Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation // *Ann. Rev. Plant Biol.* – 2006. – 57. – P. 431 - 449.

Раздел 2

Агро- и фитобиотехнологии



Chapter 2

Agriculture and Phytobiotechnologies

ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА ЛИСТОВОГО ЭКСПЛАНТА И СООТНОШЕНИЯ ФИТОГОРМОНОВ В СРЕДЕ НА ОРГАНОГЕНЕЗ ГОРОХА *IN VITRO*

Агеева М.Н., Брилкина А.А.

ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им.Н.И Лобачевского – национальный исследовательский университет», пр. Гагарина 23, г. Нижний Новгород, 603950, Россия, E-mail: ageyevamaria@gmail.com

горох, органогенез, побег, регенерация, тип экспланта, фитогормоны

Введение

Одним из важнейших свойств растений является способность к регенерации *in vitro* из недифференцированных соматических тканей с получением нормальных, фертильных организмов. Такое свойство тотипатентности позволяет получать трансгенные растения через культуру тканей [1]. В современном мире генно-модифицированные растения используются как в практике сельского хозяйства, так и в научных целях. Поэтому очень важна разработка способов эффективной регенерации растений *in vitro*.

Ранее нами были проведены исследования по влиянию ауксиновых и цитокининовых фитогормонов на органогенез гороха из листовых эксплантов [2]. Были получены регенеранты из целых листовых эксплантов гороха на средах с различными цитокининами (6-фурфуриламинопурин (кинетином), 6-бензиламинопурин (6-БАП) и 6- γ,γ -диметилаллиламинопурин (2-иП)) и ауксинами (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д), α -нафтил-уксусной кислотой (НУК)). Наилучший результат был показан для среды кинетин/НУК и 6-БАП/НУК в концентрации 1/0,1 мг/л. Цитологические исследования, показали, что морфогенез побегов шел по пути органогенеза.

Известно, что на морфогенез растений *in vitro* оказывают влияние как соотношение фитогормонов в среде, её минеральный состав, физические факторы: освещенность, влажность, температура культуральной комнаты, так и размер экспланта [3].

Поэтому целью наших исследований стало изучение влияния размера экспланта на образование побегов *in vitro* для растений гороха (*Pisum sativum L.*) сорта Альбумен.

Материалы и методы

Индукция образования побегов на листовых эксплантах гороха разного размера проводилась на среде Мурасиге-Скуга (МС) [4] с содержанием 6-БАП или кинетина и α -нафтилуксусной кислоты НУК. Цитокинины и ауксины присутствовали в среде в концентрациях 1 и 0,1 мг/л, соответственно. В качестве эксплантов для образования побегов гороха использовали листья 6 размеров (рис. 1). Экспланты высаживали на питательную среду по 10 штук в 3 повторностях, после чего культивировали в условиях 16/8 фотопериода при освещении 4 кЛк и температуре 24°C. Наблюдение проводили в течении 6 недель.

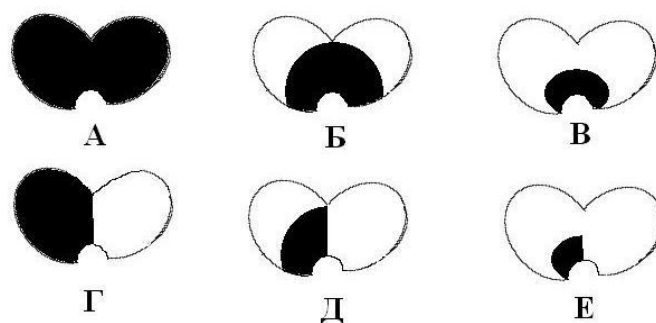


Рисунок 1 - Различные размеры листовых эксплантов гороха (черным выделены области эксплантов, которые помещали на среды для регенерации)

Figure 1 - Pea leaf explants (explants placed on regeneration media are coloured in black)

Результаты и обсуждение

На исследуемых средах происходило образование одного побега на эксплант в месте основания листьев. Наибольшее количество регенерантов (36,7%) было получено на среде 6-БАП/НУК для эксплантов типа А (целые листья). Несколько меньший выход (30,7%) наблюдался у эксплантов типа Б на среде кинетин/НУК. У остальных эксплантов гороха на исследуемых средах уровень регенерации был невысоким. Отмечено, что экспланты типов Г, Д и Е давали в среднем 15% побегов. Возможно, такой результат связан с повреждением зоны регенерации у листа гороха. Через 6 недель образованные побеги пересаживали для элонгации и микроразмножения.

Также в 1985 году De K.K. и Roy S.C. получили регенерацию побегов из сегментов эпикотили гороха сорта Early Wonder. Наиболее эффективной средой для образования каллуса из эпикотили была МС с НУК/6-БАП или НУК/кинетин в соотношении 2/0,5 мг/л соответственно, а для дальнейшей инициации морфогенеза побега из каллусной массы – среда МС, содержащая ИУК и 6-БАП в соотношении 0,2/5 мг/л.

Выводы

Таким образом, на целых листьях гороха морфогенез побегов эффективнее происходит на среде МС с 6-БАП/НУК в концентрации 1/0,1 мг/л, а на половинах листа без повреждения зоны регенерации – на среде МС с кинетин/НУК в концентрации 1/0,1 мг/л.

Кроме того, в настоящее время проводятся исследования по влиянию соотношений различных концентраций цитокининов и ауксинов в среде на регенерацию гороха из листовых эксплантов, подобным образом планируется увеличить выход регенерированных побегов.

Литература

1. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / под. ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 487с.
2. Агеева М.Н., Брилкина А.А. Влияние содержания цитокининов и ауксинов в среде на образование побегов и корней табака и гороха *in vitro* // Известия УНЦ РАН, 2013, №3. С.80-83.
3. Тимофеева О.А., Румянцева Н.И. Культура клеток и тканей растений. Казанский Федеральный Университет, 2012.
4. Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473-497.
5. De K.K., Roy S.C. Morphogenetic investigation on pea under *in vitro* conditions// *Bulletin of the Torrey botanical club.* 1985. Vol. 112. №4 . P.363-367.

THE EFFECT OF LEAF EXPLANT SIZE AND PHYTOHORMONE RATIO IN MEDIA ON PEA ORGANOGENESIS *IN VITRO*

Ageeva M., Brilkina A.

pea, organogenesis, shoot, regeneration, type of explants, phytohormones

Effects of leaf explant size and phytohormone ratio in nutrition media on pea organogenesis *in vitro* were studied. The most effective media for whole leaves was MS with 6-BAP/NAA (in concentration 1/0.1 mg/l) and for half of leaves with undamaged regeneration area it was MS with kinetin/NAA (in concentration 1/0.1 mg/l). Morphogenesis level for leaves with damaged regeneration area was low.

ПОТЕНЦИАЛ ГАЛОФИТОВ ДЛЯ РЕАБИЛИТАЦИИ МАРГИНАЛЬНЫХ ЗЕМЕЛЬ КУРА-АРАЗСКОЙ НИЗМЕННОСТИ

Али-заде А.М., Шукюров Э.С., Джафарова А.Б., Алирзаева Э.Г., Ширвани Т.С.

Институт ботаники Азербайджанской НАН, Баку, Az1073, Азербайджан,
E-mail: vm_alizade@yahoo.com

галофиты, засоленные почвы, реабилитация, Кура-Аразская низменность

Введение

Засоление почвы, загрязнение ее органическими и неорганическими веществами, дефицит минеральных элементов, эрозия и другие стрессовые эдафические факторы являются причинами снижения плодородия почв повсеместно в мире. Это, соответственно, приводит к уменьшению продуктивности ценных и полезных растений, тем самым препятствует успешному развитию сельского хозяйства и представляет угрозу для здоровья человека. Решение проблемы деградированных почв является одной из актуальных задач и в Азербайджане.

Значительную часть агроэкосистем в республике занимают почвы, засоленные в результате активности природных процессов и техногенной деятельности. Кура-Аразская низменность, являющаяся одним из важнейших сельскохозяйственных регионов и занимающая 46,7 % всех поливных земель страны, также страдает от средней и сильной засоленности и загрязнения почв тяжелыми металлами (ТМ) [1, 3, 6]. Это типично аридная-полуаридная зона и в то же время крупнейший регион орошаемого земледелия, основная хлопковая, кормовая и зерновая база Азербайджана. Степень засоления грунтовых вод здесь повышена, достигая 10-50 г/л, а иногда 100 г/л [1], что приводит к еще большему увеличению содержания солей на поверхности почвы. В результате значительная территория этого массива превратилась в маргинальные деградированные земли, не пригодные для сельскохозяйственного использования.

Применение различных агротехнических и мелиоративных подходов для удаления солей и других токсикантов из почв в силу своей дороговизны и длительности не всегда оправдано в местных условиях. Развитие более эффективных, экономически выгодных фитотехнологий как альтернативный биологический подход в последние десятилетия занимает основное место в решении данной проблемы. Попытки применения этих подходов в аридных и пустынных регионах Центральной Азии дали успешные результаты [13]. Цель работы – выявить потенциал галофитов Кура-Аразской низменности для реабилитации ее деградированных почв.

Материалы и методы

Полевые исследования по изучению состояния растительности, формирующейся в различных экологических условиях Кура-Аразской низменности, проводились маршрутным методом с использованием современных фитоценологических методик [7].

Результаты и обсуждение

Территория Кура-Аразской низменности, где доминируют солеустойчивые травы и кустарники, охотно поедаемые скотом, интенсивно используется как зимние пастбища. Мониторинг современного состояния аридных и полуаридных зимних пастбищ был проведен в одном из наиболее засоленных и загрязненных регионов Кура-Аразской низменности – в Кюрдамирском районе. Результаты выявили, что доминантными галофитами здесь являются виды *Salsola nodulosa* (Mog) Ilin, *Salsola dendroides* Pall, *Halostachys caspica* (Biob). S.A. Mey, *Sueda dendroides* (C.A. Mey) Mog, *Artemisia fragrans* L., *Atriplex tatarica* L., *Tamarix ramosissima* Ldb. и др. Большие территории на деградированных почвах низменности заняты, в основном, пустынным (*Salsoletum nodulosae*) и полупустынным (*Salsoletum dendroides* и *Artemisetum lerchiana*) типами растительности. В горной солянковой ассоциации *Salsoletum*

nodulosae доминантным видом оказалась *Salsola nodulosa*, сопровождаемая злаковыми (19%) и другими травами. В ассоциации *Salsotum dendroides* доминирующим и субдоминирующим видами являются, соответственно, *Salsola dendroides* с проектным покрытием в 15% и *Halocnemum strobilaceum* в 13%. *Salsola ericoides* и *Suaeda microphylla* встречаются довольно редко. Доминирующим видом в сообществе *Artemisetum lerchiana* выявлена *Artemisia fragrans*, обладающая значительным проектным покрытием на слабо засоленных участках. Согласно литературным данным, здесь также преобладают сухие степи и полупустыни с эфемерами, солянками и полынями, с солянко-полынными ассоциациями на сероземах и серо-коричневых почвах, злаково-полынными, бородавчатыми ассоциациями на темных серо-коричневых почвах [4, 5]. 62% видов только из семейства *Chenopodiaceae*, широко распространенного на Кура-Аразской низменности, идентифицируются как галофиты. Большинство из этих видов являются ценными кормовыми растениями, отличающимися высоким содержанием первичных и вторичных метаболитов, определяющих их перспективность для создания пастбищ, устойчивых к различным экстремальным факторам.

Галофиты, как известно, не только хорошо адаптируются даже к высокой засоленности, но способны аккумулировать высокие уровни ионов натрия и хлора в своих надземных органах, не проявляя симптомов токсичности. Морфо-физиологические особенности этих растений, такие как суккулентность, наличие волосков на листьях и стеблях, солевых железок и головок, трихом и утолщенной кутикулы листьев, уменьшение количества устьиц, секвестрация и компартментация ионов Na^+ и Cl^- , а также их детоксикация в вакуолях, осморегуляция с помощью синтеза совместимых осмопротекторов, синтез стрессовых белков и антиоксидантных ферментов и т. д., определяют специфические механизмы их устойчивости. Эти галофиты, а также ряд других солеустойчивых видов и ценных кормовых растений обладают генетическим потенциалом для удаления, деградации, метаболизации и иммобилизации широкого спектра загрязнителей из почв [13].

Роды *Salsola*, *Suaeda* и др., обладающие суккулентной структурой, являются солеаккумулирующими растениями, концентрация ионов Na^+ и Cl^- в их вакуолях обычно значительно превосходит их содержание в наружной среде и равна или превышает содержание в морской воде [12]. Особая аккумуляционная способность к солям отмечена у видов *Suaeda* (С.А.Мей) Мог, которые могут уменьшать содержание ионов солей в почве, удаляя их из нее (до 1088,6 кг с акра за сезон) и таким образом приводят почву в пригодное для культивирования состояние [8]. *Atriplex* L. с помощью специальных волосков на стеблях и листьях локализует большое количество соли в своем организме. Это растение зарекомендовало себя не только как гипераккумулятор NaCl , но и как аккумулятор ТМ (Pb, Zn, Cd), загрязняющих засоленные почвы [9]. Виды *Tamarix* L. обладают солевыми железками, через которые листовые ткани экскретируют на листовую поверхность как ионы Cl , так и Cd, Zn, Cu и Pb, поглощенные из почв [10]. Растения *Artemisia* L., толерантные к широкому кругу стрессовых факторов (засуха, засоление, высокая температура, различные органические и неорганические поллютанты) и обладающие высокой аккумуляционной способностью к Cd, Zn, Cu и Pb, могут быть использованы для оздоровления деградированных земель [2, 6]. Таким образом, галофиты, отличающиеся от гликофитов и своей устойчивостью к ТМ и накапливающие их в больших количествах в своих тканях, считаются потенциально идеальными растениями для фитоэкстракции или фитостабилизации засоленных почв и почв, загрязненных ТМ [6, 10-12, 13].

Инновационная стратегия основывается на соответствующем отборе растений, успешно растущих и продуцирующих семена в засушливой и засоленной среде, обладающих высокой скоростью накопления биомассы в корнях и надземных частях, глубокой корневой системой и устойчивостью к высоким рН, засолению и засухе. Эти дикие металлогалофиты могут быть введены в практику реабилитации почв вокруг корневых зон растений и увеличения экономической продуктивности сельскохозяйственных культур.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда Развития Науки при Президенте Азербайджанской Республики. Грант No EIF-2012-2(6)39/18/3.

Литература

1. Азизов Г.З. Водно-солевой баланс орошаемых земель Кура-Аразской низменности. Научный анализ результатов // Баку, «Элм», 2006, 260 с. (на азерб. языке).
2. Али-заде В.М., Ширвани Т.С., Алирзаева Э.Г. Устойчивость растений к токсичности металлов и нефтяных углеводородов. Подходы к фиторемедиации // Баку, «Элм» 2011, 280 с.
3. Мамедов Г., Халилов М., Мамедова С. Агрэкология // Баку, «Элм», 2010, 551с.
4. Мовсумова Ф.Г. Биоразнообразие солянковой пустынной растительности Кура-Аразской низменности Азербайджана // Труды Азерб. Нац. Ком. ЮНЕСКО «МАВ», Баку, 2003, т.2, 163-174 (на азерб. языке).
5. Шукюров Э., Джафарова А., Абдыева Р., Ширвани Т. Современное состояние аридных и полуаридных зимних пастбищ Азербайджана // Труды Инс-та ботаники НАНА, 2013, т. XXXIII, 121-124 (на азерб. языке).
6. Alirzayeva E.G., Shirvani T.S., Yazici M.A., Alverdiyeva S.M., Shukurov E.S., Ozturk L., Ali-zade V.M., Cakmak I. Heavy metal accumulation in *Artemisia* and foliaceous lichen species from the Azerbaijan flora // Forest Snow Lands Res, 2006, 80, 339-348.
7. Barker P. Technical manual for vegetation monitoring // Resource management and conservation DPIWE.
8. Chaudhri I.I., Shah B.H., Naqvi N., Mallick I.A. Investigations on the role of *Suaeda fruticosa* Forsk in the reclamation of saline and alkaline soils in west Pakistan plains // Plant Soil, 1964, 21, 1-7.
9. Jordan F.L. Robin-Abbott M., Maier R.M., Glenn E.P. A comparison of chelator-facilitated metal uptake by a halophyte and a glycophyte//Environ Toxicol Chem, 2002, 21, 2698-2704.
10. Kadukova J., Manousaki E., Kalogerakis N. Pb and Cd accumulation and phytoexcretion by salt cedar (*Tamarix smyrnensis* Bunge) // Int. J. Phytorem., 2008, 10, 31-46.
11. Manousaki E., Kalogerakis N. Halophytes present new opportunities in phytoremediation // Ind. Eng. Chem. Res., 2011, 50, 656-660.
12. Rozema J., Flowers T. Crops for a salinized world // Sci, 2008, 322, 1478-1480.
13. Toderich K.N., Shuyskaya E.V., Khujanazarov T.M., Ismail Sh., Kawabata Y. The structural and functional characteristics of Asiatic desert halophytes for phyto-stabilization of polluted sites // In: Plant Adaptation and Phytoremediation, Springer, 2010, 245-274.

POTENTIAL OF HALOPHYTES FOR REHABILITATION OF MARGINAL LANDS OF KUR-ARAZ LOWLAND

Ali-zade A.M., Shukurov E.S., Jafarova A.B., Alirzayeva E.G., Shirvani T.S.

halophytes, salt-affected soils, rehabilitation, Kur-Araz lowland

Monitoring of modern status of the vegetation in the Kur-Araz lowland by means of phytocoenological methods revealed that dominant halophytes here are *Salsola nodulosa* (Mog) Ilin, *Sueda dendroides* (C.A. Mey) Mog, *Artemisia fragrans* L., *Atriplex tatarica* L., *Tamarix ramosissim* etc. These plants possessing a high capacity to accumulate ions of salt and HM can be used for the rehabilitation and restoration of marginal lands of lowland.

ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭПИБРАССИНОЛИДА НА ИЗОЛИРОВАННЫЕ ОРГАНЫ РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ХЛОРИДА НАТРИЯ И СУЛЬФАТА МЕДИ

Алиева З.М.

ФГБОУ ВПО «Дагестанский государственный университет», ул. М. Гаджиева, 43 а,
г. Махачкала, 367000, Россия, E-mail: zalieva@mail.ru

изолированные органы, черенки, укоренение, эпибрасинолид, NaCl, CuSO₄

Введение

Брассиностероиды – наиболее поздно выделенная и интенсивно изучаемая группа природных регуляторов, обладающая широким спектром физиологической активности, способностью повышать устойчивость растений к различным неблагоприятным факторам: низким температурам, засухе, засолению, некоторым болезням [1, 2]. Широко известна их роль в повышении роста и продуктивности растений. Встречаются и сведения о влиянии брассиностероидов на рост и продуктивность [2, 3]. Менее изученным остается вопрос о возможной защитной роли в условиях действия тяжелых металлов и об их влиянии на процессы регенерации [4]. Целью данной работы была конкретизация роли эпибрасинолида в реакции укореняющихся черенков растений на действие NaCl и CuSO₄.

Материал и методы

Материалом для исследований служили черенки колеуса – *Coleus x hybridus (Coleus blumei Benth.)*, абутилона (*Abutilon x hybridum hort*), фасоли – *Phaseolus vulgaris L.*, сои – *Soja hispidula Moench* и маша – *Vigna radiata L.*, семена и черенки редиса – *Raphanus sativus L.*

У редиса, фасоли, сои и маша использовали гипокотильные черенки проростков, у колеуса и абутилона – облиственные стеблевые черенки. Культивирование черенков проводили в водной культуре с предварительной обработкой раствором эпибрасинолида (ЭБ) («Эпин-экстра» фирмы НЭСТ-М, разведение 0.01 – 0.05 % , срок предобработки – 24 ч). Часть черенков после обработки эпином переносили в растворы хлорида натрия или сульфата меди. Семена редиса проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной раствором CuSO₄ (1мМ) или водой. Часть семян предварительно замачивали в растворах эпина. Состояние черенков оценивали по выживаемости, общей укореняемости, срокам развития корней и величине ризогенной зоны (участка черенка, покрытого корнями), семян – по темпам прорастания и размерам проростков.

Результаты и обсуждение

Гипокотильные черенки фасоли, сои и маша отличались по реакции на засоление среды хлоридом натрия. Наибольшую чувствительность проявили черенки маша, они отмирали без укоренения в растворах с наиболее низкой концентрацией NaCl. Большую устойчивость проявили черенки сои и фасоли, выживаемость и укореняемость в условиях засоления у них превышала соответствующие показатели черенков маша. Так, в растворе 20 мМ на 12-е сут. опыта выживало 40% черенков сои, 20% - фасоли, а у маша к этому сроку все черенки отмирали. Выше была и общая укореняемость черенков сои. Этот показатель составил для сои, фасоли и маша в растворе 20 мМ – 60%, 40% и 0%, а в растворе 10 мМ – 70%, 55% и 20% соответственно. ЭБ повышал выживаемость и укореняемость как контрольных, так и культивируемых в растворах NaCl черенков фасоли, сои и маша (табл. 1). У предобработанных изолированных структур наблюдали закладку большего количества боковых корней, чем в контроле. Активный ризогенез наблюдался во всех вариантах, однако в условиях засоления только при предобработке ЭБ он сопровождался повышением продолжительности жизни и выживаемости. Укореняемость контрольных черенков фасоли при предобработке ЭБ в контроле (без засоления среды) возросла с 75 до 100%, а в растворе NaCl – с 55 до 65% при его концентрации 10 мМ, с 40 до 55 % - при 20 мМ. Даже при более высокой концентрации (40 мМ) наблюдалось ослабление эффекта действия хлорида натрия. У маша при повышении засоления укоренялись только черенки, предобработанные ЭБ.

Таблица 1 - Реакция гипокотильных черенков бобовых на растворы NaCl после предобработки ЭБ
Table 1 - Reaction of hypokotil cutting legumes to NaCl after pretreatment of epibrassinolide

Вариант	Выживаемость на 12 сут, %			Средняя ПЖ, сут.			Общая укореняемость, %		
	soя	фасоль	маш	soя	фасоль	маш	soя	фасоль	маш
1a	80	75	20	24	16	12	90	75	60
2a	100	100	50	24	20	12	100	100	80
1б	90	60	5	26	13	11	70	55	20
2б	100	90	10	26	16	12	90	65	35
1в	40	20	0	23	9	9	60	40	0
2в	90	80	0	23	9	11	80	55	10
1г	40	0	0	23	9	9	40	35	0
2г	75	20	0	23	9	10	50	45	0

Примечание. Здесь и в табл. 2: обозначения вариантов - предобработка: 1 – H₂O, 2 – ЭБ; культивирование: а – H₂O, б-г – NaCl 10, 20, 40 мМ.

Предобработка черенков колеуса эпином ускоряла развитие корней, они быстрее завершали полное массовое укоренение. У необработанных черенков сроки ризогенеза оказались более растянутыми. У абутиллона в варианте с эпином укореняемость достигла 100% и увеличивалось количество корней на 1 черенок (с 5 до 9), хотя на размеры корней и величину ризогенно-активной зоны обработка не влияла независимо от объекта (табл.2).

Таблица 2 - Влияние эпина на укореняемость черенков колеуса (А) и абутиллона (Б) в условиях засоления

Table 2 - Influence on the rooting of cuttings of *Coleus* (A) and *Abutilon* (B) in saline conditions

Вариант	Укореняемость, %			Число корней на 1 черенок, шт.			Максимальная длина корня, мм	Ризогенная зона, мм	
	1	2	3	1	2	3			
А	1a	30	60	100	11	12	30	14	30
	2a	75	100	100	2	6	60	11	32
	1б	20	55	100	6	9	30	12	30
	2б	60	70	100	4	7	40	13	30
Б	1a	30	45	60	1	5	5	14	62
	2a	30	50	100	1	5	9	10	30
	1б	0	15	25	-	1	1	3	8
	2б	0	0	5	-	-	1	1	5
	1д	0	10	15	-	1	2	1	10
	2д	0	0	10	0	-	1	1	5

Черенки колеуса развивали корни и при засолении среды, но с задержкой. Обработка эпином ускоряла темпы ризогенеза и снижала отрицательный эффект хлорида натрия. Абутиллон оказался менее устойчивым к засолению. Лучший результат укоренения наблюдали при обработке ЭБ, хотя не удавалось ослабить эффект полулетальных и летальных концентраций соли (50 мМ).

Защитная роль ЭБ при действии медного купороса изучена на проростках и черенках сортов редиса (сортов «РБК» (розово - красный с белым кончиком) и «18 дней»). Более выраженными были различия контрольных и опытных вариантов по биомассе проростков и размерам корней. Так, у сорта 18 дней масса проростков в контроле составила 164, при обработке эпином – 203 мг. Эти же показатели у проростков семян, проращиваемых в растворе сульфата меди, составили 149 и 300 мг соответственно. У сорта РБК подобная картина наблюдалась при сравнении размеров корней, по их биомассе различия были менее выражены. Некоторое ослабление отрицательного действия медного купороса отмечено у черенков с предобработкой эпином (табл. 3).

Таблица 3 - Влияние медного купороса и ЭБ на состояние проростков (1) и черенков (2) сортов редиса

Table 3 - Influence of copper sulfate and epibrassinolide on the state of germs (1) and cuttings (2) varieties of radish

Варианты		Всхо- жесть, %	Укореня- емость, %	Биомасса, мг		Длина корня, мм		Длина надзем- ной части, мм	
обра- ботки	культиви- рования			1	2	1	2	1	2
РБК									
H ₂ O	H ₂ O	100	100	118	105	30	21	25	30
ЭБ	H ₂ O	100	100	111	107	33	25	36	30
H ₂ O	CuSO ₄	80	70	104	85	37	17	24	28
ЭБ	CuSO ₄	90	80	96	92	40	20	28	29
18 дней									
H ₂ O	H ₂ O	100	100	164	110	75	31	25	18
ЭБ	H ₂ O	100	100	203	115	44	36	45	21
H ₂ O	CuSO ₄	94	65	149	101	33	27	45	14
ЭБ	CuSO ₄	88	57	300	106	37	30	57	17

В целом сравнение разных показателей жизнеспособности черенков свидетельствует о возможности использования ЭБ для ослабления действия засоления и тяжелых металлов на растения и изолированные органы. При этом реакция черенков и проростков на действие хлорида натрия медного купороса, как и предобработку гормоном, оказывается видо- и сортоспецифичной. Показанная возможность повышения жизнеспособности черенков, наблюдаемая как в благоприятных условиях культивирования, так и при стрессе, имеет и практическое значение и нуждается в проверке на трудноукореняемых черенках древесных растений.

Литература

1. Grove M.D., Spence G.F., Rohweder W.K., et al. Brassinosteroid a plant growth promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen // Nature, 1979. V. 281. P.281.
2. Хрипач В.А., Лахвич Ф.А., Жабинский В.М. Брассиностероиды. Минск: Наука и техника, 1993. 283 с.
3. Прусакова Л.Д., Чижова С.И. Применение брассиностероидов в экстремальных для растений условиях // Агрехимия, 2005. №7. С.87-94.
4. Sathyamoorthy P., Nakamura S. *In vitro* root induction by 24-epibrassinolide on hypocotyl segments of soybean // Plant Growth., 1990. V.9. № 1. P.73.

PROTECTIVE EFFECT OF EPIBRASSINOLIDE ON ISOLATED ORGANS OF PLANTS UNDER THE INFLUENCE OF SODIUM CHLORIDE AND COPPER SULFATE

Alieva Z.M.

isolated organs, cuttings, rooting, epibrassinolide, NaCl, CuSO₄

Brassinosteroids - a group of natural regulators capable of improving the growth and productivity of plants, their resistance to various adverse factors. The aim of this work was to specifying the role of epibrassinolide on reaction of rooting cuttings plants to NaCl and CuSO₄. The comparison of different indicators of viability cuttings indicates the possibility of the use of epibrassinolide to reduce the effects of salinity and heavy metals on plants and isolated organs.

**ВВЕДЕНИЕ *NEOTTIANTHE CUCULLATA* (L.) SCHLECHTER
В КУЛЬТУРУ *IN VITRO***

Андрюшечкина Г.В., Фатеева Е.В., Мокшин Е.В., Лукаткин А.С.

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева»,
ул. Большевистская, 68, г. Саранск, 430005, Россия. E-mail: aslukatkin@yandex.ru

Neottianthe cucullata, орхидные, *in vitro*, среда Мурасиге-Скуга, стерилизация, жизнеспособность

Неоттианта клобучковая (*Neottianthe cucullata* (L.) Schlechter) – представитель семейства орхидные (*Orchidaceae*). Внесена в Красную книгу Республики Мордовия [1], Российской Федерации [2] и РСФСР [3]. Категория редкости 2 – уязвимый вид. На территории Мордовии зарегистрирована в Большеберезниковском, Темниковском и Ичалковском районах [4]. Лимитирующими факторами для неоттианты клобучковой являются: вырубка коренных лесов, антропогенное воздействие, нарушающее лесную подстилку и травостой, неблагоприятные климатические условия [1].

Интерес к культивированию орхидей определяется как декоративными свойствами, так и проблемой сохранения их биоразнообразия. Наряду с традиционными методами сохранения растений *ex situ*, применение культуры изолированных тканей и органов становится все более распространяющимся. Метод культур тканей, или размножение *in vitro*, исключительно удобен для быстрого размножения и сохранения здоровых растений [5].

Одним из важных этапов введения в культуру *in vitro* является стерилизация посадочного материала, так как это влияет на инфицированность и жизнеспособность эксплантов. Целью нашей работы было изучить влияние режима стерилизации на инфицированность и жизнеспособность эксплантов *Neottianthe cucullata* (L.) Schlechter.

Для стерилизации использовали следующие стерилизующие агенты: 0,1% KMnO_4 , 70% этанол, 6% хлорамин, 50% Domestos. Стерилизацию кусочков корневищ проводили по двум схемам. Первая включала в себя промывку объектов проточной водой, затем мыльным раствором, ополаскивание в дистиллированной воде и экспозицию в 0,1% KMnO_4 (25 мин.), 70% этаноле (1–2 мин.), 6% хлорамине (15–20 мин.). Во втором случае стерилизацию осуществляли по той же схеме, но 6% хлорамин был замещен на 50% Domestos (25 мин.). Посадку эксплантов проводили на агаризованную (0,7%) среду по прописи Мурасиге и Скуга (pH 5,6–5,8), дополненную 1,5 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК) и 2,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП). Культивирование эксплантов осуществляли в пробирках при естественном освещении и температуре 23–25 °С.

В ходе проведения эксперимента получены следующие результаты. Комбинация 0,1% KMnO_4 (25 мин) + 70% этанол (1 мин) + 6% хлорамин (15 или 20 мин) показала процент инфицированности эксплантов 76 и 63% при времени экспозиции 15 и 20 минут, соответственно. В то же время комбинация 0,1% KMnO_4 (25 мин) + 70% этанол (1 мин) + 50 % Domestos (25 мин) привела к резкому снижению инфицированности эксплантов (до 9%).

Второй характеристикой, указывающей на эффективность режимов стерилизации, является жизнеспособность эксплантов, которую оценивали по внешнему виду эксплантов, морфогенезу и последующему росту. Максимальное количество жизнеспособных эксплантов (91%) зафиксировано в варианте стерилизации с использованием 0,1% KMnO_4 (25 мин) + 70% этанола (1 мин) + 50 % Domestos. В дальнейшем, после появления каллусной ткани и/или органогенеза, будет проведена регенерация растений и их клональное размножение.

Таким образом, при введении *Neottianthe cucullata* в культуру *in vitro* более эффективной оказалась комбинация 0,1% KMnO_4 (25 мин) + 70% этанол (1 мин) + 50 % Domestos (25

мин), которая позволила получить максимальное количество жизнеспособных эксплантов с минимальной инфицированностью.

Литература

1. Красная книга Республики Мордовия. Т. 1: Редкие виды растений, лишайников и грибов / Сост. Т. Б. Силаева. – Саранск: Мордов. кн. изд-во, 2003. – Т. 1. 288 с.
2. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М.: Товарищество науч. изд. КМК, 2008. 855 с.
3. Красная книга РСФСР. Том 2: Растения. М.: Росагропромиздат. 1988 г. – 591 с.
4. Сосудистые растения Республики Мордовия (конспект флоры): монография / Т. Б. Силаева, И. В. Кирюхин, Г. Г. Чугунов [и др.]; под ред. Т. Б. Силаевой. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2010. – 352 с.
5. Ветчинкина Е. М. Использование биотехнологических методов для сохранения генофонда редких и ценных видов растений // Матер. IX конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». – Звенигород, 2008. – С. 66.
6. Мокшин Е. В. Практикум по культуре растительных клеток и тканей: Учебное пособие / Е. В. Мокшин, А. С. Лукаткин. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та. – 2009. – 48 с.

INTRODUCTION OF *NEOTTIANTHE CUCULLATA* (L.) SCHLECHTER IN CULTURE *IN VITRO*

Andryushechkina G.V., Fateeva E.V., Mokshin E.V., Lukatkin A.S.

Neottianthe cucullata, Orchidaceae, *in vitro*, Murashige and Skoog medium, sterilization, viability

Neottianthe cucullata (L.) Schlechter is a species from Orchidaceae, included in Red Book of the Mordovia Republic as well as in Red Book of the Russian Federation, with category 2 - a vulnerable species. The effect of *N. cucullata* sterilization was studied on the explants (fragments of rhizomes) infection and viability. As a sterilizing agent was used 0,1% KMnO₄, 70% ethanol, 6% chlorine amine, 50% Domestos. At *N. cucullata* introduction to the culture *in vitro* was noted more effective combination of 0,1% KMnO₄ (25 min) + 70% ethanol (1 min) + 50% Domestos (25 min), which allowed to obtain the maximum number of viable explants with minimal infection.

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

Баранова Е.Н.¹, Халилуев М.Р.¹, Данилова С.А.², Куренина Л.В.¹, Гулевич А.А.¹, Юрьева Н.О.², Ралдугина Г.Н.²

¹ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, ул. Тимирязевская, 42, г. Москва, 127550, Россия

²ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, г. Москва, 127276, Россия, E-mail: pro2007@rambler.ru

трансгенные растения, ультраструктура органоидов, эпидермис, gfp, aadA, recA, FeSOD1, OsMyb4, Δ-12-ацил-липидная десатураза

Введение

Одним из ключевых этапов генетической трансформации растений является отбор трансформированных клеток, тканей и, соответственно, растений при помощи маркерных и/или селективных генов. Кроме того, они существенным образом упрощают проведение отбора в последующих поколениях, а также, в ряде случаев, позволяют проводить прижизненную оценку экспрессии. Все методы оценки представляют собой визуальную идентификацию преимущественно по изменению окраски как с использованием субстратов, так и без них, а также сохранению, либо потере жизнеспособности. В настоящее время используется более 50 таких генов [1]. Наиболее часто для отбора трансгенных растений используют гены, придающие устойчивость к антибиотикам или гербицидам, либо маркерные гены, например, *gfp* и *uidA*. В экспериментах по трансформации, в которых интегрируемый ген должен экспрессироваться в определенном компартменте клетки, используются селективные и маркерные гены с измененным составом кодонов, и снабженными регуляторными последовательностями для функционирования генетического аппарата в этих органоидах, или гены, приводящие к изменению функциональных особенностей компартмента, например, придающие растениям золотистую окраску [2]. В связи с этим, важным представляется изучение изменений структурно-функциональных характеристик листа, влияющих на наиболее значимые процессы жизнедеятельности растения – фотосинтеза, дыхания, транспирации и других. Целью настоящей работы было выявление влияния экспрессии маркерных, селективных и целевых генов на цитологические характеристики и структурную организацию митохондрий и пластид в клетках тканей листа.

Материалы и методы

Растительный материал. Объектом исследований служили трансгенные растения: транспластомные растения *N. tabacum* L., содержащие в хлоропластном геноме кассету экспрессии с селективным геном *aadA^{ant}* [2]; *B. napus* L., экспрессирующие гены *gfp* и *OsMyb4* [3]; *S. tuberosum* L., экспрессирующие гены *recA* и *Δ-12-ацил-липидной десатуразы* [4]; *N. tabacum* L. и *S. lycopersicum* L., экспрессирующие гены *nptII* и *FeSOD1* [5].

Анализ поверхности нижнего и верхнего эпидермиса листа. В работе использовали фрагменты срединной части 3-го листа (1-1,5 см³) контрольных, трансгенных и транспластомных растений. На верхнюю или нижнюю сторону листовых высежек наносили 1,5% парлодия, растворенного в амилацетате. После высушивания пленку закрепляли на предметном стекле и просматривали под световым микроскопом в фазовом контрасте при увеличении x10 и x20.

Анализ ультраструктуры пластид мезофилла листа. Поперечные кусочки срединной части листа контрольных, трансгенных и транспластомных растений фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере Серенсена (рН 7,2) и 1% растворе OsO₄. Образцы заключали в смолу по стандартной методике. Ультратонкие срезы контрастировали препараты уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу. Исследования препаратов проводили на микроскопе H-500 (Hitachi, Япония).

Результаты и обсуждение

Ранее было установлено, что экспрессия ряда генов оказывает влияние на структурную организацию пластид [4,5]. Вопрос влияния маркерных и селективных генов остается не ясным. Считается, что они не вызывают значительных структурных изменений. Нами установлено, что использованные в работе гены *aadA^{ant}*, *gfp*, *recA* влияли на структуру клеток эпидермиса, количество и расположение устьиц у трансгенных и транспластомных растений. Это свидетельствует о том, что экспрессия гетерологичных генов может существенно влиять на процессы фотосинтеза, дыхания и структурную организацию растительных тканей. Для ряда трансгенных линий, экспрессирующих маркерные и селективные гены, нами выявлено изменение ультраструктурной организации клеток тканей листа. Однако в отличие от трансгенных растений, экспрессирующих как маркерные/селективные, так и целевые гены, изменения у растений, экспрессирующих только маркерные или селективные гены, не приводили к кардинальной перестройке субкомпарментов исследовавшихся клеточных органоидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 13-08-01323 а, 13-08-01248.

Литература

1. Miki B., McHugh S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety // J. Biotechnol. 2004. V. 107. P. 193–232.
2. Maliga, P., Tungsuchat-Huang, T. Plastid Transformation in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glauca* by Biolistic DNA Delivery to Leaves. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ), 2013. 1132, 147-163.
3. Gomaа, A. M., Raldugina, G. N., Burmistrova, N. A., Radionov, N. V., Kuznetsov, V. V. Response of transgenic rape plants bearing the *Osmyb4* gene from rice encoding a trans-factor to low above-zero temperature. // *Russian Journal of Plant Physiology*, 2012. 59(1), 105-114.
4. Маали Р.А., Голденкова-Павлова И.В., Юрьева Н.А., Пчелкин В.П., Цыдендамбаев В.Д., Верещагин А.Г., Дерябин А.Н, Трунова Т.И., Лось Д.А., Носов А.М.. Жирнокислотный состав липидов растений картофеля, трансформированных геном дельта-12-десатуразы цианобактерий. // *Физиология растений*. 2007. V. 54(5). С. 678-685.
5. Baranova E.N., Serenko E.K., Balachnina T.I., Kosobruhov A.A., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Maisuryan A.N. Activity of the Photosynthetic Apparatus and Antioxidant Enzymes in Leaves of Transgenic *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* Plants, With *FeSOD1* Gene // *Russian Agricultural Sciences*. 2010. V. 36. P. 242-249.

CYTOLOGICAL EFFECTS OF EXPRESSION HETEROLOGICAL GENES IN TRANSGENIC PLANTS

Baranova E.N., Khaliluev M.R., Danilova S.A., Kurenina L.V., Gulevich A.A.,
Yur'eva N.O., Raldugina G.N.

transgene plant, ultrastructure of organelles, epidermis, gfp, aadA, recA, FeSOD1, OsMyb4, Δ-12-acyl-lipid desaturase

The effect of heterologous genes leading to changes in the structural organization of the cells of the lower and upper epidermis and ultrastructure of organelles in the mesophyll cells of leaves of transgenic plants of tobacco, tomato, canola, and potato expressing the different selectable marker genes and the genes of interest was studied. Some selective and marker genes had a significant impact on the structural organization of cell organelles.

Таджикский национальный университет, проспект Рудаки 17, г. Душанбе, 734025,
Таджикистан, E-mail: bobojankh_7@bk.ru

виноград, культура in vitro, клональное микроразмножение

Введение

Таджикистан считается одним из центров происхождения и разнообразия винограда (*Vitis vinifera* L.) по Н.И.Вавилову [1] и в стране выращиваются самые разнообразные по биологии и хозяйственно-ценным свойствам, назначению и срокам созревания сорта винограда. Всего на территории страны произрастает более двух тысяч сортов, ряд из них являются аборигенами различных районов республики. Среди них наиболее известны такие сорта как – Тагоби, Сохиби, Чиллаги черный, Худжанди – в Ходженге, Чиллаги белый и Ангури калон (Нимранг) – в Истаравшане, Расми и Хамирак – в Раште, Лаъл, Мухчилони, Джаус белый (Султони) – в Гиссаре, Ангур сафеди, Лаъли хуша дароз, Ангури чочи шутур – в Кулябской зоне, Ангури сиёх шаартузский – в Нижнекофарнихонской долине и ряд других [2].

С целью сохранения генетического разнообразия сортов винограда в коллекции Центра биотехнологии собрано более 100 сортов и форм культуры. Среди них есть и сорта, полученные таджикскими селекционерами, такие как Гиссарский ранний, Зариф, Миёна, Боботог, Зебо, Анзоб, и др. К сожалению, многие местные ценные сорта винограда представлены несколькими кустами на коллекционных виноградниках или приусадебных участках, часть из них находится на грани исчезновения.

Современные методы биотехнологии успешно используются для сохранения и воспроизводства представителей многих видов растений, в том числе ценного генофонда винограда. Морфогенез винограда в культуре *in vitro* характеризуется высокой видовой специфичностью и разработанная методика не может быть эффективной для всех сортов. В связи с этим, цель настоящей работы заключалась в получении стерильной культуры жизнеспособных эксплантов местных сортов винограда. Важным моментом остается сохранение стабильности морфо-физиологических особенностей и хозяйственно-ценных признаков сортов при оздоровлении винограда и многократном черенковании *in vitro*.

Материалы и методы

Объектами исследования служили сорта винограда местной селекции. В качестве исходных эксплантов использовали апикальные и пазушные почки. Инициацию культуры *in vitro* проводили в апреле месяце, в начале вегетации винограда *in vivo*. Стерилизацию осуществляли по следующей схеме: 70%-ный этанол – 1 мин., 30%-ная перекись водорода – 10 мин., промывка автоклавированной дистиллированной водой – 5 мин. Для размножения *in vitro* использовали модифицированную среду Мурасиге-Скуга [3]. Условия культивирования: освещение 4 000 тыс.Лк, температура - +23-25°C, влажность воздуха 70-80%, фотопериод 16/8 ч.

Применение методов биотехнологии для решения проблем обеспечения сертифицированным посадочным материалом имеет преимущества перед традиционно используемыми подходами. Широко используемый метод культуры *in vitro* является одним из наиболее эффективных методов ускоренного размножения и производства исходного посадочного материала. Данный метод позволяет в короткие сроки получить материал, свободный от вирусной инфекции в необходимом количестве и получить потомство, генетически идентичное исходному виду или форме. Однако для каждого растения разрабатываются свои методы и подходы, в том числе и для винограда.



Рисунок 1 - Развитие меристем винограда в микропобеги
 Figure 1 - Meristem development of grapes in microshoots



А

Б

Рисунок 2 - Множественное побегообразование в культуре винограда
 Figure 2 - Multiple shoot formation in the grapes culture



Рисунок 3 - Корнеобразование растения винограда
 Figure 3 - Rooting of grape plant



Рисунок 4 - Пробирочные растения винограда
 Figure 4 - Test-tube plants of grape

На данный момент в работу включены 44 сорта винограда. В результате проведенных исследований для всех объектов показана специфичность поведения эксплантов, которая характеризуется разной степенью их выживаемости и способности к дальнейшему размножению в стерильных условиях. Очевидно, что для этих сортов следует тщательно отработать

данный этап. В результате экспериментальных работ получена коллекция пробирочных растений, состоящая из 20 сортов винограда.



Рисунок 5 - Адаптация пробирочных растений винограда к почвенным условиям
Figure 5 - Adaptation of test-tube plants of grape to soil conditions

Заключение

В серии экспериментов проведено оздоровление, введение в культуру *in vitro*, размножение и адаптация к естественным условиям прорастания растений винограда. Среди основных проблем следует отметить отсутствие разработанных методов культуры *in vitro* для так называемых «трудных» видов. Однако эти проблемы являются разрешимыми. Многообразие возможностей современной биотехнологии растений позволяют использовать их для получения достаточного количества посадочного материала, а также сохранения редких и исчезающих видов растений.

Литература

1. Вавилов Н. И. Ботанико-географические основы селекции / В кн. Теоретические основы селекции растений. Т-1. М., 1935. С. 26-63.
2. Шарипов, Н., Имомкулова, З.А. Сохранение и обогащение генофонда винограда в Таджикистане. Интернет ресурс <http://eurowine.com.ua/node/16863>.
3. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant.* – 1962. – V.15. – P.473-497
4. Абдулалишоева С.Ф., Бабаева С.Х., Бободжанова Х.И., Ясаулова Ш.К. Сохранение биоразнообразия винограда в Таджикистане // В материалах IX международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии». Гродно, 23 – 25 октября 2013г., с. 10 – 11.

THE REPRODUCTION OF LOCAL GRAPE VARIETIES BY APPLICATION OF *IN VITRO* CULTURE

Bobodzhanova Kh.I., Abdulalishoeva S.F., Babaeva S.Kh., Yasaulova Sh.K.

grape, in vitro culture, micro propagation

Application of biotechnological methods for propagation of grape varieties for conservation of genetic resources, as well as for production healthy planting material and accelerating the breeding process have been proven by carrying out a set of experiments. A collection test-tube plants of 20 varieties of grapes is created.

Институт экологии Волжского бассейна РАН, ул. Комзина, 10, г. Тольятти, 445003, Россия,
E-mail: cornales@mail.ru

Plantaginaceae, пигменты, липиды, полисахариды, фенольные соединения

Введение

Растения семейства *Plantaginaceae* Juss. широко используются в производстве ряда лекарственных препаратов и являются источником биологически активных веществ (БАВ). В настоящий момент растения этого семейства насчитывают 4 рода и 260 видов [1]. Однако России в качестве источника БАВ, в основном, востребован только *Plantago major* (подорожник большой). В медицине других стран наряду с *P. major* используются другие виды, например, *Plantago lanceolata* L. и *Plantago afra* L. – в Великобритании, *P. psyllium* – в Америке и Японии.

В Государственной Фармакопее Российской Федерации одним из критериев, согласно которому данное растение входит в разряд лекарственных, является высокая (не менее 12% от сухого веса) концентрация полисахаридов (ПС). Биологически активные свойства проявляют и другие вещества. Так листья *P. major*, кроме ПС, обогащены флавоноидами, оксикоричными кислотами, иридоидами, а семена – сапонинами, углеводами, слизью и жирными маслами. Все эти вещества обладают определенными лечебными свойствами. Например, ПС оказывают терапевтический эффект при лечении язвенной болезни и выведении из организма солей тяжелых металлов, радионуклеидов [2]. Флавоноиды используются в качестве антиоксидантов, регулирующих свободнорадикальные процессы и обладающие капилляроукрепляющей (*P-витаминной*) активностью в косметике и медицине. На сегодняшний момент современная медицина в терапевтических целях активно использует экстрактивные компоненты мембран, такие как фосфолипиды (ФЛ) [3].

Из литературы известно, что филогенетически родственные виды часто содержат схожие по своей химической структуре соединения, однако качественное и количественное содержание полезных веществ может значительно различаться. Это связано с тем, что на растительный организм огромное влияние оказывает среда обитания. Отметим также, что под влиянием антропогенных воздействий наблюдается значительное уменьшение ресурсов многих видов растений в зоне распространения популяции. В этой связи становится необходимым целенаправленный поиск новых источников БАВ в недостаточно изученных растениях.

Цель работы – исследовать качественный и количественный состав не исследованных ранее представителей сем. *Plantaginaceae*.

Материалы и методы

Растения *P. media* L., *P. major* L., *P. lanceolata* L., *P. stepposa* Kupr., *P. uliginosa* F.W. Schmidt отбирали на территории Национального парка «Самарская Лука», *P. cornuti* Gouan, *P. salsa* Pall. – на территории Сергиевского района Самарской области в июле 2012 г. в фазе цветения. В работе использовали листья, собранные с 12–15 растений. Из общей массы составляли три независимых биологических пробы (2–4 г сырой массы). Разделение и анализ ФЛ, глико – (ГЛ) и нейтральных липидов (НЛ) проводили по методам, описанным ранее [4]. Содержание ПС определяли гравиметрическим методом, предварительно обрабатывая растительное сырье хлороформом для удаления неуглеводных компонентов, витамин С – по методу описанному в Государственной фармакопее [5], фенольные соединения – гравиметрическим методом после удаления хлороформом липофильных веществ и хлорофиллов [6], а содержание фотосинтетических пигментов – по методу Lichtenthaler [7].

Результаты и обсуждение

Данные, приведенные в таблице, показывают, что общее содержание ПС в листьях растений варьировало в интервале 321,0–793,1 мг/г сухой массы, при этом максимальное их количество было обнаружено в листьях *P. cornuti* и *P. salsa*. Содержание фенольных веществ уменьшалось в ряду *P. cornuti* > *P. uliginosa* > *P. salsa* > *P. major* > *P. lanceolata* > *P. media* > *P. stepposa*. Листья *P. media* характеризовались наиболее высоким содержанием витамина С (до 2 мг/г сухой массы).

Таблица 1 - Содержание БАВ в листьях растений сем. *Plantaginaceae*

Table 1 - Content of BAS in the leaves of the family *Plantaginaceae*

Виды растений	Содержание БАВ, мг/г сухой массы				
	полисахариды	фенольные вещества	витамин С	хлорофиллы	каротиноиды
<i>P. media</i>	321,0±0,01	100,0±0,1	1,8±0,07	1,39±0,03	0,28±0,06
<i>P. major</i>	535,6±0,01	132,2±0,5	0,5±0,05	1,65±0,02	0,32±0,02
<i>P. lanceolata</i>	530,3±33,2	126,5±4,5	0,7±0,03	0,84±0,01	0,14±0,01
<i>P. stepposa</i>	441,6±14,3	87,8±5,1	0,9±0,04	0,95±0,06	0,23±0,01
<i>P. uliginosa</i>	613,9±4,0	165,7±5,5	1,2±0,04	0,71±0,12	0,16±0,01
<i>P. cornuti</i>	793,1±7,4	169,4±1,0	1,5±0,02	1,93±0,02	0,55±0,02
<i>P. salsa</i>	741,6±37,1	142,4±4,7	0,3±0,03	1,22±0,1	0,30±0,06

Установлено, что наибольшее количество хлорофиллов накапливалось в листьях *P. major* и *P. cornuti*. Кроме того, у *P. cornuti* отмечен высокий уровень каротиноидов.

Суммарное содержание веществ липидной природы распределялось в порядке убывания: *P. cornuti* > *P. salsa* > *P. lanceolata* > *P. media* > *P. stepposa* > *P. major* > *P. uliginosa*. При этом, как показывают данные рисунка, больше всего ГЛ накапливали листья *P. lanceolata*, ФЛ – *P. salsa*, а НЛ – *P. cornuti*.

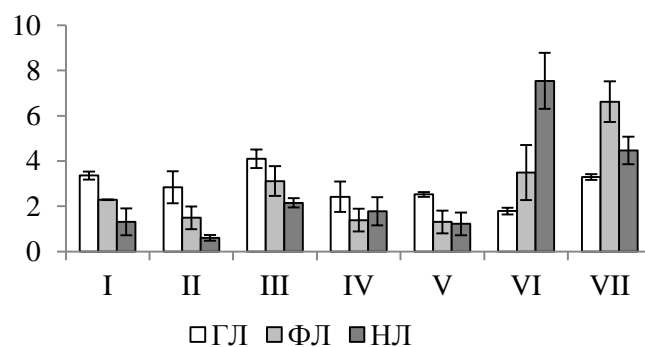


Рисунок 1 - Содержание ГЛ, ФЛ, и НЛ в листьях сем. *Plantaginaceae* (мг/г сырой массы)

I – *P. media*, II – *P. major*, III – *P. lanceolata*, IV – *P. stepposa*, V – *P. uliginosa*, VI – *P. cornuti*, VII – *P. salsa*.

Figure 1 - Contents of GL, PL and NL in the leaves of the family *Plantaginaceae* (mg/g fresh weight)

Выводы

Таким образом, по суммарному содержанию проанализированных БАВ растения располагаются в следующем ряду: *P. cornuti* > *P. salsa* > *P. major* > *P. uliginosa* > *P. media* > *P. lanceolata* > *P. stepposa*. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследованные виды растений могут быть рекомендованы в качестве альтернативного источника сырья для производства на их основе лекарственных препаратов.

Литература

1. Шипунов, А.Б. Подорожники (Роды *Plantago* L. и *Psyllium* Mill., *Plantaginaceae*) Европейской России и сопредельных территорий: Дис. ... канд. биол. наук. М., 1998. 226 с.
2. Оводов, С.Ю. Полисахариды цветковых растений: структура и физиологическая активность // Биоорганическая химия. 1998, Т. 24, № 7. С. 483-501.
3. Minakshi, M.S., Mulchand, S.A, Deul, K.B., Nayna, J.M. Herbosomes: herbosphospholipid complex an approach for absorption enhancement // Intern. J. of Biol. Pharm. Res. 2012, V. 3, N 8. P. 946-955.
4. Розенцвет, О.А., Нестеров, В.Н., Богданова, Е.С. Влияние абиотических факторов на состав липидов *Ulva intestinalis* (L.) Link (*Chlorophyta*) в малых реках бассейна оз. Эльтон Прикаспийской низменности // Биология внутренних вод, 2012, № 2, 61-69
5. Государственная Фармакопея СССР. Выпуск 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / Под ред. М.Д. Машковский [и др.] – М. 1989. 400 с.
6. Краснов Е.А., Березовская Т.П., Алексеюк Н.В. Выделение и анализ природных биологических веществ. – Томск: 1987. 631 с.
7. Lichtenthaler H.K. Chlorophyll and carotinoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods Enzimol. 1987. V. 148. P. 331-382.

PHYTORESOURCE POTENTIAL OF PLANTS OF THE FAMILY *PLANTAGINACEAE*

Bogdanova E.S., Rozentsvet O.A., Nesterov V.N.

Plantaginaceae, pigments, lipids, polysaccharides, phenolic compounds

There was studied qualitative and quantitative composition of some biologically active substances (BAS) in the plant leaves of the family *Plantaginaceae*, including pharmacopoeia *P. major*. According to the total content of BAS the plants are located in the following order: *P. cornuti* > *P. salsa* > *P. major* > *P. uliginosa* > *P. media* > *P. lanceolata* > *P. stepposa*. The researched types of plants can be recommended as an alternative source for the production of raw materials based on these drugs.

**АССОЦИАТИВНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕРИКЛОНОВ КАРТОФЕЛЯ И
БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP 245
В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *EX VITRO***

Бойкова Н.В.¹, Ткаченко О.В.¹, Евсеева Н.В.², Матора Л.Ю.², Бурыгин Г.Л.²,
Авдеева Е.С., Щеголев С.Ю.²

¹ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени
Н.И. Вавилова», Театральная пл. 1, г. Саратов, 410012, Россия,

E-mail: n.boikova.ya@yandex.ru, oktkachenko@yandex.ru

²ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
г. Саратов, пр. Энтузиастов, 13, 410049, Россия, E-mail: evseeva@ibppm.sgu.ru

мериклоны картофеля, Azospirillum brasilense Sp 245, in vitro, ex vitro

Введение

Технология регенерации растений из апикальных меристем с их последующим микроклональным размножением *in vitro* широко используется в современной биотехнологии для производства генетически однородного, оздоровленного посадочного материала пищевых, технических и декоративных культур. Но существует потребность в оптимизации данного метода в направлении усиления темпов роста микроклонов растений, а также повышения приживаемости полученных регенерантов после высадки в почву (*ex vitro*) (Деменко 2011). Актуальным является совершенствование технологии микроклонального размножения растений с использованием ассоциативных ростстимулирующих бактерий, к которым, в частности, относятся бактерии рода *Azospirillum*. Установлено, что азоспириллы способны не только увеличивать продуктивность сельскохозяйственных растений *in vivo* (Bashan 2010; Fibach-Paldi 2012), но и усиливать рост и развитие микроклонов, в частности, картофеля *in vitro* (Волкогон 2006), а также улучшать акклиматизацию фруктовых растений в условиях *ex vitro* (Vettori et al., 2010). Следует заметить, что еще очень мало полных работ, где формирование активно функционирующего растительно-микробного комплекса происходит не на этапе адаптации растения к условиям *ex vitro*, а еще в процессе их культивирования *in vitro*, что усиливает влияние микропартнера в период дальнейшей акклиматизации полученных регенерантов.

Цель работы – изучение возможности повышения эффективности роста и адаптационной способности микроклонов картофеля путем создания активно функционирующей ассоциации растений с бактериями *Azospirillum brasilense* Sp245 в культуре *in vitro*.

Материалы и методы

Использовались комбинирование методов бактериальной колонизации и микроклонального размножения растений картофеля в условиях *in vitro*. Исследования проводили на четырех сортах картофеля Невский, Кондор, Розара и Аврора из пересадочной коллекции кафедры растениеводства, селекции и генетики агрономического факультета ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». Были определены физиолого-морфологические параметры микроклонов картофеля в условиях *in vitro* (количество корней и узлов, длина побега и корня, митотический индекс корневых меристем), а также адаптационная способность и урожайность полученных регенерантов в условиях *ex vitro*. Проведена идентификация жизнеспособных бактериальных клеток, ассоциированных с корнями растений картофеля сорта Кондор в иммунохимической тест-системе с использованием моноспецифических антител к целым клеткам *A. brasilense* Sp245.

Результаты и обсуждение

Было показано, что азоспириллы усиливали митотическую активность клеток корневых меристем микроклонов картофеля в культуре *in vitro*, что согласуется с данными, полученными нами ранее при бактерилизации проростков пшеницы в экспериментах *in vivo* (Evseeva et al 2011), а также показано в работе бразильских ученых (Levanony, Bashan 1989). Можно предположить, что усиление митотической активности клеток корневых меристем микроклонов картофеля приводило к активизации морфогенетической программы развития регенерантов, что мы и наблюдали при определении морфологических параметров бактеризованных растений на 20 сут. культивирования. Темпы роста растений, инокулированных бактериями, увеличивались по сравнению с контрольными вариантами. В частности, бактеризованные растения отличались более развитой корневой системой с большим количеством точек роста боковых корней.

На следующем этапе из культуры в почву были высажены не стерильные растения, а активно функционирующая стабильная ассоциативная система «растение – микроорганизм». По полученным нами данным растения картофеля достаточно успешно перенесли высадку в грунт в контролируемых условиях оранжереи. Однако, в жестких стрессовых условиях после высадки в открытый грунт при значительном колебании суточных температур, существенном снижении влажности воздуха и повышенной интенсивности солнечного света эффект бактеризации проявился в значительной степени. По-видимому, разветвленная корневая система бактеризованных растений позволила им быстрее укорениться и обеспечить себя водой и минеральными компонентами. Бактеризованные растения быстрее приступили к вегетативному росту за счет повышенной адаптационной способности, сформировали большее число листьев с увеличенной площадью поверхности. На закладку клубней бактерии существенного значения практически не оказывали. Но бактеризованные растения формировали большую биомассу клубней, в среднем на 40% превышающую соответствующий показатель контрольных растений. При пересчете урожайность клубней с 1 м² достоверно увеличивалась в результате использования приема бактеризации микрорастений в культуре *in vitro* по всем сортам и в среднем по каждому генотипу более, чем на 45%.

Заключение

Наши исследования показали, что бактеризация растений может значительно повысить эффективность выращивания растений, как в культуре *in vitro*, так и в условиях *ex vitro* по сравнению с существующей традиционной техникой микроклонального размножения. Дальнейшее использование ростстимулирующих бактерий рода *Azospirillum* для инокуляции культурных растений при их микроклональном размножении является одной из перспективных направлений агробιοтехнологий, которые могут обеспечивать лучшую приживаемость растений к условиям *ex vitro* и урожайность семенного материала высших категорий.

Литература

1. Волкогон В.В., Димова С.Б., Мамчур А.Е. Особенности взаимоотношений бактерий рода *Azospirillum* с растениями картофеля, культивируемыми *in vitro* / Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. 2006. вип.3. стр. 19-25.
2. Деменко В.А., Лебедев В.А. (2011) Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям. Известия ТСХА, 1: 60–70.
3. Bashan Y, de-Bashan LE (2010) How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. *Adv Agron* 108:77–136.
4. Evseeva N. V, Matora L. Yu., Burygin G.L., Dmitrienko V.V., Shchyogolev S. Yu. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells // *J. Plant and Soil.* – 2011. – V. 346. – P. 181–188.
5. Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. (2012) Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 326 (2): 99–108.
6. Levanony H, Bashan Y (1989) Enhancement of cell division in wheat root tips and growth

of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. Can J Bot 67:2213–2216

7. Vettori L., Russo A., Felici C., Morini S. And Toffanin A. (2010) Improving micropropagation: effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on acclimatization of rootstocks of fruit tree. Journal of Plant Interactions 5 (4): 249–259.

**ASSOCIATIVE INTERACTION OF POTATO MERICLONES AND BACTERIA
AZOSPIRILLUM BRASILENSE SP 245 *IN VITRO* AND *EX VITRO***

Boykova N.V., Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Matora L.Yu., Burygin G.L.,
Avdeeva E.S., Shchyogolev S.Yu.

potato mericlones, Azospirillum brasilense Sp 245, in vitro, ex vitro

The positive influence of bacteria *Azospirillum brasilense* Sp 245 on growth and development of potato mericlones in conditions *in vitro*, as well as adaptive capacity and productivity of plants in conditions *ex vitro*. Survival ability of bacterized plants in the open ground conditions was 1.5 times higher compared to the control group. Tuber yield from 1 m² increased by more than 45% as a result of bacterization of microplants in culture *in vitro*.

**ПОЛУЧЕНИЕ ЗЕЛЕННОГО КОРМА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ БЕЛКА
В ПОЗДНЕОСЕННИЙ ПЕРИОД И СОХРАНЕНИЕ ПЛОДОРОДИЯ ПОЧВЫ
КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ**

Буянкин Н.И., Краснопёров А.Г.

ГНУ Калининградский научно-исследовательский институт сельского хозяйства РАСХН,
пер. Молодежный, 9, пос. Славянское Полесского района Калининградской обл., 238651,
Россия, E-mail: akras_01@rambler.ru

летний посев, плодородие почвы, зеленый корм, сидерация почвы

Целью данной технологической разработки является обоснование эффективности летних посевов кормовых культур, повышение питательной ценности корма и экономичности процесса его получения с одновременным сохранением плодородия почв Калининградской области.

Поставленная цель решается тем, что кормовые культуры высевают в первой–второй декадах июля, первой декаде августа. Такие сроки посева повышают качество зелёного корма за счёт увеличения содержания каротина, белка и других питательных веществ, снижения уровня клетчатки, сохранения плодородия почвы.

Световые и температурные условия второй половины лета более благоприятны для вегетации растений, формирования у них мощной ассимиляционной поверхности, которая по своим размерам превосходит общепринятые пределы. Именно благодаря этому, а также удлинению периода произрастания летних и позднелетних посевов, несмотря на сокращение притока в конце лета – начале осени активности радиации, обеспечивается получение высоких урожаев биомассы кормовых культур. У среднеспелых сортов овса урожай зелёной массы при весеннем посеве составляет 33,56 т/га (сухого вещества 5,05 т/га), при летнем посеве – 49,34 т/га (6,52) и позднелетнем – 34,23 т/га (4,47 т/га), а у скороспелого сорта, соответственно – 24,28 т/га (3,96), 32,06 т/га (4,0) и 35,10 т/га (4,7 т/га). Примерно такая же закономерность в урожае зелёной массы и сухого вещества наблюдается у капустовых и бобовых культур. В летних посевах кормовых культур наблюдается повышенное качество их зелёной массы со снижением содержания сырой клетчатки (табл. 1).

Таблица 1 – Качество зелёной массы овса в зависимости от сроков посева (средние значения)

Table 1 – Quality of green material of oats depending on crops periods (mean values)

Показатели (в переводе на абсолютно сухое вещество)	Весенний посев, 20 апреля	Летний посев, 1-20 июля
Протеин сухой, г/кг	109,7	138,1
Протеин переваримый, г/кг	61,5	96,8
Каротин, мг/кг	44,7	65,2
Кальций, г/кг	11,6	14,0
Фосфор, мг/кг	0,91	1,3
Сырая клетчатка, %	40,2	25,8

Непрерывное определение химического состава зелёной массы весеннего и летнего сроков посева показала, что в ней повышается содержание каротина, жира, минеральных веществ и снижается количество труднорастворимой клетчатки и безазотистых экстрактивных веществ. С наступлением осенью пониженных среднесуточных температур, в зелёной массе закономерно возрастает количество сахаров, что способствует приближению сахарно-протеинового отношения к оптимальному уровню. В весеннем посеве овса этот показатель составлял 0,49...0,58 : 1, в летнем – 0,56...0,97 : 1, в позднелетнем – 0,58...0,59 : 1.

Расчёты экономической эффективности однолетних кормовых культур проводились с учётом белковой полноценности кормов. Урожайность выражалась в условных кормопротеиновых единицах (у.к.е.) и рассчитывалась по формуле $K_n = U \cdot K_a \cdot B$, где K_n – количество у.к.е., т/га; U – урожай абсолютно сухого вещества, т/га; K_a – кормовое достоинство, к.е. в 1 кг

корма; Б – показатель обеспеченности корма белком – отношение фактического содержания на 1 к.е. к нормативному по зоотехническим требованиям (105 г на 1 к.е.). Расчёты показывают, что особенно высокая обеспеченность белком наблюдается у сурепицы при позднелетнем сроке посева, когда количество протеина в ней достигает 341,9 г на 1 к.е. (табл. 2).

Таблица 2 – Сбор условных протеиновых единиц с урожаем зелёной массы однолетних кормовых культур

Table 2 - Collection of the conventional protein units with a crop of green material of one-year forage crops

Срок посева	Урожай сухого вещества, т/га	Содержание сырого протеина, г в 1 к.е. корма	Обеспеченность белком	Сбор условных КПЕ, т/га
Овёс скороспелый				
Весенний	3,96	217,9	2,07	6,31
Летний	4,00	218,7	2,08	6,40
Позднелетний	4,70	260,1	2,47	8,93
Сурепица				
Весенний	3,72	332,4	3,16	9,05
Летний	5,92	327,5	3,11	14,18
Позднелетний	5,00	341,9	3,25	12,51
Редька масличная				
Весенний	6,00	239,5	2,28	10,53
Летний	7,20	244,5	2,33	12,91

Увеличение нормы высева семян кормовых культур в летних посевах не отражалось на темпах развития растений, но сопровождалось снижением интенсивности побегообразования, площади листьев на одном растении и чистой продуктивности фотосинтеза.

Предпосевное внесение различных доз азотных удобрений под весенний посев овса и летний для масличной редьки оказывало положительное влияние на кущение и ветвление растений, продуктивность культур, содержание и сбор белка с урожаем зелёной массы. Дополнительная прибавка сбора протеина на 1 кг внесённых удобрений составляла 2,22...7,92 кг/га.

Проведение внекорневой подкормки посевов кормовых культур мочевиной повышает уровень прибавки урожая и сбора протеина от удобрений, внесённых перед посевом.

Учёт затрат на проведение весенних и летних посевов однолетних кормовых культур на зелёный корм показал, что существенных различий по статьям расходов (зарплата, семена, топливо и смазочные материалы, амортизация, текущий ремонт, техническое обслуживание) в зависимости от сроков посева не наблюдается (от весенних посевов, принятых за 100%, летние посевы составляют 111,1...116%). Незначительное увеличение затрат в летних посевах связано с ростом расходов на уборку и транспортировку более высокого урожая зелёной массы. Однако за счёт большего сбора с урожаем кормопротеиновых единиц их себестоимость снижается, а уровень чистого дохода и рентабельности существенно повышается.

Технология получения зеленого корма в летний и позднелетний период одновременно используется как очень эффективный способ сохранения плодородия почвы в Калининградской области. Данная технология предусматривает широкое внедрение летних посевов, насыщенных бобовыми культурами, которые благодаря хорошо развитой, глубоко проникающей корневой системе, поднимают доступные питательные вещества в пахотный горизонт, структурируют почву и оставляют после заделки биологический азот, усвоенный с помощью нитрифицирующих бактерий.

В летний и позднелетний период в Калининградской области в ряде лет, по среднестатистическим данным, имеет место переувлажнение почвы. Летние смешанные посевы из определенного набора культур и сортов могут способствовать регулированию влаги в почве из-за огромного поглощения влаги ассимилирующей поверхностью растений.

Летние посевы однолетних культур рекомендуется включать в каждый полевой севооборот в Калининградской области как эффективный агроприем в борьбе с деградацией почв и повышением её плодородия. При этом способ поступления органики в почву будет достигаться за счет осенней сидерации как более эффективной. Высеянный для этих целей летом однолетний люпин, без применения удобрений в условиях благоприятных по увлажнению Калининградской области позволяет получать осенью зеленую массу в размере от 50 до 70 т/га, а вместе с корневыми остатками – до 60-80 т/га.

Многие сидеральные сорта обладают высоким содержанием алкалоидов (до 12%). Это свойство также использовано в разработанной технологии. После запахивания сидеральных сортов люпина узколистного в почву поступает большое количество очень горьких биологически активных веществ – алкалоидов. Алкалоиды способствуют снижению активности патогенных организмов и даже такой вредитель как жук-проволочник предпочитает избегать откладку яиц на полях с корневыми остатками сидерального люпина. Поэтому позднеосенняя сидерация летних посевов в предлагаемой нами технологии рекомендована как оптимальный предшественник для таких культур как картофель, зерновые, кукуруза, капустовые (в том числе рапс).

Запаханная сидеральная зеленая масса будет способствовать увеличению мобильной части свежего органического вещества в почве. Ведь основная опасность снижения плодородия почвы в Калининградской области кроется не в масштабах снижения общего гумуса в почве (за исключением потерь от эрозии), а в том, что при недостаточном поступлении в почву источников гумуса (послеуборочных остатков, сидератов, органических удобрений) снижается содержание в ней наиболее мобильной части органического вещества, которая определяет жизнь почвы, её важнейшие агрономические свойства и эффективное плодородие. Почву надо «как корову кормить». Кстати давая корове корм, мы кормим не корову, а тех, кто поселился у неё в рубце, а продукты их жизнедеятельности использует организм коровы. Так и с почвой – растение использует продукты жизнедеятельности организмов, населяющих почву, которые перерабатывают растительные остатки, поступающие в почву после окончания вегетации растений. Поэтому организмам, населяющим почву ежегодно необходимо новое поступление органического вещества. Увеличение органического вещества в почве носит стратегический характер, так как в этом случае достигается долгосрочное захоронение углерода, которого в настоящее время в атмосфере находится в избыточном количестве.

Таким образом, технология производства повышенного количества зеленого корма в позднеосенний период богатым белком и углеводами, часть которого с определенным видовым составом может быть запахана как сидерат и использована для сохранения плодородия почвы Калининградской области. На данную технологию получен патент на изобретение «Способ сохранения плодородия почвы путем выращивания зеленых кормов (№227301, зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 10.04.2013, Бюлл. №10, МПК А23К1/00).

RECEIVING THE GREEN FORAGE WITH HIGH PROTEIN CONTENT DURING THE LATE AUTUMN PERIOD AND SAVING FERTILITY OF THE SOIL OF THE KALININGRAD REGION

Buyankin N.I., Krasnoperov A.G.

summer crops, fertility of the soil, a green forage, a soil sideration

The offered method allows to use effectively one-year cultures in case of summer crops as a green forage, high which fodder advantages are acquired after influence of autumn night frosts with simultaneous saving fertility of soils of the Kaliningrad region. For this purpose daily from a field daily need for a green forage is removed and is delivered from a field to a farm in feeding troughs of animals, thereby, adapting agricultural animals during the critical period – transition from summer pasturable type of feeding to winter – stall.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ РЕГЕНЕРАЦИИ И ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ ПЕРСИКА ПОДВОЯ «BAILEY»

Вагапова Т.И.^{1,2}, Сидорова Т.Н.², Долгов С.В.^{1,2}

¹ФГБОУ ВПО «Пушкинский государственный естественнонаучный институт»; пр. Науки, 3,
г. Пущино Московской области, 142290, Россия, E-mail: tatyaz38@yandex.ru

²ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, пр. Науки, 6, г. Пущино Московской области, 142290, Россия

*агробактериальная трансформация, биобаллистическая трансформация, регенерация ад-
вентивных побегов*

Введение

Разработка надежной системы регенерации является важным и неотъемлемым этапом при создании трансгенных сортов экономически ценных сельскохозяйственных культур. Отсутствие эффективных методик, способных обеспечить высокую частоту регенерации побегов из соматических тканей, оказывается главным препятствием при создании трансгенных растений персика. Наиболее важными факторами, влияющими на регенерацию растений, являются минеральный состав среды, вид и концентрация углевода, гормональный состав среды, тип и возраст эксплантов. В различных исследованиях для регенерации персика были использованы питательные среды такие, как Murashige-Skoog medium (MS) [4, 9, 10], Quoirin-Lepoivre medium (QL) [3].

Целью настоящего исследования являлась разработка эффективного метода регенерации из соматических тканей подвоя персика «Bailey», а также получение трансгенных растений персика с экономически ценными сельскохозяйственными признаками.

Материалы и методы

В наших исследованиях подвой персика «Bailey» выращивали на среде MS [7] с добавлением 6-БАП (1-1,5 мг/л) и ИМК (0,1 мг/л) с целью получения морфогенного каллуса, образующегося на базальной части побега [9]. По истечении двух месяцев каллус срезали и помещали на среду регенерации с добавлением 6-БАП (2 мг/л) и НУК (1 мг/л), pH-5,7. Эффективность регенерации побегов из морфогенного каллуса подвоя «Bailey» оценивалась на 5 средах: Driver-Kuniyuki walnut medium (DKW) [2], MS, Nitsch and Nitsch medium (N&N) [8], QL [11], Woody Plant Medium (WPM) [5]. Образовавшийся каллус был разделен на сегменты толщиной 2 – 3 мм, которые затем помещали на агаризованную среду регенерации при 24 – 25° С и 16-часовом световом дне. Регенерацию наблюдали два месяца.

В опытах по изучению влияния вида и концентрации углевода на частоту регенерации из морфогенного каллуса использовали сахарозу, глюкозу, мальтозу в концентрациях 10, 20, 30, 40, 50, 60 г/л.

Трансформацию персика осуществляли двумя способами: агробактериальным и биобаллистическим. При агробактериальной трансформации был использован штамм *Agrobacterium tumefaciens* AGL 0, несущий бинарный вектор pCamPPVRNAi, который содержал фрагменты гена белка оболочки вируса оспы сливы в обратной и прямой ориентациях, разделенных rdk-интроном, репортерный *gus* ген, кодирующий β-глюкуронидазу, селективный ген *hpt*, кодирующий фермент гигромицинфосфотрансферазу и придающий устойчивость к антибиотику гигромицину [6]. Кокультивирование проводили в течение 2 дней, затем сегменты переносили на среду с антибиотиком (цефотаксим – 500 мг/л) с целью подавления роста *A. tumefaciens*. Через 3 недели выкладывали на среду с селективным антибиотиком (гигромицином – 3 мг/л).

Для биобаллистической трансформации использовали вектор pCamGFP, содержащий маркерный кодон-оптимизированный ген зеленого флуоресцентного белка (*gfp*), селективный ген *hpt*, кодон-оптимизированный ген *bar*, придающий устойчивость к биалофосу. Вектор был создан на станции искусственного климата «Биотрон», ФИБХ РАН. Перед бомбардировкой сегменты каллус выкладывали на среду, содержащую дополнительно 0,4 М маннита и культивировали для повышения

эффективности проникновения частиц в ткани [1]. Обстрел каллуса производили вольфрамовыми частицами M10 (BioRad, США) с нанесенной на них плазмидной ДНК.

Результаты и обсуждение

Максимальную частоту регенерации побегов подвоя «Bailey» из морфогенного каллуса наблюдалась на среде MS и составила 31,6 % (рис. 1). Напротив, на среде QL эффективность регенерации оказалась минимальной – 11,1%.

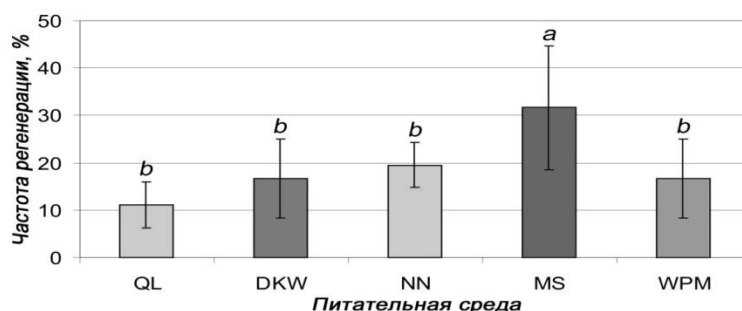


Рисунок 1 - Влияние минерального состава питательных сред QL, MS, DKW, N&N и WPM на адвентивную регенерацию побегов персика. Различия между a и b достоверны при $p < 0,05$

Figure 1 - The influence of mineral composition of culture media on shoot adventitious regeneration of peach

На питательной среде с добавлением мальтозы частота регенерации была минимальной 2,8 – 7,9%. Глюкоза и сахароза стимулировали образование и рост каллуса. Увеличение концентрации в питательной среде как сахарозы, так и глюкозы повышало частоту регенерации. Наиболее интенсивно закладка меристематических очагов происходила на среде с сахарозой (30 г/л), где эффективность регенерации составила 30,0% (рис. 2). Последующее увеличение сахарозы (больше 40 мг/л) привело к сокращению образования побегов и увеличению массы каллусных клеток.

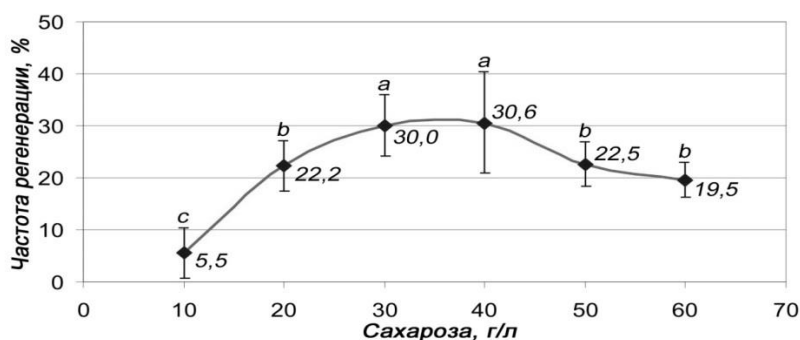


Рисунок 2 - Влияние концентрации сахарозы на адвентивную регенерацию побегов персика. Различия между a, b и c достоверны при $p < 0,05$

Figure 2 - The influence of sucrose concentration on shoot adventitious regeneration of peach

В экспериментах по трансформации наблюдали транзientную экспрессию. В результате агробактериальной трансформации были получены предположительно трансгенные сегменты каллуса, растущие на селективной среде. Транзientную экспрессию наблюдали на 3 день после трансформации, которая составила 17,2%. Метод гистохимического определения GUS-активности использовался как способ визуальной идентификации трансформированных клеток. После биобаллистической трансформации наблюдали транзientную экспрессию гена *gfp* с помощью микроскопа Discovery. V12 Carl Zeiss (Германия) через 24 ч – эффективность трансформации составила 27,8%.

Заключение

В результате проведенных опытов выявлено существенное преимущество среды MS при адвентивном органогенезе из морфогенного каллуса, частота регенерации составила 31,6%. Самая низкая частота регенерации наблюдалась на среде QL – 11,1%. При сравнении трех источников углерода показано, что мальтоза не подходит для культивирования каллуса. На среде с мальтозой

наблюдали низкое каллусообразование, индукция морфогенетических процессов была очень слабой. Глюкоза и сахароза стимулировали образование и рост каллуса, а также дифференциацию адвентивных побегов. Поэтому использование сахарозы в концентрации 30 мг/л является эффективным.

Использование супервирулентного штамма *A. tumefaciens* с бинарным вектором pCamPPVRNAi позволяет получать потенциально трансгенные каллусы персика при использовании описанной в данной работе методики регенерации. При использовании биобаллистической трансформации вектором pCamGFP также получены трансгенные каллусы. В настоящее время продолжаются эксперименты по оптимизации гормонального состава питательной среды и опыты по агробактериальной и биобаллистической трансформации подвоя «Bailey» с применением выше описанной методики регенерации.

Литература

1. Мирошниченко Д.Н., Порошин Г.Н., Долгов С.В. Генетическая трансформация пшеницы с использованием тканей зрелых семян// Биотехнология. – 2010. №6.-С. 34-41.
2. Driver J., Kuniyuki A. *In vitro* propagation of *Paradox* walnut rootstock//HortScience.–1984.V.19.-P.507-509.
3. Gentile A., Monticelli S., Damiano C. Adventitious shoot regeneration in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] // Plant Cell Rep. – 2002. V.20.-P. 1011-1016.
4. Hammerschlag F.A., Bauchan G., Scorza R. Regeneration of peach plants from callus derived from immature embryos// Theor. Appl. Genet. – 1985. V 70.-P. 248-251.
5. Lloyd G., McCown L. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture// Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. – 1980.V.30.-P. 421-427.
6. Mikhailov R.V., Dolgov S.V. *Agrobacterium*-mediated transformation of plum cultivar ‘Star-tovaya’ by self-complementary hairpin RNA of PPV-CP gene// Acta Hort. – 2011. V.941.-P. 85-89.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures// Physiol. Plant. – 1962. V.15, №95.-P. 473-497.
8. Nitsch J.P., Nitsch C. Haploid plants from pollen grains// Science. – 1969. V.163.-P. 85-87.
9. Perez-Jimenez M., Carrillo-Navarro A., Cos-Terrer J. Regeneration of peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivars and *Prunus persica* x *Prunus dulcis* rootstocks via organogenesis// Plant Cell Tiss Org Cult – 2012.-V.108.-P.55-62.
10. Pooler M.R., Scorza R. Regeneration of Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] rootstock cultivars from cotyledons of mature stored seed// HortScience. – 1995.-V. 30, №2.-P. 355-356.
11. Quoirin M., Lepoivre P. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp.// Acta Hortic. – 1977. V.78.-P.437-442.

THE DEVELOPMENT OF REGENERATION AND TRANSFORMATION METHODS OF PEACH ROOTSTOCK ‘BAILEY’

Vagapova T.I., Sidorova T.N., Dolgov S.V.

Agrobacterium-mediated transformation, biobalistic transformation, adventitious shoot regeneration

The influence of various culture media on callus formation and adventitious shoot regeneration of peach rootstock ‘Bailey’ from callus slices has been investigated. It was shown that MS medium was preferred for organogenic plant regeneration. Also the influence of various carbon sources has been researched. The presence of sucrose (30 g/l) provided high rate of shoot regeneration. *Agrobacterium*-mediated transformation and biobalistic transformation of callus slices were performed. Transient expression of *gfp* and *gus* genes was observed.

**СЕЛЕНИТ НАТРИЯ РЕГУЛИРУЕТ РОСТ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ
*SAUSSUREA ORGAADAYI***

Володина Н.А., Головацкая И.Ф.

ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»,
пр. Ленина, 36, г. Томск, 634050, Россия, E-mail: golovatskaya.irina@mail.ru*Saussurea orgaadayi*, селенит натрия, клеточная культура, малоновый диальдегид, рост

Все более широкое распространение получают биотехнологические приемы культивирования лекарственных растений, поскольку естественные ресурсы многих видов ограничены, а их метаболиты экономически невыгодно получать синтетическим путем. Кроме этого, культивирование *in vitro* позволяет получать экологически чистый растительный материал с заданными свойствами, контролируя скорость ростовых и метаболических процессов клеток в течение круглого года.

В последнее время много внимания уделяется проблеме обогащения селеном различных продуктов фармацевтической и пищевой промышленности [1], поскольку стало известно об антиоксидантных функциях селен-содержащих соединений [2]. Селен входит в состав важных селенопротеинов человека (глутатион-пероксидаз, тиоредоксинредуктаз и других), предупреждая развитие более четырех десятков заболеваний у человека и животных. Имеются все основания для изучения роли селена в регуляции жизнедеятельности растений, поскольку известны органоспецифическая динамика уровня этого соединения и его антиоксидантные свойства. Не достаточно изучено влияние селена на рост клеточных культур [3, 4]. Решение вопросов оптимизации условий культивирования клеточных культур и повышения их терапевтического значения для человека требуют дополнительных исследований роста клеточных культур. В связи с этим целью наших исследований было изучение ростовых и окислительных процессов клеточной культуры растений в зависимости от уровня селенита натрия в питательной среде.

Объектом исследования служила каллусная культура клеток *Saussurea orgaadayi* (V. Khan. et Krasnob.) (Горькуша оргаадай) – редкого лекарственного вида, обитающего в субальпийском поясе высокогорий. Клеточная культура получена из изолированных клеток и тканей растения *S. orgaadayi* на питательной среде Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением гормонов 2,4-Д и 6-БАП в условиях *in vitro* на кафедре физиологии растений и биотехнологии [5]. Культивирование клеток проводили на среде MS без (контроль) или с добавлением различных концентраций селенита натрия («Sigma» США) в диапазоне от 10 пМ до 10 мкМ (опыт) в течение 20-ти сут. в полной темноте. По истечении 20 сут. культивирования оценивали ростовой индекс культуры по сырой и сухой биомассе. Микроскопирование каллуса, визуализация и определение размеров клеток проведены с помощью видеокамеры и компьютерной программы Moticam 2300 (Испания). Для оценки активности перекисного окисления липидов спектрофотометрически определяли содержание малонового диальдегида (МДА) в клеточной культуре.

В результате цитологических исследований было показано, что в каллусе встречаются 3 класса клеток, отличающихся по форме: округлые, эллипсоидные и вытянутые клетки. Кроме этого в каждом классе существуют подклассы мелких меристематических клеток, крупных паренхимных клеток и промежуточный класс средних по размерам клеток. Присутствие мелких клеток может свидетельствовать об ускорении клеточного деления в культуре, а крупных клеток – активации растяжения каллуса. В средний класс попадали клетки, растущие как перед митотическим делением, так и при формировании паренхимных клеток, что затрудняло интерпретацию событий клеточного роста.

Дополнительно введенный в питательную среду микроэлемент селен изменял форму и размеры клеток каллусной культуры *S. orgaadayi*, оцененной по доли встречаемости каждого класса клеток в каллусе. Селенит натрия всех концентраций способствовал образованию эллипсоидных клеток в каллусной культуре, уменьшая формирование вытянутых клеток. Действие микроэлемента более

высоких концентраций увеличивало образование округлых клеток. Селенит натрия средних концентраций увеличивал количество округлых клеток малого и среднего размера. Все концентрации селена более чем в два–три раза увеличивали встречаемость средних эллипсоидных клеток, а низкие концентрации – долю крупных эллипсоидных клеток.

Анализ ростового индекса клеточной культуры показал, что накопление сухой и сырой биомассы культуры клеток *S. orgaadayi* происходило активно в контрольном варианте до 20-ти сут. культивирования. Добавление в питательную среду ионов SeO_3^- низких концентраций увеличивало сырую массу культуры, не меняя скорость накопления ее сухой биомассы. Этими данными констатировали увеличение обводненности клеток селенитом натрия, сопровождающей их рост. С увеличением концентрации ионов SeO_3^- сырая биомасса культуры сохранялась на уровне контроля, тогда как ее сухая биомасса уменьшалась. При введении SeO_3^- более высоких концентраций в питательную среду и культивирование на ней каллуса происходило снижение параметров, отражающих интенсивность свободнорадикальных процессов, прежде всего снижение содержания МДА.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что селенит ион участвует в регуляции ростовых процессов (размеры и форма клеток, сухая и сырая масса), изменяя окислительный статус клетки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (Госконтракт № П283).

Литература

1. Головацкая И.Ф., Карначук Р.А., Кулагина Ю.М., Павлова Д.Г., Лаптев Н.И. Способ обогащения селеном овощей и злаков // Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам, Москва. 2012. Бюл. №15. Патент на изобретение №2451442 от 27.05.2012. Заявка №2010149934 от 07.12.2010 г.

2. Селен в биосфере / А.Ф. Блинохватов, Г.В. Денисова, Д.Ю. Ильин и др. – Пенза: РИО ПГСХА, 2001. 324 с.

3. Головацкая И.Ф., Кулагина Ю.М., Крахалева А.В., Карначук Р.А. Влияние селена на морфогенез и биохимические параметры растений *Triticum aestivum* L. в зависимости от селективного света // Агрехимия. 2013. № 5. С. 558-565.

4. Головацкая И.Ф., Володина Н.А. Регуляция роста и вторичного метаболизма клеточной культуры *Saussurea orgaadayi* 28-гомобрассинолидом и селеном // Известия Самарского НЦ РАН. 2013. Т 15, № 3 (5). С. 1591-1596

5. Карначук Р.А., Лихачева А.В. Питательная среда для культивирования клеточной культуры *Saussurea orgaadayi* V.Khan. and Krasnob // Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам, Москва. 2012. Патент на изобретение №2428472. Заявка №2010149934 от 11 мая 2010 г.

SODIUM SELENITE REGULATES GROWTH OF SAUSSUREA ORGAADAYI CELL CULTURE

Volodina N.A., Golovatskaya I.F.

Saussurea orgaadayi, sodium selenite, cell culture, malondialdehyde, growth

The degree of variability of the cytomorphological characteristics and malondialdehyde contents of *Saussurea orgaadayi* callus culture is determined. It is shown, that sodium selenite regulates the growth processes (the sizes and the form of cells, dry and fresh weight) with the help of change of the oxidative status of cells.

ПРОДУКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС У СОРТОВ РИСА

Воробьев Н.В., Скаженник М.А., Ковалев В.С., Пшеницына Т.С.

Всероссийский научно-исследовательский институт риса, п. Белозерный, 3,
г. Краснодар, 350921, Россия, E-mail: sma_49@mail.ru*рис, интенсивные и экстенсивные сорта, кущение, редукция побегов, густота стояния, продуктивность метелок, устойчивость к полеганию, урожайность***Введение**

Особенности продукционного процесса у сортов зерновых, в том числе и у риса, лежат в основе формирования у них разной урожайности и устойчивости к неблагоприятным факторам среды [1-3]. Среди этапов этого сложного процесса основные различия сортов наблюдаются по характеру распределения ассимилятов по побегам растения и по органам отдельного побега и в зависимости от этого они разделяются на интенсивные и экстенсивные. Изучение у них продукционного процесса представляет большой научный и практический интерес. Этому посвящена настоящая статья.

Материалы и методы

Опыты проводили в 2008-2011 гг. в специальных железобетонных микрочеках, заполненных лугово-черноземной почвой и позволяющих поддерживать нужный режим орошения риса, характерный для производственных посевов. В качестве объектов исследования использовали разные по урожайности и устойчивости к полеганию сорта риса – Рапан, Гамма (интенсивные) и Соната (экстенсивный). Фон минерального питания – $N_{24}P_{12}K_{12}$ г д.в. на 1 м^2 , близкий к оптимальному. Густота всходов – 300 штук на 1 м^2 . На закрепленных площадках фиксировали уровни кущения растений и отмирания части боковых побегов. В фазу цветения отбирали пробы побегов для определения их сухой массы и отдельных органов: листьев, стеблей и метелок. В фазе полной спелости фиксировали уровень полегания посевов, отбирали пробы стеблей и определяли их устойчивость на изгиб и содержание в их тканях целлюлозы, а также урожай и элементы его структуры. Статистическая обработка полученных результатов выполнялась по принятому во ВНИИ риса способу [4].

Результаты и обсуждение

Ранее проведенные исследования [3] показали, что более высокая урожайность посевов интенсивных сортов риса Рапан и Гамма, по сравнению с экстенсивным сортом Соната, не связана с соответствующей фотосинтетической деятельностью их агрофитоценозов, а определяется более эффективным характером распределения ассимилятов по побегам растения и по органам отдельного побега в период их роста и развития. Однако механизм такого распределения метаболитов у сортов изучен недостаточно. Нами установлено, что у генотипов риса формирование основных элементов урожайности – густоты стояния и зерновой продуктивности побега в значительной степени зависит от уровня общего кущения растений и степени редукции образовавшихся боковых побегов. Эти процессы связаны с особенностями донорно-акцепторных отношений в системе целого растения. Начальное развитие боковых побегов в пазухах листьев материнского побега происходит за счет использования его ассимилятов и фитогормонов и при сильном кущении, что наблюдается у экстенсивного сорта Соната, ослабляется их поток к конусу нарастания и развивающейся метелке главного побега, что приводит к формированию у него менее продуктивного плодоноса (табл. 1). Однако в фазе трубкавания у этого сорта из-за усиленного доминирования главных побегов основная доля образовавшихся боковых побегов (82 %) отмирает, при этом значительная часть продуктов их деструкции оттекает в продуктивные побеги, увеличивая их массу за счет её роста у формирующихся стеблей. На развитие метелок эти соединения уже не оказывают влияния, так как их потенциальная продуктивность к наступлению периода редукции побегов уже сформировалась, на что указывает пониженная их масса у сорта Соната в фазе цветения (табл. 2).

У интенсивных сортов риса – Рапан и Гамма общее кушение растений значительно ниже, чем у Сонаты, что уменьшало долю расхода ассимилятов главных побегов на развитие боковых и увеличивало уровень их использования на формирование собственных высокопродуктивных метелок.

Таблица 1 - Общее кушение растений и редукция боковых побегов и их влияние на густоту продуктивного стеблестоя

Table 1 - Total tillering of plants, reduction of lateral tillers, and their impact on density of productive plant stand

Сорт	Кушение, ед.		Число боковых побегов, 1/м ²		Редукция боковых побегов, %	Число продуктивных побегов, шт./м ²
	общее	продуктивное	общих	продуктивных		
Рапан	2,3	1,7	392	210	46,1	510
Гамма	2,2	1,6	361	180	50,0	480
Соната	3,2	1,4	660	120	81,8	420
НСР ₀₅	0,13	0,10	13,5	6,6	-	13,2

Таблица 2 - Масса побега и его органов в фазе цветения

Table 2 - Mass of stem and its organs in flowering stage

Сорт	Масса побега, г	Масса органов побега				число колосков на метелке, шт.
		стебля, г	листьев, г	метелки		
				г	её доля в массе побега, %	
Рапан	2,21	1,28	0,55	0,38	17,2	94,7
Гамма	2,39	1,40	0,60	0,39	16,4	97,0
Соната	2,85	1,89	0,68	0,28	9,9	74,0
НСР ₀₅	0,13	0,06	0,07	0,10	-	2,7

В фазу трубкования у этих сортов уровень редукции образовавшихся боковых побегов значительно ниже, чем у экстенсивного сорта, более половины из них развиваются в продуктивные, которые вместе с главными побегами образуют оптимальный по густоте высокопродуктивный агрофитоценоз (табл. 1). Однако из-за недостатка высвобожденных метаболитов в процессе редукции меньшего числа боковых побегов и повышенного расхода ассимилятов на формирование метелок у этих сортов уменьшилась доля пластических веществ, идущих на образование стебля и его анатомических структур, что привело к снижению его массы, содержания в ней целлюлозы, его сопротивляемости на изгиб и как следствие к заметному уровню полегания посевов (табл. 3).

Таблица 3 - Масса стебля и его сопротивляемость на изгиб и содержание в нем целлюлозы в фазе цветения

Table 3 - Mass of stem and its resistance to bending and its cellulose content in flowering stage

Сорт	Масса стебля, г	Содержание целлюлозы в 1 см длины стебля, мг	Устойчивость стебля на изгиб, г	Полегаемость, %
Рапан	1,28	4,20	53,4	40,0
Гамма	1,40	4,28	56,1	31,5
Соната	1,89	5,77	71,5	0,0
НСР ₀₅	0,03	0,27	2,7	-

У сорта Соната масса стебля, содержание клетчатки и его устойчивость на изгиб были существенно выше, чем у интенсивных сортов, а полегание его посевов не наблюдалось.

Биологическая урожайность у исследуемых сортов риса различалась незначительно, а хозяйственная у экстенсивного сорта была на 22 % ниже, чем у интенсивных генотипов (табл. 4). Главной причиной этого явилось снижение озерненности метелок, которая у сорта Соната уменьшилась на 19 %, что связано с повышенным уровнем общего кушения растений у этого генотипа. Другой причиной стала повышенная доля редукции образовавшихся боковых побегов, в результате которой

число продуктивных стеблей на 1 м² у Сонаты была на 12-18 % меньше, чем у интенсивных сортов Рапан и Гамма. Уменьшение количественных величин этих элементов урожайности привело к снижению числа зерен на единице площади и уборочного индекса (K_{хоз.}).

Таблица 4 - Биологическая и хозяйственная урожайность и элементы её структуры
Table 4 - Biological and economic productivity and elements of its structure

Сорт	Урожайность, кг/м ²		Число зерен на метелке, шт.	Число зерен на 1 м ² , тыс. шт.	Масса 1000 зерен, г	Пусто-зерность, %	K _{хоз.} %
	биологическая	хозяйственная					
Рапан	2,023	1,040	82,0	41,8	22,24	13,2	44,2
Гамма	1,980	1,001	83,8	39,4	22,29	13,6	43,5
Соната	1,978	0,809	67,8	28,5	24,91	9,1	35,2
НСР ₀₅	0,04	0,03	2,7	1,33	0,10	-	-

Таким образом, интенсивные и экстенсивные сорта риса мало различаются по параметрам фотосинтетической деятельности посевов. Основные их различия определяются уровнями общего кушения растений, степенью редукции боковых побегов, характером распределения ассимилятов по органам продуктивного побега. Особенности этих процессов у данных генотипов определяют густоту стеблестоя, его устойчивость к полеганию, озерненность метелки и урожайность сортов. Количественные параметры этих признаков важны при создании моделей сортов и при оценке селекционных образцов на продуктивность и устойчивость к полеганию.

Литература

1. Ковалев В.С. Селекция сортов риса интенсивного типа в связи с повышенным уровнем азотного питания / Автореф. дис. ... канд.с.-х. наук. Л., 1985. 21 с.
2. Воробьев Н.В., Скаженник М.А., Ковалев В.С. и др. Особенности продукционного процесса у сортов риса, влияющие на формирование у них разной урожайности // Рисоводство. 2010. № 16. С. 30-35.
3. Воробьев Н.В., Скаженник М.А., Ковалев В.С. Продукционный процесс у сортов риса. Краснодар: Просвещение-Юг, 2011. 199 с.
4. Дзюба В.А. Многофакторные опыты и методы биометрического анализа экспериментальных данных. Краснодар, 2007. 76 с.

PRODUCTION PROCESSES OF RICE VARIETIES

Vorobyov N.V., Skazhennik M.A., Kovalyov V.C., Pshenitsyna T.S.

rice, extensive and intensive varieties, tillering, reduction of tillers, panicles production, plant stand, lodging resistance, yield

Different levels of the plant tillering and reduction of lateral tillers of extensive and intensive rice varieties, determining panicle productivity, plant, lodging resistance and yield of these genotypes were determined. The obtained quantitative traits can be used in breeding during new intensive rice varieties.

ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет»,
Советский пр., 1, г. Калининград, 236022, Россия

синергетика, информация, природные смолы, янтарь

Сложные системы встречаются повсеместно на всех уровнях организации материи – физическом, химическом, биологическом, а также в психическом и социальном поведении объектов. Почему же окружающий мир устроен сложно? Сложные системы предназначены для выполнения определенных функций, и их реализация связана с согласованным действием множества частей. В первую очередь это характерно для биологических объектов созданных природой в тесном взаимодействии с окружающей средой, таковым является янтарь. Междисциплинарное направление, изучающее роль кооперативных процессов в самоорганизации сложных систем называют синергетикой – в узком понимании нашего подхода – синергетикой янтаря.

Растительный организм (продуцент янтарной смолы) характеризовался определенным адаптационным комплексом к условиям окружающей среды. Он обеспечивал относительную гомеостатичность самих организмов и видоспецифическую трансформацию веществ образующихся в процессе их взаимодействия со средой.

В многофакторной среде обычно переплетаются разнообразные стрессовые ситуации являющиеся разновидностью динамического хаоса формирующегося, в случае если к системе подводятся вещества, энергия, информация в количествах которые она может ассимилировать. Критической формой таких динамических процессов является хаос катастрофический, когда кратковременное поступление указанных выше факторов из окружающей среды достаточно для полного уничтожения существующего объекта. Процессы, в которых как мы видим, одной из ключевых функций является время, приводили к «включению» в растительном объекте механизма образования защитных терпеноидных веществ (1,2) – первичных молекул составляющих структуру янтаря. Одним из таких примеров могли быть паразитарные инфекции, приводившие к биоповреждениям растительных тканей которые вызывали выделение физиологически активных веществ по отношению к микроорганизмам, называемых фитонцидами. При этом роль сигнала (информатора) играли продукты метаболизма микроорганизмов изменявших мембранный потенциал клеток растения-хозяина (3). Другой пример – механические повреждения, вызывавшие появление раневых гормонов, которые в свою очередь активировали метаболизм хвойных образующих травматические смоляные ходы (4).

Приведенные примеры подтверждают функционирование различных по иерархии регуляторных (информационных) систем высших растений, на клеточном уровне и уровне органов и тканей, через градиент мембранных потенциалов (биоэлектрический фактор) и фитогормональных взаимодействий. Сукциноз – первичный этап формирования янтаря представляет собой кооперативный процесс, теснейшим образом связанный с факторами внешней среды, а сам янтарь является продуктом самоорганизации биологического объекта обладающий синергетической информацией. Это явление носит скорее универсальный характер и должно быть прослежено и для других биообъектов.

Важным свойством сукциноза является про-явление информации на макроскопическом уровне и сопровождавшееся эффектом сжатия информации. Процесс физического перехода янтарной смолы из вязкотекучего состояния в твердое янтароподобное является наиболее уникальным процессом, оформившимся по окончании биогенеза и про-явившемся в отвердевании информации о динамическом хаосе и ее сохранение в течение миллионов лет.

Возможность повторения уникального биотехнологического природного эксперимента актуальна и в наши дни.

Литература

- 1.Рощина В.Д., Рощина В.В.//Выделительная функция высших растений.-М.,1989, 214с.
- 2.Рожков А.С.,Массель Г.И.//Смолистые вещества хвойных и насекомые ксилофаги. Новосибирск,1982, 151с.
- 3.ЮсуфовА.Г.//Лекции по эволюционной физиологии растений-М.:Высш.шк.,1996, с.209.
- 4.Саламатова Т.С.,Зауралов О.А. Физиология выделения веществ растениями. изд-во ЛГУ, 1991, с.с. 88,124.

SINERGETICS OF AMBER AS A BASIS FOR PHYTOBIOTECHNOLOGY

Vorotnikov B.Y.

synergetics, information, natural resin, amber

From the standpoint of synergetics and plant physiology deals with the formation of the Baltic amber. Raises the question about the possibility of producing biologically active substances through mechanisms similar to the processes of formation of natural resins of the past nowadays.

СОВМЕСТНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АССОЦИАЦИЙ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ВИНОГРАДНОМ ПИТОМНИКОВОДСТВЕ

Великсар С.Г., Леманова Н.Б., Тудораке Г.Ф.

Институт генетики, физиологии и защиты растений АН РМ, ул. Падурий, 20, г. Кишинэу, МД 2002, Молдова, E-mail: dechevas@rambler.ru

микроорганизмы, микроэлементы, саженцы, рост растений, хлорофилл

Введение

Возделывание многолетних культур сопровождается ухудшением состава микроорганизмов в агроценозе и условий питания растений, снижением устойчивости к неблагоприятным факторам среды [1,6]. Для интродукции в биоценоз полезных микроорганизмов перспективен метод предпосадочной бактеризации посадочного материала - семян, клубней, черенков, саженцев. Действие микроорганизмов оценивается с точки зрения индукции ими почвенной супрессивности, которая может обеспечиваться как непосредственным внесением в почву живых клеток бактерий с обработанным посадочным материалом, так и за счет оптимизации условий развития аборигенной почвенной микрофлоры. Растение получает возможность использовать дополнительные питательные ресурсы, которые могут стать доступны ему благодаря активизации полезной интродуцированной микрофлоры, что позволяет восстановить почвенное плодородие. Создание так называемых микробных биотехнологий является одним из основных направлений современного сельского хозяйства [2, 5, 6]. В настоящее время созданы многие полифункциональные композиции для применения в растениеводстве [1, 3, 4]. В то же время практически отсутствуют данные о применении микроорганизмов в питомниководстве. В статье представлены результаты использования продуктов жизнедеятельности двух штаммов микроорганизмов совместно с комплексом микроэлементов Микроком-В, разработанного специально для применения в виноградарстве, с целью повышения качества и количества посадочного материала винограда и снижения химической нагрузки на окружающую среду.

Материалы и методы

Исследования были проведены в 2010-2012 годах в вегетационном комплексе и в производственном питомнике. Объект исследований - саженцы двух сортов винограда (Кодринский и Презентабельный). Черенки винограда высаживали в пластиковые сосуды объемом 12 кг почвы и выращивали их в вегетационном комплексе или в питомнике. Почва – чернозем карбонатный слабосуглинистый. Двухсуточные суспензии штаммов бактерий *Azotobacter chroococcum* и *Pseudomonas fluorescens*, с титром 10^7 КОЕ/мл вносили в почву при посадке черенков. Для некорневой подкормки растений в процессе вегетации использовали продукты метаболизма микроорганизмов, полученные в результате центрифугирования концентрированных суспензий при 8000 об/мин в течение 20 минут. Растения обрабатывали трехкратно метаболитами микроорганизмов отдельно и совместно с половинной дозой специально разработанного нами для винограда комплекса микроэлементов Микроком-В. Степень развития надземной части и корневой системы саженцев и общее накопление биомассы определяли после вызревании побегов при выкопке саженцев.

Результаты и обсуждение

Основной посадочный материал в виноградарстве – вегетативно размножаемые саженцы. Их качество зависит от условий выращивания, в том числе от минерального статуса почвы и растений. Основные показатели качества саженцев – это развитие корневой системы, рост и вызревание однолетних побегов. Анализ полученных нами данных показывает, что во всех вариантах с применением микроорганизмов и микроэлементов рост побегов и корней саженцев винограда был более интенсивным по сравнению с контрольными растениями

(табл. 1). Более выражен ростостимулирующий эффект суспензии и метаболитов микроорганизмов в развитии корневой системы по сравнению с надземной частью. Совместное использование половинных доз комплекса микроэлементов и метаболитов микроорганизмов в наибольшей степени стимулировано рост и развитие корневой системы (186.26 % по сравнению с контролем). Важно также то, что на этих саженцах более интенсивно развиваются мелкие питающие корни. Надземная часть саженцев во всех вариантах, где были использованы корневые и некорневые подкормки, была развита лучше, чем в контрольном варианте. Наибольший прирост побегов отмечен при некорневой подкормке растений метаболитами микроорганизмов отдельно и совместно с микроэлементами.

Таблица 1 - Влияние суспензии микроорганизмов и комплекса микроэлементов на рост и развитие саженцев винограда, сорт Презентабельный, вегетационный комплекс, 06.08.2012

Table 1 - Influence of microbial suspension and a complex of trace elements on the growth and development of grape seedlings, v. Presentable, green house, 06.08.2012

Вариант	Средняя длина корней, см	Средняя длина побегов, см	% по отношению к контролю	
			корни	побеги
Контроль	246.75±53.87	26.62±2.98	100	100
Суспензия микроорганизмов <i>Pseudomonas fl.</i> + <i>Azotobacter ch.</i> - в почву	448.5±59.43	33.00±4.23	181.94	123.96
Суспензия <i>Pseudomonas fl.</i> + <i>Azotobacter ch.</i> в почву + Микроком В 0,5 дозы, некорневая подкормка	358.12±30.26	34.12±2.67	145.13	128.17
Метаболиты <i>Pseudomonas auref.</i> + <i>Azotobacter ch.</i> , некорневая подкормка	387.5±47.88	41.12±7.39	157.04	154.47
Метаболиты <i>Pseudomonas auref.</i> + <i>Azotobacter ch</i> + Микроком В- ½ дозы, некорневая подкормка	459.62±24.22	35.06±4.17	186.26	131.70

Аналогичные результаты получены при испытании данных комбинаций и на сорте Кодринский. В этих опытах отмечено заметное увеличение общей биомассы растений, массы корней и диаметра основного корня, увеличение степени вызревания побегов саженцев на 12-23 % по сравнению с контрольным вариантом, что свидетельствует о более высокой жизнеспособности полученного посадочного материала.

В течение вегетационного периода было определено в динамике содержание фотосинтетических пигментов в листьях саженцев в вегетационном опыте и в производственном (питомник). Внесение в почву суспензии микроорганизмов и некорневая подкормка растений метаболитами этих штаммов совместно с комплексом микроэлементов заметно повысило суммарное содержание хлорофилла в листьях. Применение метаболитов трех штаммов микроорганизмов *Azotobacter chr.* + *Pseudomonas fl.* + *Bacillus sub* в половинной дозе одновременно с половинной дозой комплекса микроэлементов Микроком-В способствовало повышению суммарного количества хлорофилла (*a* + *b*) в листьях на 118,57 % по сравнению с контрольным вариантом (табл.2).

Сумма хлорофилла увеличивалась главным образом за счет хлорофилла *b*. Соотношение форм *a* и *b* изменялось по вариантам опытов в пределах 2,01-2,09. Количество каротиноидов, как правило, было на уровне контрольного варианта или ниже его.

Анализ приведенных экспериментальных данных, полученных в контролируемых условиях и в открытом грунте, достоверно показали, что использование бактериальных продуктов (суспензии и метаболиты определенных штаммов микроорганизмов) совместно с комплексом микроэлементов Микроком-В заметно улучшает рост и развитие саженцев винограда. Использование микроорганизмов позволяет существенно улучшить питание растений, корнеобразование и, соответственно, качество саженцев.

Таблица 2 - Влияние метаболитов микроорганизмов и комплекса микроэлементов на содержание фотосинтетических пигментов в листьях виноградных саженцев, мг/г. Сорт Кодринский, опыт в питомнике

Table 2 - Influence of microbial metabolites and complex trace elements content of photosynthetic pigments in the grape leaves, mg / g, v. Kodrinsky experience in the nursery

Варианты	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Сумма <i>a+b</i>	Каротиноиды
Контроль	1,02±0,01	0,38±0,01	1,40±0.02	0,20±0.001
Метаболиты <i>Azotobacter chr.</i> + <i>Pseudomonas fl.</i> + <i>Bacillus sub.</i> – по ½ дозы + Микроком-В - ½ дозы	1,12±0,002	0,53±0.002	1,66±0.001	0,15±0.002

Заключение

Установлена возможность совместного применения суспензии или метаболитов сапрофитных микроорганизмов и комплекса микроэлементов для улучшения роста и развития саженцев винограда. Внесение в почву суспензий микроорганизмов и некорневая подкормка саженцев метаболитами микроорганизмов и микроэлементами положительно влияет на рост корней и побегов, что очень ценно для повышения количества и качества посадочного материала. Использование метаболитов микроорганизмов дает возможность в два раза снизить суммарное количество микроэлементов в комплексе Микроком-В при выращивании саженцев, что снижает возможное загрязнение окружающей среды за счет снижения количества применяемых химических удобрений.

Работа проведена при частичной финансовой поддержке гранта STCU (проект 5391).

Литература

1. Анисимова, О.С., Бойкова, И.В. Новые биопрепараты для защиты растений в защищенном грунте //ИБ ВПРС МОББ, №40, 2009; с. 124-125.
2. Кириченко, Е., Титова, Л., Коць, С. Эффективность бактеризации семян пшеницы яровой новым штаммом *Azotobacter chroococcum E79*.//Știința agricolă, nr.1, 2010. ISSN 1857-0003, p. 21-24.
3. Леманова, Н.Б., Великсар, С. Г. Подбор комбинаций штаммов бактерий для создания биопрепаратов. Материалы Международной Научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений». 2013, Минск, с.172.
4. Филипчук, О.Д. Фитосанитарная оптимизация агроценоза. //ИБ ВПРС МОББ, 2009; №39, с.227.
5. Lütfi Pırlak and Murat Köse. Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Yield and Some Fruit Properties of Strawberry // Journal of Plant Nutrition, 2009. Volume 32, Issue 7, p.1173 - 1184.
6. Salantur, A., Ozturk, A., Akten, S. Growth and yield response of spring wheat to inoculation with rhizobacteria.//Plant Soil and Environment, 2006, v. 52,N 3, p.111-118.

JOINT USE OF RHIZOSPHERIC BACTERIA ASSOCIATION AND TRACE ELEMENTS IN GRAPE NURSERY MANAGEMENT

Veliksar S.G., Lemanova N.B., Tudorake G.F.

microorganisms, trace elements, seedlings, plant growth, chlorophyll

Under controlled and field conditions was demonstrate that the use of bacterial products (suspensions and metabolites of certain of microorganisms) together with a set of trace elements Microcom-B significantly improves growth and development of seedlings and saplings of grapes. This is a consequence of improving the nutrition of plants and of metabolic processes. The use of microorganisms with a complex of trace elements - is the ability to reduce the amount of used micronutrients and reduce the chemical impact on the environment.

МЕТОДЫ КРИОСОХРАНЕНИЯ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ И ПОСТКРИОГЕННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ КУЛЬТУРЫ ЗЕМЛЯНИКИ *IN VITRO*

Высоцкая О.Н.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35,
г. Москва, 127276, Россия, E-mail: cryostyle@rambler.ru*Fragaria*, земляника, криосохранение, криобанк**Введение**

В настоящее время сохранение генетического разнообразия дикорастущих и ценных сельскохозяйственных растений является очень важной стратегической задачей, решить которую можно с помощью криогенного хранения коллекций растительного материала. При температуре жидкого азота дегидратированные коллекционные образцы (пыльца, семена, клетки и органы, изолированные из растений) можно сохранять в **жизнеспособном** состоянии десятилетиями без пересадок и пересевов, поскольку в этих условиях обменные процессы в клетках полностью прекращены. Разработка методов криосохранения растительного материала, который плохо переносит дегидратацию (рекальцитрантные семена и большинство культур *in vitro*), как правило, является сложной научно-исследовательской задачей, связанной с изучением физиологических особенностей формирования устойчивости к замораживанию различных растений, их клеток, тканей и органов. Современные протоколы криосохранения, разработанные для разных культур, отличаются друг от друга по количеству этапов, сложности выполнения, способам подготовки образцов к криогенному охлаждению, технологическим особенностям процедуры замораживания клеток, тканей и органов до температуры жидкого азота (-196°C) и методам восстановления растительного материала. Технология культивирования *in vitro* позволяет не только эффективно подготовить разнообразный растительный материал к криогенному замораживанию, но и восстановить его после жидкого азота в асептических условиях. Именно поэтому, любая информация об особенностях культивирования растительного материала, преодолевшего криогенный стресс, может оказаться полезной для обеспечения успеха при восстановлении культур разных видов растений после жидкого азота. В связи с этим были проанализированы результаты нескольких серий экспериментов с целью изучения особенностей посткриогенного восстановления культуры земляники (*Fragaria L.*) из апексов, которые были заморожены в жидком азоте с использованием 6 различных способов.

Материалы и методы

Растения земляники (*Fragaria L.*) 50 различных российских и зарубежных сортов, принадлежащие к коллекции ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ РАН, ранее сохраняемой в режиме культивирования *in vitro*. Апексы, изолированные из растений этой коллекции, были подготовлены к криогенному замораживанию с помощью различных протоколов криосохранения: медленного замораживания с использованием программируемого оборудования ЗРК-1; замораживания в криобане; витрификации; витрификации-инкапсуляции; дегидратации-инкапсуляции и дегидратации. После сохранения в жидком азоте апексы помещали на агаризованную питательную среду для оттаивания, регидратации и освобождения от криопротекторов. Для восстановления роста апексы перемещали на свежую питательную среду, дополненную 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП), и культивировали 30-35 дней при 16 часовом дне, 20±2°C и освещенности 0,5 клк. Учёт количества меристем, восстановивших рост после криосохранения, проводили через 4 недели посткриогенного культивирования. Особенности посткриогенного восстановления культуры земляники изучали с помощью сопоставления качественных и количественных характеристик растений – регенерантов. В некоторых случаях, растения земляники, размноженные после хранения в жидком азоте, выса-

живали в полевые условия, где они цвели, плодоносили.

Результаты и обсуждение

Многолетние эксперименты по криосохранению апикальных меристем земляники с использованием разных методов показали, что наиболее эффективным и экономичным способом можно считать метод замораживания дегидратированных апексов. Этот метод имеет ряд преимуществ над другими пятью протестированными методами. Нет необходимости использовать дорогостоящие программируемые замораживатели. Протокол замораживания допускает изолирование апексов размером в 2-3 мм и их не нужно обрабатывать токсичными криопротекторами. Процесс подсушивания образцов проводят в потоке воздуха, что позволяет контролировать степень их дегидратации взвешиванием и регистрацией времени. Меристемы восстанавливают рост быстро и без каллусообразования (рис.1). Кроме того, уровень посткриогенного восстановления растений в этом методе стабильно высокий (табл.1).



А* Медленное замораживание:
в жидком азоте с **1996** по **2013** г.

A* Slow freezing method:
cryopreservation from 1996 to 2013



Б** Быстрое замораживание:
в жидком азоте с **2006** по **2013** г.

B** Dehydration method:
cryopreservation from 2006 to 2013 г.

Рисунок 1 - Восстановление земляники (св. Алая зорька) после криосохранения методами: дегидратации (пат.РФ №2302107) и медленного замораживания (пат.РФ №2220563)

Figure 1 - Recovery of strawberry plantlets (cv. Alaya zorka) after meristem cryopreservation by: dehydration method (Pat. RF №2302107) and slow freezing method (Pat. RF №2220563)

Таблица 1 - Восстановление роста земляники (св. Алая зорька) после криосохранения апексов методами: дегидратации (пат. РФ №2302107) и медленного замораживания (пат. РФ № 2220563)

Table 1 - Recovery of strawberry plantlets (cv. Alaya zorka) after meristem cryopreservation by: dehydration method (Pat. RF №2302107) and slow freezing method (Pat. RF № 2220563)

Метод криосохранения	Продолжительность хранения апексов в жидком азоте	Доля восстановивших рост меристематических апексов, %
А. <u>Медленное</u> замораживание: патент РФ № 2220563	1 сутки	48
	более 16 лет*	38
Б. <u>Быстрое</u> замораживание: патент РФ № 2302106	1 час	94
	более 7 лет**	100

Успешное применение метода дегидратации для криосохранения меристем различных сортов земляники дополнительно подтверждает его кардинальное превосходство над другими способами криосохранения, испытанными нами.

Метод дегидратации (патент РФ № 2302107) был использован для замораживания ме-

ристематических верхушек земляники при пополнении коллекции криобанка ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ РАН в рутинном режиме. Таким образом, на долговременное сохранение в жидкий азот были помещены апексы, изолированные из растений 49 сортов земляники садовой (*Fragaria x ananassa* Duch.) и одного клона земляники лесной (*Fragaria vesca* L.).

Выводы

Криосохранение меристем методом дегидратации не предусматривает использования дорогостоящего программируемого замораживателя, в отличие от метода медленного замораживания. Кроме того, апексы при подготовке к замораживанию в этом протоколе не обрабатывают токсичными и канцерогенными криопротекторами (диметилсульфоксид и этиленгликоль), которые используют в протоколах медленного замораживания, замораживания в криобане, витрификации и витрификации-инкапсуляции. Также не была использована инкапсуляция апексов в альгинате кальция. Альгинатная оболочка меристем, которая не позволяет проникать к их тканям кислороду воздуха, ингибирует процессы дыхания, тормозит рост и развитие побегов. Особенно остро негативное влияние альгинатной аноксии на меристематические клетки проявляется после криогенного воздействия. Таким образом, экспериментально показано, что из шести разных протоколов криосохранения, испытанных нами, наиболее эффективным и экономичным и простым можно считать метод дегидратации (патент РФ № 2302107) меристем в потоке воздуха.

Литература

1. Высоцкая О.Н., Попов А.С. Способ криосохранения меристем, изолированных из растений земляники садовой (*Fragaria* L.) *in vitro*: Патент № 2220563//Б.И. 2004. №1. Ч.III. С.574.
2. Высоцкая О.Н., Данилова С.А., Попов А.С. Способ криосохранения *in vitro* меристем, изолированных из растений земляники садовой (*Fragaria* L.): Патент № 2302107//Б.И. 2007, № 19, Т.1. С.166.

CRYOPRESERVATION METHODS FOR SOOT TIP MERISTEMS AND POST CRYOGENIC RECOVERY OF STRAWBERRY CULTURE *IN VITRO*

Vysotskaya O.N.

Fragaria, strawberry, cryopreservation, cryobank

Six protocols were used for cryopreservation of strawberry apices isolated from plants propagated *in vitro*. Strawberry cultures were successfully recovered after all these techniques. Some peculiarities of post cryogenic regenerated plantlets were investigated. It was shown, that air dehydration method was most effective for cryopreservation of strawberry meristem. This patented method was used for include specimens of 50 strawberry cultivars in IPP RAS cryobank.

СПОСОБНОСТЬ ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ПРОДУЦИРОВАТЬ ФИТОГОРМОНЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РОСТ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

Высоцкая Л.Б., Кузьмина Л.Ю., Рябова А.С., Габбасова И.М., Мелентьев А.И.

ФГБУН Институт биологии УНЦ РАН, пр. Октября, 69, г. Уфа, 450054, Россия,
E-mail: ljku@anrb.ru*рост стимулирующие бактерии, ауксины, рост***Введение**

Способность стимулировать рост растений обнаружена у ряда почвенных микроорганизмов [1], что послужило предпосылкой для их использования в растениеводстве для повышения урожайности растений [2]. Предложено несколько объяснений этого феномена. Одно из них – это повышение доступности для растений соединений фосфора за счет минерализации его органических форм и солюбилизации фосфатов кислотами, продуцируемыми микроорганизмами [3]. Повышение доступности почвенного фосфора важно для растений, поскольку из-за низкой растворимости фосфатов растения испытывают дефицит этого макроэлемента даже на фоне внесения удобрений. Представляет интерес то, что фосфат-мобилизирующая способность рост-стимулирующих бактерий часто сочеталась с продукцией фитогормона индолилуксусную кислоту (ИУК) [3]. Способностью ИУК активировать рост растений объясняли рост-стимулирующее действие на растения бактерий, продуцирующих этот фитогормон. Между тем, ауксины влияют на ветвление корней и их экссудацию, что может улучшать усвоение фосфора растениями. Таким образом, продукция ауксинов бактериями может играть комплексную роль в регуляции роста растений и усвоения ими элементов минерального питания. Для того, чтобы повысить эффективность бактериальных препаратов как средства увеличения урожайности растений необходимо более детальное изучение влияния ауксин-продуцирующих бактерий на растения. Наша работа направлена на решение этой задачи. На ее первом этапе был проведен скрининг штаммов бактерий, обладающих фосфат-мобилизирующим свойством, на способность продуцировать ауксины и изучено влияние их инокуляции в ризосферу пшеницы на рост растений на субстрате с низким содержанием мобильного фосфора.

Материалы и методы

Способность накапливать в среде культивирования ИУК оценивали у штаммов бактерий *Acinetobacter* sp. IB Ki-1 (предварительно идентифицирован), *Azotobacter* sp. IB Ki-14, *B. subtilis* ИМВ В-7023, *Flavobacterium* IB Ki-7, *Gluconobacter* sp. IB Ki-11 и бактерии рода *Pseudomonas* – *P. fluorescens* IB Ki-19 и *Pseudomonas* sp. (3 штамма IB Ki-17, IB Ki-8-1, IB Ki-8-2a). Штамм *B. subtilis* ИМВ В-7023 из коллекции Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, все остальные штаммы (пока идентифицированные предварительно) из коллекции ИБ УНЦ РАН. Бактерии рода *Pseudomonas* культивировали в жидких питательных средах Кинг Б, где в качестве источника углерода был глицерин, а все остальные штаммы на модифицированной среде Менкиной – с глюкозой. Штаммы микроорганизмов культивировали в колбах Эрленмейера на качалках (УВМТ-12-250) (160 об/мин⁻¹) при 28⁰С в течение 96-120 часов. Полученная суспензия бактериальных клеток использовалась для внесения в корнеобитаемую зону растений. В процессе культивирования брали аликвоту среды для анализа ауксинов. ИУК из культуральной жидкости экстрагировали диэтиловым эфиром по модифицированной схеме [4]. Для определения содержания ауксинов применяли метод иммуноферментного анализа [4].

Изучали влияние бактерий на рост растений твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf., сорта Башкирская 27) в лабораторных условиях. Vegetационные сосуды наполняли 0,7 кг почвы, отобранной по низкому содержанию подвижных форм фосфора. Растения пшеницы

(по 12-14 семян/сосуд) росли при освещенности 90 Вт/м² и 14-часовой продолжительности светового дня. Температура воздуха в течение светового периода была в пределах 24-27 °С. Ежедневно растения поливали дистиллированной водой, влажность почвы между поливами колебалась в пределах 55 - 80% полной влагоемкости. Инокуляция бактерий осуществлялась через два дня после появления всходов на поверхности почвы путем внесения суспензии бактериальных клеток в корнеобитаемую среду в количестве $7,7 \times 10^7$ КОЕ/г почвы.

Результаты и обсуждение

Среди исследованных 4 штаммов рода *Pseudomonas* продуцентами ауксинов были все культуры, но в различной степени. Максимальное количество целевого продукта продуцировали штаммы *P. fluorescens* IB Ki-19 (30 нг/мл) и *Pseudomonas* sp. IB Ki-17 (26-56 нг/мл), и несколько меньшее количество *Pseudomonas* sp. IB Ki-8-1 (19 нг/мл) и *Pseudomonas* sp. IB Ki-8-2a (5-17 нг/мл). Продукцию ауксинов у штаммов рода *Pseudomonas* обнаруживали уже через 6 ч после начала культивирования с максимумом на 24 ч, а потом их концентрация плавно снижалась. Хорошим продуцентом ауксинов был штамм *B. subtilis* 7023. При культивировании штамма на среде с глюкозой образование целевого продукта во время спорообразования составляло стабильно около 60 нг/мл. Высокую способность к продукции ауксинов показал штамм *Azotobacter* sp. IB Ki-14, продуцирующий их в количестве 60 нг/мл к 72-120 ч инкубации. По результатам оценки концентрации ауксинов в культуральной среде были отобраны *Azotobacter* sp. IB Ki-14 и *B. subtilis* 7023.

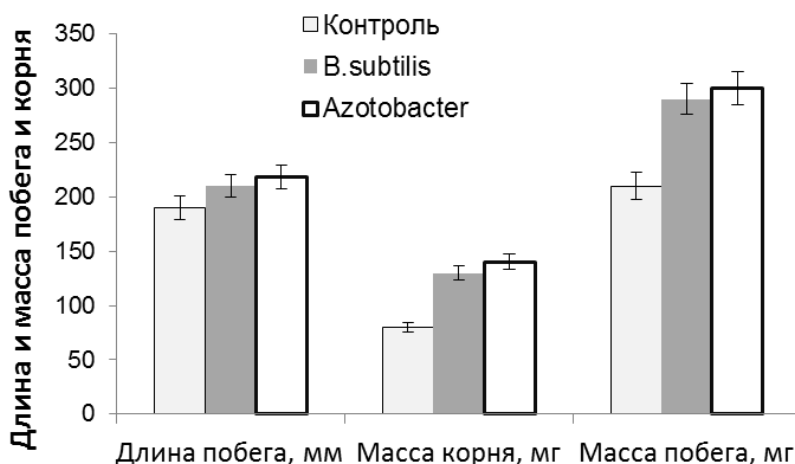


Рисунок 1 - Влияние инокуляции бактерий *Azotobacter* sp. IB Ki-14 и *B. subtilis* 7023 в ризосферу на показатели роста растений пшеницы сорта Башкирская 27 при их выращивании в почве с низким содержанием подвижного фосфора. Через 10 дней после однократной обработки

Figure 1 - Influence of inoculation of bacteria *Azotobacter* sp. IB Ki-14 and *B. subtilis* 7023 into the rhizosphere of plants on the growth of wheat varieties Bashkir 27 when grown in soil with a low content of available phosphorus after 10 days following a single treatment

Как видно из рис. 1, инокуляция ризосферы ауксинпродуцирующими бактериями повышала вес побегов и корней, длину побега и соотношение массы подземных органов к надземным. Последний эффект указывает на относительную активацию развития корневой системы, что должно способствовать повышению их способности обеспечивать растение водой и элементами минерального питания. Известно, что ауксины стимулируют ветвление корней и могут способствовать удлинению побега. Следовательно, поступление в растения ауксинов, синтезируемых бактериями, может способствовать активации развития корневой системы. Вместе с тем, не исключено, что увеличение массы растений в результате инокуляции их ризосферы было результатом улучшения их питания за счет повышения доступности

фосфатов под влиянием микроорганизмов. В случае *Azotobacter* возможно также влияние бактерий на рост растений за счет фиксации ими азота. Вместе с тем, рост-стимулирующее действие потенциальных азотфиксаторов в наших опытах не превышало стимулирующий эффект от *B. subtilis*, т.е. неспособных к фиксации азота бактерий. Таким образом, скорее рост стимулирующий эффект мог быть связан с фосфат мобилизующей способностью самих бактерий или влиянием продуцируемых ими ауксинов.

Исследования поддержаны грантами РФФИ 14-04-97049 Р_поволжье_a и 14-04-00775А.

Литература

1. Dodd I.C., Ruiz-Lozano J.M. Microbial enhancement of crop resource use efficiency // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2012. – V. 23. – P. 236-242.

2. Vessey J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers // *Plant Soil*. – 2003. – V. 255. – P. 571–586.

3. Кудоярова Г.Р., Курдиш И.К., Мелентьев А.И.. Образование фитогормонов почвенными и ризосферными бактериями как фактор стимуляции роста растений // *Известия Уфимского НЦ РАН*. – 2011. – Т. 3-4. – С. 5-16.

4. Высоцкая, С.Ю. Веселов, Д.С. Веселов, В.Н. Филиппенко, Е.А. Иванов, И.И. Иванов, Г.Р. Кудоярова. Иммуногистохимическая локализация и количественное определение ИУК при исследованиях регуляции роста корней // *Физиология растений*. - 2007. - Т. 54. – С. 926-931.

THE ABILITY OF PHOSPHATE-MOBILIZING BACTERIA TO PRODUCTION OF PHYTOHORMONES AND ITS INFLUENCE ON WHEAT GROWTH

Vysotskaya L.B., Kuzmina L.Yu., Ryabova A.S., Gabbasova I.M., Melent'ev A.I.

plant growth promoting bacteria, auxins, growth

The ability of bacteria from genera *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Gluconobacter* to production of phytohormones of auxin group was studied. Auxin producers were found among strains of the first three genera by means of immunoassay. Inoculation of most active auxin-producing strains' suspensions into rhizosphere of wheat plants grown on a medium with a low concentration of phosphate in the soil solution increased the length and weight of shoots and roots and the mass ratio of root/shoot.

СВЕТОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЗАПАСАНИЯ ЭНЕРГИИ В МОНО- И МНОГОЯРУСНЫХ ФИТОЦЕНОЗАХ СВЕТОКУЛЬТУРЫ ОВОЩНЫХ РАСТЕНИЙГоловко Т.К.¹, Далькэ И.В.¹, Григорай Е.Е.², Буткин А.В.², Табаленкова Г.Н.¹, Захожий И.Г.¹¹Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Коммунистическая, 28, г. Сыктывкар, 167982, Россия E-mail: golovko@ib.komisc.ru²ООО «Пригородный», ул. Тентюковская, 425, г. Сыктывкар, Россия*салат листовой, огурец, фотосинтез, продуктивность, освещенность, защищенный грунт*

Продуктивность является результатом всех функций растительного организма, но его основой служит фотосинтез. Усваиваемые растением в процессе фотосинтеза элементы – С, Н и О составляют 90-95% биомассы. В физиологически приемлемых условиях фотосинтетический аппарат обеспечивает реализацию генетически детерминированной программы роста и развития, используя солнечную энергию и другие ресурсы среды. Интеграция фотосинтеза и роста осуществляется через систему донорно-акцепторных отношений [1]. В обеспечении клеток энергией и метаболитами участвует дыхание. В дыхании окисляется 40-60% ассимилированного углерода [2]. Условия защищенного грунта позволяют контролировать основные факторы среды и оптимизировать их в соответствии с биологическими потребностями культур. Однако в условиях России развитие интенсивной светокультуры в зимний период практически невозможно без использования искусственных источников освещения. Целью работы было изучение световой регуляции фотосинтеза и оценка эффективности запасаения энергии в моно- и многоярусных фитоценозах овощных растений в закрытом грунте.

Исследования проводили на базе ООО «Пригородный» в черте г. Сыктывкар (первая световая зона). В теплицах (Агрисовгаз, Россия) функционируют автоматические системы управления микроклиматом (Sercom, Нидерланды). Применяются системы капельного полива, увлажнения, минерального питания, досвечивания растений. Листовой салат (сорт Афицион и Лифли) выращивали в горшочках с торфом в смеси с агроперлитом, растения огурца (гибрид F1 Церес) – на минеральном субстрате (Агрос, Россия) под натриевыми лампами высокого давления (Reflux, Россия).

Интенсивность ФАР измеряли квантовым датчиком LI-190 SA (Licor, Inc, США). Скорость CO₂-газообмена регистрировали с помощью системы LCP⁺ (ADC BioScientific Ltd., Англия). Концентрацию пигментов в ацетоновых вытяжках определяли на спектрофотометре UV-1700 («Shimadzu», Япония). Функциональную активность ФС2 оценивали по показателям индуцированной флуоресценции хлорофилла *a*, измеренным флуориметром РАМ-2100 (Walz, Германия). Площадь листьев находили по их фотоснимкам с помощью программы анализа изображений Image Tools (UTHSCSA, 1995-2002). Содержание растворимых сахаров и крахмала определяли по [3] с модификациями.

Морфофизиологические и продукционные показатели листового салата. Растения формировали монослойный ценоз высотой 18-23 см. Поступление ФАР прямо зависело от количества светильников и составляло 150, 200 и 250 мкмоль/м²с. Листовая поверхность нарастала довольно быстро и к уборке достигала 10-15 м²/м². С увеличением освещенности она возрастала на 30%. Листья содержали 6.5-7.7 мг/г сухой массы хлорофиллов и в 4 раза меньше каротиноидов. Скорость фотосинтеза (Фв) листьев молодых растений при действующей ФАР составляла 8-10 мкмоль CO₂/м²с, а в области светового насыщения была в 1.7-2 раза выше. У зрелых растений Фв достоверно выше в варианте с лучшим освещением. Скорость темного дыхания (Дт) листьев составляла в среднем 1.5 мкмоль CO₂/м²с. С возрастом культуры соотношение Дт/Фв повышалось, сильнее у листьев слабо освещенных растений. Урожайность салатной линии увеличивалась пропорционально повышению количества

поступающей к растениям ФАР и достигала у интенсивной светокультуры 7-8 кг/м². Условия освещения не оказали заметного влияния на эффективность запасаения световой энергии в биомассе (КЭ). Величина КЭ составляла 0.84-0.88 г сухой массы/моль ФАР, что эквивалентно 4.1- 4.5 г /МДж. КЭ салата в коммерческих теплицах равнялся 0.8 г/моль ФАР [4], а в полевых условиях 2.4 г/МДж [5]. В замкнутых системах этот показатель был вдвое ниже [4].

Морфофизиологические и продукционные показатели огурца. Гибрид F1 Церес – растение с недетерминированным ростом. В условиях светокультуры нижние, стареющие листья огурца периодически удаляют, оставляя на растении 25 - 28 штук. При расположении светильников над растениями, листья в глубине ценоза получали сильно ослабленный свет. Лампы над ценозом обеспечивали ФАР на уровне верхнего яруса около 200 мкмоль /м² с. Размещение дополнительных ламп в междурядьях повышало освещенность листьев нижнего и среднего ярусов в 1.5-2 раза, до 70-100 мкмоль /м² с. С учетом времени работы ламп (19 ч) поступление ФАР к растениям за сут. составляло около 15 моль/м², в том числе, 14 % за счет ламп внутри ценоза.

При всех работающих светильниках скорость Фв листьев верхнего яруса составляла 8 - 11 мкмоль СО₂/м² с или 42 - 53 мг СО₂/ г ч, у листьев среднего и нижнего ярусов была вдвое ниже. После полного отключения ламп регистрировали выделение СО₂ из листьев (1-2 мкмоль/м²с). Для восстановления 1 моля СО₂ более молодые листья верхнего яруса расходовали около 30 моль ФАР. Листьям в глубине ценоза требовалось в 1.5-2 раза больше световой энергии, что обусловлено онтогенетическими факторами снижения Фв [6] и увеличением соотношения Фв/Дт [2]. Верхушечные листья содержали меньше хлорофилла (в расчете на сухую массу) и отличались более высокой удельной поверхностной плотностью. Они ассимилировали интенсивней и не испытывали значительной плодонагрузки, как листья среднего и нижнего ярусов. Во время фазы плодоношения (конец декабря) концентрация крахмала в листьях верхнего яруса была существенно больше, чем в листьях среднего и нижнего ярусов, и составляла 20-25% от сухой биомассы, а растворимых сахаров около 3 %. В нижерасположенных листьях отмечали выраженную динамику фонда неструктурных углеводов. Содержание крахмала в конце периода освещения (перед выключением ламп) было вдвое выше, чем в начале (после 5 ч темноты), но существенно (в 2-3 раза) ниже по сравнению с листьями верхнего яруса. Наибольшие значения величины максимального квантового выхода ФС2 (Fv/Fm= 0.81-0.83) были измерены у листьев среднего яруса. Хлоропласты верхних и нижних листьев характеризовались более низкой потенциальной активностью ФС 2 (Fv/Fm= 0.75-0.78). Возможно, что у верхних листьев это было обусловлено высоким уровнем содержания крахмала, а у нижних – возрастом. Расчеты показали, что для образования 100 г плодов (~22 г сухой массы) растения должны запастись не менее 5 моль или 1 МДж ФАР. Величины такого порядка приводятся и другими авторами [7,8].

Таким образом, нами выявлены закономерности распределения света в ценозах одно- и многоярусных тепличных культур в зимнем обороте. Установлено, что увеличение потока ФАР к агроценозу листового салата приводило к повышению продуктивности за счет возрастания скорости фотосинтеза и роста листовой поверхности. В области ФАР 150 – 250 мкмоль/м²с эффективность запасаения световой энергии в биомассе салата не зависела от освещенности и составляла в среднем 0.8 г сухой массы /моль ФАР или 4 г /МДж. Перераспределение света в ценозе огурца и улучшение освещенности листьев среднего и нижнего ярусов повышает урожайность и позволяет получить 48-50 кг плодов/м². Эффективность запасаения энергии в полезной продукции составляла в среднем 100 г сырой массы/МДж ФАР. Используемые режимы освещения оправданны физиологически и позволяют сохранить рентабельность производства тепличной продукции в осенне-зимнем обороте в первой световой зоне.

Литература

1. Мокроносов А.Т. Фотосинтетическая функция и целостность растительного организма. М.: Наука, 1983. 64 с.

2. Головки Т. К. Дыхание растений (физиологические аспекты). СПб: Наука, 1999. 204 с.
3. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. Киев: Наукова думка, 1976. 334 с.
4. Wheeler R.M., Mackowiak C.L., Stutte G.W., Yorio N.C., Ruffe L.M., Sager J.C., Prince R.P., Knott W.M. Crop productivities and radiation use efficiencies for bioregenerative life support // *Advances in Space Research*. 2008. Vol. 41. P. 706-713.
5. Tei F., Scaife A., Aikman D.P. Growth of lettuce, onion, and red beet. 1. Growth analysis, light interception, and radiation use efficiency // *Annals of Botany*. 1996. Vol. 78. P. 633-643.
6. Мокроносков А.Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза М.: Наука, 1981. 194 с.
7. Ferreira R.C., Silva N.F., Bezerra R.S. Effects of photoselective shade nets on the meteorological elements, growth and radiation use efficiency of cucumber // XVIIth World Congress of the International Commission of Agricultural and Biosystems Engineering (CIGR) (Québec City, Canada – June 13-17, 2010). P. 1-9. (<http://www.csbe-scgab.ca/docs/meetings/2010/CSBE101226.pdf>)
8. Niderhoff E. M., Vegter J. G. Photosynthesis of stands of tomato, cucumber and sweet pepper measured in greenhouses under various CO₂-concentrations // *Annals of Botany*. 1994. Vol. 73. P.353-361.

LIGHT REGULATION OF PHOTOSYNTHESIS AND RADIATION USE EFFICIENCY IN MONO- AND MULTISTAGE PHYTOCENOSES OF VEGETABLE PLANTS

Golovko T.K., Dalke I.V., Grygoray E.E., Butkyn A.V., Tabalenkova G.N., Zakhoziy I.G.

lettuce, cucumber, photosynthesis, productivity, lighting, greenhouse

The lettuce and cucumber leaves' photosynthetic activity and crop yield dependence on lighting were studied during winter-round in greenhouse. The increase of PAR from 150 to 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ intensified the leaf photosynthetic and growth rate of lettuce and increased crop productivity by 30-35%. Coefficient of radiation use efficiency of lettuce crop was $\sim 0.8 \text{ g DW}/\text{mol PAR}$ under all regimes of lighting. Positive effects of intracanopy lighting on photosynthetic characteristics in cucumber were observed. Crop productivity increased to 50 kg fruit / m^2 , and radiation use efficiency was 100 g fruit biomass/MJ PAR.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕРБИЦИДОВ В ПОСЕВАХ КУКУРУЗЫ (*ZEA MAYS L.SSP.MAYS*) НА ЗЕРНО В УСЛОВИЯХ КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

Григорович Л.М.¹, Проворова О.Н.²

¹ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет»,
Советский пр., 1, г. Калининград, 236022, Россия, E-mail: agronjmia@mail.ru

²ЗАО Фирма «Август», представитель в Калининградской области, ул. Московская, 9,
г. Нестеров Калининградской обл., 238010, Россия, E-mail: provorova.olga@mail.ru

кукуруза, гербицид, эффективность

Возделывание кукурузы в Калининградской области способно решить актуальные вопросы обеспечения собственными кормами перспективно развивающуюся отрасль животноводства. Получение высоких урожаев кукурузы и полное раскрытие потенциала гибрида невозможно без своевременной защиты от нежелательной растительности. Изучение эффективности влияния гербицидов на засоренность посевов имеет большое значение для внедрения интенсивных технологий возделывания кукурузы в условиях региона.

Производственные испытания гербицидов Лазурит (действующее вещество метрибузин) и ДУБЛОН Голд (д.в. никосульфурон + тифенсульфурон-метил) ЗАО Фирмы «Август» для обработки наиболее эффективных схем защиты посевов от нежелательной растительности проведены в посевах кукурузы (гибрид Галина венгерской компании «Вудсток КФТ») в ЗАО «Садовое» Нестеровского района. Площадь экспериментального поля - 8 га, предшественник – кукуруза на силос. Почва – дерново-скрытоподзолистая глееватая, по гранулометрическому составу – средний суглинок. Агрохимические показатели: рН – 5,2, содержание гумуса – 1,75, доступных форм фосфора – 7,7 мг/100 гр., обменного калия - 12,0 мг/100 г почвы, серы – 4,4 мг/кг почвы. Сев проведен 9 мая 2013 г., норма высева - 70 всхожих семян на 1 м².

Схема опыта включала три варианта в четырех повторностях. Первый - с двукратным (довсходовым и послевсходовым) применением гербицидов: через 2 дня после посева Лазурит с нормой расхода препарата 0,6 кг/га; в фазу 4-6 листьев культуры (13 стадия развития по Zadoks) - ДУБЛОН Голд с нормой расхода 0,075 кг/га. Второй вариант с однократным (послевсходовым) применением гербицида: в фазу 4-6 листьев культуры (13 стадия развития по Zadoks) - ДУБЛОН Голд с нормой расхода 0,075 кг/га. Третий вариант – контроль без гербицидной обработки. Величину и качество урожая семян, биометрические показатели растений определяли стандартными методами [1; 2].

Результаты исследований ряда авторов свидетельствуют, что количество сорняков на единицу площади играет менее значимую роль, чем фаза развития кукурузы, при которой они появились [3; 4]. По нашим наблюдениям, в условиях Калининградской области однократное применение гербицидов показывало нестабильный результат в снижении засоренности посевов кукурузы.

Применение препарата Лазурит до всходов культуры позволило уничтожить нежелательные растения в момент их прорастания, то есть обеспечило защиту посева на начальном этапе развития культуры. Через 20 дней после обработки в контроле (варианте без гербицида) на 1 кв.м насчитывалось в среднем 47,6 нежелательных растений с преобладанием мари белой (*Chepodium album L.*) - 18,6 шт., осота желтого (*Sonchus arvensis L.*) и падалицы рапса (*Brassica napus L.*) - по 12 шт. В варианте с применением Лазурита сорные растения были представлены только осотом желтым - 2,6 шт./кв. м. Таким образом, биологическая эффективность Лазурита в подавлении нежелательной растительности в этот период составила 94,5%.

Однако, через 25 дней на опытном участке появились всходы широколистных сорняков, кроме того, был отмечен пырей ползучий (*Elytrigia repens Nevski*). Для повторной гербицидной обработки использовали двухкомпонентный ДУБЛОН Голд (0,075 кг/га), обладающий высокой

эффективностью против основных видов злаковых и двудольных сорняков, широко распространенных в посевах кукурузы.

Учет засоренности по массе сорняков, проведенный в стадию развития кукурузы 32-34, показал высокую эффективность гербицидов в обоих вариантах: опытные участки были свободны от нежелательной растительности. Однако воздействие на пырей ползучий оказалось интенсивнее в варианте с двукратным применением гербицидов: биологическая эффективность составила 90,9%, при однократном послевсходовом опрыскивании этот показатель был значительно ниже – 72,5%. Учет продуктивности растений кукурузы и биологической урожайности зерна проведен перед уборкой урожая при влажности зерна 40%, результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1 – Эффективность применения гербицидов в посевах кукурузы на зерно
Table 1 – Efficiency of application of herbicides in maize crops on grain

Вариант	Количество растений на 1 м ²	Высота растений, м	Масса початка, г	Количество зерен в початке	Масса 1000 зерен, кг	Урожайность зерна, т/га
Лазурит, 0,6 кг/га + ДУБЛОН Голд, 0,075 кг/га	5,60	2,40	301,20	568,480	0,45	16,86
ДУБЛОН Голд, 0,075 кг/га	5,60	2,35	292,70	552,960	0,45	16,39
Контроль (без гербицидов)	5,60	1,90	195,50	389,160	0,36	10,94

Снижение засоренности в вариантах с применением гербицидов положительно сказалось на развитии кукурузы: сформировались более мощные растения, превышающие высоту в контроле на 0,5 м. Повысилась продуктивность растений: масса початка с участка с двукратной гербицидной обработкой составила в среднем 301,2 г со средним количеством зерен 568,48 шт., с однократной – 292,7 г (552,96 шт.), что в 1,5 раза выше показателя контрольного варианта. Прибавка биологической урожайности в варианте с двукратной гербицидной обработкой по сравнению с контролем составила 5,92 т/га, в варианте с однократной обработкой - 4,42 т/га при урожайности 16,86 и 16,39 т/га, соответственно.

Литература

1. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Справочное издание. – М., 2013. – 636 с.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М., 1985. – 351 с.
3. Шпаар, Д. Кукуруза / Шпаар Д., Гинапп К., Дрегер Д. и др. - М.: ИД ООО «DLV АГРОДЕЛО», 2009. – 390 с.
4. Артохин К.С. Сорные растения: справочное и учебно-методическое пособие. – М.: Печатный город, 2010.- 272 с.

EFFICIENCY OF USE OF HERBICIDES IN SEEDING OF MAIZE (*ZEA MAYS* L. SSP. *MAYS*) ON GRAIN IN THE CONDITIONS OF THE KALININGRAD REGION

Grigorovich L.M., Provorova O. N.

maize, herbicide, efficiency

Tests of schemes of herbicidal protection of seeding of maize from undesirable vegetation with double and single application of herbicides proved advantage of double processing. The option with processing by Lazurite (0,6 kg/ha) to Emergence maize in combination with application DOUBLOON Gold (0,075 kg/ha) in a phase of 4-6 leaf collar of crop appeared the most effective.

ВЛИЯНИЕ ПРАВИЛЬНОЙ ПИРАМИДЫ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ЯЧМЕНЯ

Гуревич А.С., Афанасьева К.С.

ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет»,
Советский пр., 1, г. Калининград, 236022, Россия, E-mail: agronjmia@mail.ru*ячмень, правильная пирамида, прорастание, органогенез*

Правильные пирамиды в последние годы начинают все шире использоваться в практических целях в Калининградской области. Так пирамиды, имеющие покрытие из янтаря используются в лечебно-профилактических целях в светлогорском санатории «Янтарный берег» (1), на включенной в экскурсионный маршрут смотровой площадке карьера Янтарного комбината в поселке Янтарном (2), (рис. 1 приложения), в краеведческом музее этого поселка (рис. 2 приложения). Некоторые фермеры выращивают продовольственную продукцию в теплицах, имеющих форму правильной пирамиды. Получили распространение сооружения в форме правильной пирамиды и в европейских странах. В частности, такую форму имеют некоторые овощехранилища. В многочисленных литературных источниках декларируется позитивное влияние правильной пирамиды на здоровье человека, состояние животных и растений (3 – 6).

Вместе с тем, влияние правильных пирамид на биологические объекты традиционной наукой остается практически неизученным.

Учитывая сказанное выше, в настоящей работе мы поставили перед собой следующую цель: выяснить, способна ли правильная пирамида оказывать влияние на биологические процессы, в частности – на прорастание семян ячменя.

Семена ячменя сорта Нур проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге по 100 штук. Использовали водопроводную воду. Эксперименты осуществляли в комнатных условиях при температуре 17 – 24 градусов Цельсия. Применяли пирамиды двух видов: изготовленную из медной проволоки с длиной стороны основания 20 сантиметров, высотой 40 сантиметров и изготовленную из деревянных реек с длиной стороны основания 23 сантиметра и высотой 25 сантиметров.

Чашку Петри с семенами опытной группы устанавливали в пирамиду. Контрольные семена проращивали без пирамиды. С целью повышения достоверности полученных данных был заложен дополнительный контрольный эксперимент (контроль 2). В нем две чашки Петри с проращиваемыми семенами устанавливали на расстоянии 20 сантиметров друг от друга вне пирамиды. Повторность опытов – тридцатикратная. Полученные данные обрабатывали методами математической статистики (9).

В ходе экспериментов были получены следующие результаты. Первичные данные были подвергнуты математической обработке. В каждом эксперименте достоверность разности долей по каждому из изученных параметров между опытным и контрольным вариантом, а также между двумя контрольными вариантами (в контроле 2) оценивали по критерию Стьюдента t для непараметрических признаков.

Как следует из полученных данных, лишь в части опытов проявились достоверные отличия между вариантами. При этом под влиянием правильной пирамиды происходило как увеличение доли проросших семян и других изученных параметров, так и их уменьшение. В связи с этим была проведена оценка всего комплекса полученных данных по критерию Стьюдента t для параметрических признаков.

Средние значения и стандартные отклонения проявившихся в опытах всхожести и энергии прорастания семян ячменя представлены в таблице 1. Как показал статистический анализ данных, различия средних значений между вариантами контрольного эксперимента (контроль 2) не достоверны. В то же время, уменьшение энергии прорастания и всхожести

семян ячменя под действием правильной пирамиды оказалось достоверным для уровня доверительной значимости 0,05.

Таблица 1 - Влияние правильной пирамиды на прорастание семян ячменя

Table 1 - Influence of regular pyramid on germination of barley seeds

Вариант	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
Контроль	13,47±8,44	47,53±24,11
Опыт	9,84±5,84	38,23±26,40
Контроль 2,1	7,17±2,79	28,77±25,89
Контроль 2,2	7,42±3,23	28,46±26,60

Средние значения и стандартные отклонения выявленных в ходе экспериментов долей наклюнувшихся и проросших семян ячменя представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Влияние правильной пирамиды на органогенез всходов ячменя

Table 2 - Influence of regular pyramid on organogenesis of barley shoots

Вариант	Проросших семян с листьями и корнями, %	Проросших семян только с корнями, %	Наклюнувшихся семян, %
Контроль	20,30±14,40	19,23±16,90	7,80±7,46
Опыт	16,77±11,02	14,77±16,27	6,83±7,65
Контроль 2,1	11,08±6,82	10,33±16,77	4,50±5,82
Контроль 2,2	11,58±7,83	9,25±14,24	5,92±9,69

Различия средних между вариантами контрольного опыта не достоверны. Уменьшение доли проросших семян, образовавших листья и корнями, под влиянием правильной пирамиды достоверны для уровня доверительной значимости 0,05. Влияние правильной пирамиды на количество наклюнувшихся семян и проросших семян, образовавших только корни, не достоверно.

В ходе анализа данных, полученных в опытах с пирамидами, изготовленными из проволоки и реек отдельно, получены аналогичные результаты.

Результаты проведенных экспериментов позволяют сделать следующие выводы:

Правильная пирамида несколько снижает всхожесть, энергию прорастания семян ячменя и количество проросших семян, образовавших листья и корни.

Правильная пирамида не оказывает достоверного влияния на количество наклюнувшихся семян и проросших семян, образовавших только корни.

Материал, из которого изготовлена пирамида, не оказывает существенного влияния на ее действие на прорастание семян ячменя.

Таким образом, в ходе эксперимента не получены данные, свидетельствующие в пользу предположения о позитивном влиянии правильной пирамиды на биологические объекты. Более того, без проведения дополнительных исследований использование правильной пирамиды для стимулирования биологических процессов не целесообразно.

Литература

1. Петухов, Н. За янтарную пирамиду изобретатели намерены взыскать с комбината 150 тыс рублей // Новый Калининград, 21.05.2012 г.
2. Нагорных, Е. Построили рекордную янтарную пирамиду // Российская газета, 18.05.2012 г.
3. Рысьев, О.А. Эффект формы пирамид / О.А. Рысьев М.: Диля, 2005. – 160с.
4. Кортиков, В.Н. Пирамиды здоровья, или Целебная сила пирамид / В.Н. Кортиков Ростов-на-Дону: Проф-Пресс, 2004. – 320с.
5. Бьювел, Р. Секреты пирамид / Р. Бьювел, Э. Джилберт М.: «Вече», 1997. – 76с.
6. Ефимова, И. Раскрытые тайны пирамид / Наука и религия. N4, 1997. -14-15с.

7. ГОСТ 10968-88. Зерно. Методы определения энергии прорастания и способности прорастания.

8. Беляев, А.Б. Методические указания к лабораторно-практическим занятиям по общему земледелию / А.Б. Беляев Воронеж: Изд-во ВГУ, 2000. – 32с.

9. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин М.: «Высшая школа», 1973. – 352с.

INFLUENCE OF REGULAR PYRAMID ON GERMINATION OF BARLEY SEEDS

Gurevitch A.S., Aphanasyeva K.S.

barley, regular pyramid, germination, organogenesis

Studied the effect of a regular pyramid on the germination of barley seeds. Found that regular pyramid has a weak inhibitory effect on seed germination and shoots organogenesis. Using regular pyramid to stimulate biological processes is not recommended.

**УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХЛОРОПЛАСТОВ В
ТРАНСПЛАСТОМНЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА**Данилова С.А.¹, Баранова Е.Н.², Гулевич А.А.², Кунакова Е.А.¹, Ралдугина Г.Н.¹¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН,
Ботаническая ул., 35, г. Москва, 127276, Россия²ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии
РАСХН, ул. Тимирязевская, 42, г. Москва, Россия, 127550, E-mail: svdan@yandex.ru*Nicotiana tabacum*, транспластомные растения, ультраструктура хлоропластов, *rKMS8*, *aadA^{au}*,
фенотип *aurea*, баллистическая трансформация**Введение**

Транспластомная инженерия считается наиболее перспективной для супер-продукции ценных терапевтических белков, антигенов и компонентов вакцин, в том числе и так называемых, «съедобных». В связи с этим важной представляется более полно изучить изменения хлоропластов при генетических манипуляциях. Целью настоящей работы было выявление цитологических различий между фенотипическими и структурными параметрами пластид при использовании маркерного гена *aadA^{au}*, придающего золотистую окраску транспластомным растениям. Важно было выяснить, имеют ли транспластомные растения табака с золотистой окраской листа отличия в ультраструктурной организации хлоропластов мезофилла листьев от хлоропластов мезофилла молодого и стареющего листа нетрансгенного растения, имеющих зеленую (средний ярус) и желтую (нижний ярус) окраску.

Материалы и методы

Растительный материал. Для работы использовали транспластомные растения табака *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana содержащие в хлоропластном геноме кассету экспрессии с селективным маркером – геном *aadA^{au}* [1].

Анализ ультраструктуры пластид мезофилла листа. Фрагменты срединной части 3-го листа (поперечные кусочки шириной 1 мм³) контрольных и транспластомных растений (имеющих золотистую окраску), а также фрагмент старого (желтеющего) и молодого листа зеленых нетрансформированных растений фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида (Merck, Германия) на 0,1 М фосфатном буфере Серенсена (pH 7,2) с добавлением 1,5% сахарозы, дофиксировали 1,0% раствором четырехоксида осмия (OsO₄) (Sigma, США), обезвоживали в этаноле и окиси пропилена (Fluka, Германия) и заключали в смесь Эпон-Аралдит. Ультратонкие срезы изготавливали с помощью ультрамикротомы LKB-V (LKB, Швеция). Контрастировали препараты уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу [2]. Исследование препаратов проводили на электронных микроскопах H-300 и H-500 (Hitachi, Япония).

Результаты и обсуждение

Методом баллистической трансформации были получены транспластомные растения табака *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana с экспрессией гена *aadA^{au}*, придающую устойчивость к спектиномицину и вызывающую золотистую окраску листа при высаживании в почву после отбора на селективной среде [3]. Для исключения предположений о возможности пожелтения листьев в результате модификации пластид фотосинтезирующих клеток, характерного для поврежденных или стареющих листьев (рис. 1.А), было произведено изучение структурной организации хлоропластов из фрагментов молодых и стареющих листьев контрольных нетрансгенных растений (рис. 1.А,В,Г) и из фрагментов, обладающих золотистой окраской транспластомных секторов трансформированных растений (рис. 1.Б,Д). Структура хлоропластов мезофилла сформированных листьев контрольных растений (дикого типа) соответствовала ортодоксальной структуре, характерной для хлоропластов мезофилла настоящих листьев табака [4]. Пластиды (рис. 1.В) имеют характерную линзовидную форму, большое количество тилакоидов стромы, а также характерные для хлоропластов активно

фотосинтезирующих тканей: большое число гран, сформированных 4-10 тилакоидами. Во внутреннем пространстве пластид расположены мелкие крахмальные зерна, пластоглобулы и светлые участки (зоны расположения пластидной ДНК - нуклеоиды – указаны стрелками) на фоне плотной стромы (рис. 1.В). Пластиды мезофилла желтеющего старого листа нижнего яруса (рис. 1Г) имеют характерные изменения структурной организации, выражающиеся в появлении более крупных крахмальных зерен, увеличении в 3-7 раз количества и площади среза пластоглобул, просветлении стромы и отсутствие четко идентифицируемых светлых областей с нуклеоидами (рис. 1Г). Количество тилакоидов гран и стромы несколько уменьшено - грани содержат от 3 до 8 тилакоидов.

Хлоропласты мезофилла фрагмента золотистой части листа гетеропластомного растения табака имеют существенные отличия от пластид контрольных растений. Размеры пластид уменьшаются в 1,5 – 2 раза. Кроме того, отличия выражаются в уменьшении количества тилакоидов в гранях до 2-5, увеличении количества светлых участков стромы, характерных для расположения нуклеоидов (рис.1Д). Еще одним отличием является неравномерные отложения осмиофильного материала в межмембранном пространстве по поверхности хлоропласта.

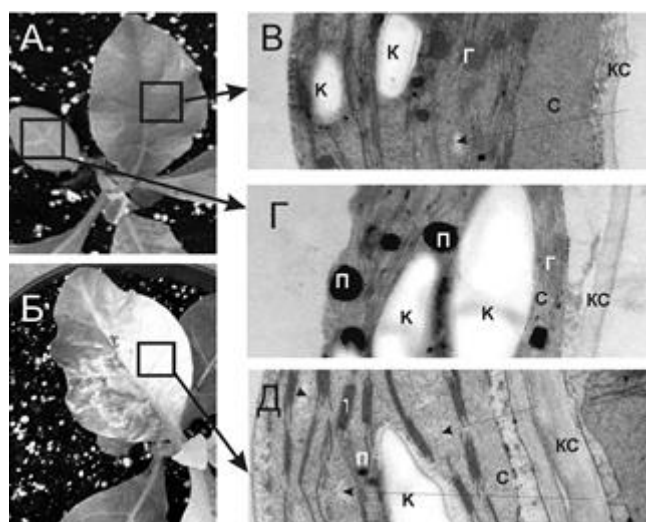


Рисунок 1 - Структурная организация хлоропластов мезофила листа транспластомного растения табака с геном *aadA^{au}*. А-контроль, Б-транспластом, В-фрагмент хлоропласта клетки мезофила зрелого листа, Г- фрагмент хлоропласта клетки мезофила стареющего (желтого) листа, Д-фрагмент хлоропласта клетки мезофила зрелого листа транспластомного растения

Figure 1 - Structural organization of chloroplasts mezafila sheet transplastomic tobacco plants with the gene *aadA^{au}*. А-control, Б-transplastom, В-fragment of the chloroplast cells mezafila mature leaf, Г-fragment of the chloroplast cells mezafila aging (yellow) leaf, Д-fragment of the chloroplast cells mezafila mature leaf transplastomic plants

Изменения в структурной организации пластид ранее были отмечены и при получении трансгенных растений [5]. Таким образом, изменение ультраструктуры пластид может иметь различные последствия и быть частично нивелировано за счет увеличения их количества в клетке или за счет изменения работы различных систем обеспечивающих работу обеих фотосистем.

В заключение, следует добавить, что в связи с выявленными изменениями фотосинтетического аппарата пластид при пластидной трансформации в нашем случае, применения маркера *aadA^{au}*, требуют дальнейшего изучения, принимая во внимание надежность и перспективность использования пластидной трансформации.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда РФФИ 13-08-01323 а.

Литература

1. Tungsuchat-Huang T., Slivinski, K.M., Sinagawa-Garcia S.R., Maliga, P. Visual Spectinomycin Resistance Gene for Facile Identification of Transplastomic Sectors in Tobacco Leaves // *Plant Mol. Biol.* 2011. V. 76. P. 453–461.
2. Reynolds E.S. The Use of Lead Citrate at High pH As an Electron-Opaque Stain in Electron Microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. P. 208–212.
3. Данилова С.А., Баранова Е.Н., Кунакова Е.А., Гулевич А.А., Ралдугина Г.Н. Получения и анализ хлоропластных трансформантов растений табака *Nicotiana tabacum L.* с маркерной кассетой экспрессии гена *aadA^{au}*, изменяющей окраску листа // Доклады РАСХН. 2014. №4. (в печати).
4. Baranova E.N., Serenko E.K., Balachnina T.I., Kosobruhov A.A., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Maisuryan A.N. Activity of the Photosynthetic Apparatus and Antioxidant Enzymes in Leaves of Transgenic *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana Tabacum* Plants, With FeSOD1 Gene // *Russian Agricultural Sciences.* 2010. V. 36. P. 242-249.
5. Serenko E. K., Baranova E.N., Balakhnina T.I., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Kosobruhov A.A., Maysurian A.N., Polyakov V.Yu. Structural Organization of Chloroplast of Tomato Plants *Solanum Lycopersicum* Transformed by Fe-Containing Superoxide Dismutase // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* 2011. V. 5. P. 177-184.

THE ULTRASTRUCTURE OF CHLOROPLASTS IN TRANSPLASTOMIC TOBACCO PLANTS

Danilova S.A., Baranova E.N., Gulevitch A.A., Kunakova E.A., Raldugina G.N.

Nicotiana tabacum, transplastomic plants, chloroplast ultrastructure, *pKMS8*, *aadA^{au}*, aurea phenotype, ballistic transformation

The mesophyll cells from leaves of wild-type tobacco plants (with green leaf fragments) and old leaves of wild-type and yellow leaf fragments with transformed chloroplasts (plastids with altered pigmentation due to expression of *aadA^{au}* transgene) were studied by electron microscopy. Chloroplasts of transplastomic plants were differed in the number and arrangement of thylakoids, the number and size of starch grains and plastoglobules.

**ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ – ПРОДУЦЕНТЫ СУБЪЕДИНИЧНЫХ
КАНДИДАТНЫХ СЪЕДОБНЫХ ВАКЦИН**

Дейнеко Е.В.

ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, пр. ак. Лаврентьева, 10,
г. Новосибирск, 630090, Россия, E-mail: deineko@bionet.nsc.ru

Mycobacterium tuberculosis, трансгенные растения, съедобные вакцины, системы экспрессии, рекомбинантные белки

Одним из наиболее эффективных методов борьбы с инфекционными заболеваниями является вакцинация, основанная на программировании специфических иммунологических механизмов на защиту от возбудителей инфекций. Несмотря на то, что благодаря вакцинации человечеству удалось избежать многих опасных инфекций, все еще остается актуальным вопрос об отрицательных эффектах, возникающих при использовании традиционных вакцин, которые основаны на аттенуированных или инактивированных патогенах (сенсбилизация организма, большая нагрузка на иммунную систему, реактогенность, токсичность и др.).

Применение методов современной биологии дает возможность идентифицировать и изолировать биологические макромолекулы или их фрагменты, которые можно было бы использовать в качестве иммуногенных компонентов. Такими компонентами могут выступать оболочечные белки патогенов и/или другие белки, являющиеся иммуногенами.

При разработке вакцин нового поколения, основанных на использовании рекомбинантных белков, актуальным остается вопрос о поиске высокоэффективных и экономически выгодных систем их экспрессии. В настоящее время для этих целей используются *E.coli*, *Saccharomyces*, клетки человека, клетки насекомых. Новые перспективы в наработке рекомбинантных белков открываются с использованием генетически модифицированных растений (биофарминг), которые могли бы выступать в качестве съедобных вакцин. Реальность и эффективность такого подхода многократно подтверждена исследователями ведущих биотехнологических лабораторий мира, а также деятельностью многочисленных компаний и фирм, специализирующихся на производстве одного или нескольких близкородственных продуктов на основе собственной экспрессионной платформы.

В настоящее время наряду с традиционными методами интенсивно разрабатываются новые подходы к получению вакцин против возбудителей инфекционных заболеваний. Динамично развивается направление биотехнологии, связанное с разработкой съедобных вакцин. Несколько таких разработок уже завершены, так например, съедобная вакцина против чумы кур (Dow Agrosciences, США) одобрена и находится в продаже в США. Созданы съедобные вакцины против вируса гепатита В (трансгенный салат) и против вируса бешенства (трансгенный шпинат), которые находятся на I стадии клинических испытаний (Университет Томаса Джефферсона, Филадельфия, США). Группа под руководством доктора Ч.Артцена (Университет штата Аризона, США) разработала съедобные вакцины против различных возбудителей диареи – норовируса и энтеротоксигенной *E.coli*, (трансгенные картофель, кукуруза и томаты), а также вакцину против холеры и гепатита В в трансгенном картофеле, которые находятся на I и II стадиях клинических испытаний. Американская компания «Medicago Inc.» создала рекомбинантные вакцины от гриппа (H1N1 и H5N1), синтезируемые в тканях трансгенных растений табака, которые находятся на I и II фазах клинических испытаний. Преимущество таких вакцин состоит в низких затратах на их производство и вакцинацию.

В Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск) выполнен цикл работ по созданию трансгенных растений с генами иммуногенов возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*. Выполнены дизайн и сборка генетических конструкций с генами *cfp10* и *esat6* *M.tuberculosis* для экспрессии в растительных клетках. Получены линии трансгенной моркови, в

тканях корнеплодов которых синтезировались рекомбинантные белки *M. tuberculosis* (ESAT6 - не менее 0,056% ОРБ; CFP10 - 0,002%). Продемонстрировано формирование клеточного и гуморального иммунных ответов при пероральной доставке исследуемых рекомбинантных антигенов экспериментальным животным (Uvarova et al., 2013). Формирование иммунного ответа при пероральной доставке CFP10-иммуногена, синтезируемого в тканях корнеплодов трансгенных растений моркови, установлено нами впервые. Установлено, что ESAT6 проявлял токсичность по отношению к мононуклеарам периферической крови. Мы предположили, что токсичность ESAT6 может быть снижена в присутствии адьюванта, в качестве которого мы использовали дельтаферон человека.

Создана генетическая конструкция с генами *cfp10* и *esat6* *M.tuberculosis* в слитой форме, включающая дополнительно ген дельтаферона *dIFN* человека. Включение гена дельтаферона человека в состав генетической конструкции предполагало использование рекомбинантного дельтаферона в качестве адьюванта и иммуномодулятора, усиливающего иммунный ответ к антигенам туберкулеза. Дельтаферон является рекомбинантным аналогом γ -интерферона человека, синтезируется в растворимой нативной форме, имеет повышенную устойчивость к протеазам крови и сниженную противовирусную активность. Создано два варианта конструкции - для экспрессии в прокариотической (*E.coli*) и эукариотической (*Daucus carota*) системах (Патент №2468082 от 27 ноября 2012 г.). В экспериментах с лабораторными животными нами установлено, что химерный белок CFP10-ESAT6-dIFN обладает способностью индуцировать гуморальные и клеточные звенья иммунитета при пероральном (корнеплоды трансгенной моркови) и инъекционном (очищенный рекомбинантный белок, синтезируемый в *E.coli*) введении в организм животных (мыши). Важно отметить, что ESAT6, входящий в состав химерного белка, не оказывал цитотоксического эффекта на мононуклеары периферической крови. Добавление химерного белка или дельтаферона (контроль) оказывало пролиферативное влияние на спленоциты неиммунизированных мышей. Установлено, что пероральная доставка CFP10-ESAT6-dIFN-антигена не отличалась по стимуляции клеточного иммунитета от эффективности, наблюдаемой при инъекциях соответствующего рекомбинантного химерного белка. Это особенно важно, поскольку именно Th1-тип иммунного ответа играет ведущую роль в противостоянии организма заражению *M. tuberculosis* (Permyakova et al., 2014). Полученный нами химерный белок CFP10-ESAT6-dIFN безусловно представляет интерес в качестве кандидатной вакцины и нуждается в дальнейших дополнительных исследованиях.

Литература

1. Uvarova E.A. et al., "Oral Immunogenicity of Plant-Made Mycobacterium tuberculosis ESAT6 and CFP10," BioMed Research International, vol. 2013, Article ID 316304, 8 pages, 2013. doi:10.1155/2013/316304.
2. Permyakova N.V. et al., "Oral immunization of animals with the transgenic carrot expressing the fusion protein CFP10-ESAT6-dIFN", Plant Biotechnology, 2014 (*in press*).

TRANSGENIC PLANTS - BIOREACTORS SUBUNIT CANDIDATE EDIBLE VACCINES

Deineko E.V.

Mycobacterium tuberculosis, transgenic plants, edible vaccine expression system, the recombinant proteins

While tuberculosis has quite high lethal rate, the BCG still remains the only antituberculosis vaccine, though it has a number of serious disadvantages. So, the absence of any alternative means for immune prophylactics makes necessary the development of new candidate antituberculosis vaccines. Thus, the development of subunit vaccines based on recombinant antigens combined with cytokines and the optimization of antigens delivery methods.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ НА ГЕНОМ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO* КЛЕТОК *ARABIDOPSIS*

Долгих Ю.И., Седов К.А., Соловьева А.И., Терешонок Д.В.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, 127276, г. Москва, Россия, E-mail: gsc@ippras.ru

Arabidopsis thaliana, культура тканей, генетическая изменчивость**Введение**

Изоляция экспланта и введение его в культуру *in vitro* является серьезным стрессовым фактором для клеток растений. Дополнительные негативные воздействия усугубляют состояние стресса. Известно, что неблагоприятные внешние факторы нарушают работу репарационных механизмов, вызывают изменение характера метилирования ДНК, модификации гистонов, амплификации и деамплификации участков генома [1]. Эти эпигенетические нарушения потенциально способны индуцировать генетические изменения [2]. Однако конкретных данных о возникновении мутаций под действием стрессов очень мало [3,4]. Целью данной работы было исследование влияния ионов меди в токсичных концентрациях на геном культивируемых клеток *Arabidopsis thaliana*.

Материалы и методы

Исследования проводили на двух клеточных линиях, полученных из тканей растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотип Columbia. Одной из них была каллусная линия, культивируемая в течение полугода, а второй – суспензионная культура, поддерживаемая *in vitro* более семи лет. Для анализа генетической вариабельности клеток из суспензии были выделены отдельные клоны. Клетки обеих линий культивировали на среде МС с 1 мг/л 2,4-Д, 0,15 мг/л БАП и 30 г/л сахарозы при температуре 26°C на свету интенсивностью 2 кЛк при длине светового дня 16 ч.

ДНК выделяли по методике СТАВ [4]. Уровень генетической изменчивости оценивали по вариабельности фрагментов ДНК, амплифицированных с RAPD и ISSR праймерами. Для определения уровня генетической изменчивости сравнивали спектры ампликонов исходных растений и каллусных линий, а также анализировали различия между отдельными пробами каллуса или клонами, полученными из суспензии.

Сульфат меди $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ добавляли в питательную среду в концентрациях 0,3-1,0 мМ до автоклавирования. Каллус, разделенный на инкулюмы массой 40 мг, инкубировали на средах с сульфатом меди в течение месяца, рост оценивали по увеличению сырой массы ткани. После месячного культивирования каллуса на среде с токсикантом, из тканей выделяли ДНК и проводили ПЦР-анализ.

Результаты

В каллусной ткани, культивируемой шесть месяцев на стандартной среде, ни с одним из праймеров или комбинаций праймеров не удалось обнаружить отличия спектров ампликонов от исходного растения, из которого была получена культура.

Для изучения влияния длительного культивирования на стабильность ДНК было проанализировано 10 клонов, полученных из суспензии клеток. При проведении ПЦР-анализа с одиночными RAPD- и ISSR-праймерами не было обнаружено различий между геномами анализируемых клонов и геномом растений *Arabidopsis*. Использование попарных комбинаций праймеров, обеспечившее увеличение количества ампликонов до 195, позволило найти изменения в спектрах фрагментов, полученных с четырьмя парами праймеров. В целом степень различия между суспензионными клонами и растениями *A. thaliana* оказалась очень низкой и составила 1.5%. Таким образом, по нашим данным для клеток *A. thaliana* характерен

относительно низкий уровень генетической изменчивости при культивировании *in vitro* в стандартных условиях.

Для изучения влияния токсиканта на геном клеток *A.thaliana* каллусы инкубировали на среде с 0,5 мм сульфата меди. В этой концентрации ионы меди ингибировали рост каллуса на 50%. После инкубации клеток на среде с медью полиморфизм амплифицированных фрагментов ДНК, выявленный ранее при культивировании на стандартной среде, не был обнаружен. Вероятно, под действием стрессора часть клеток, несущих мутации, погибла. Вместе с тем появились новые ампликоны, ранее не встречавшиеся ни в каллусных линиях, ни в исходных растениях. Доля таких вновь возникших полиморфных фрагментов не превышала 1%.

Заключение

Согласно полученным результатам, под влиянием культивирования в присутствии ионов меди происходит, вероятно, два процесса: с одной стороны возникают новые изменения, а с другой стороны – элиминируются из культуры клетки с определенными изменениями генома, то есть происходит отбор наиболее устойчивых к стрессу генотипов. Оба процесса имеют низкую вероятность, почти не нарушая стабильность генома.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-00950

Литература

1. Madlung A., Comai L. The effect of stress on genome regulation and structure // Ann.Bot., - 2004. - V.94. - P.481-495.
2. Wessler S.R. Plant retrotransposons: Turned by stress // Current Biol., - 1996. – V.6. – P.959-961.
3. Yao Y., Kovalchuk I. Abiotic stress leads to somatic and heritable changes in homologous recombination frequency, point mutation frequency and microsatellite stability in Arabidopsis plants // Mut. Res., - 2011. – P.61-66.
4. Moller E.M., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H.H. A Simple and Efficient Protocol for Isolation of High Molecular Weight DNA from Filamentous Fungi, Fruit Bodies, and Infected Plant Tissues // Nucleic Acids Res., - 1992. - V. 20. - P. 6115-6116.

EFFECT OF COPPER ON THE GENOME OF CULTIVATED *IN VITRO* CELLS OF *ARABIDOPSIS*

Dolgikh Yu.I., Sedov K.A., Solov'yova A.I., Tereshonok D.V.

Arabidopsis thaliana, tissue culture, genetic variability

According to PCR analysis with RAPD and ISSR primers prolonged cell culturing *Arabidopsis thaliana in vitro* induced genetic variation at a frequency 1.5%. After incubation of calli on a medium containing copper sulfate the elimination of the previously identified mutations and simultaneously the emergence of new DNA changes were detected.

СОДЕРЖАНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ, АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ЛИСТЬЯХ ЯЧМЕНЯ ПРИ ОБРАБОТКЕ САЛИЦИЛАТАМИ

Евдокимова О.В., Кабашникова Л.Ф., Савченко Г.Е.

ГНУ Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Беларусь, E-mail: ewdokimova@inbox.ru

ячмень, салициловая кислота, АФК, продукты ПОЛ

Введение

Повышение общей неспецифической устойчивости растений путем индукции природных защитных механизмов является важным и активно разрабатываемым направлением в растениеводстве. Особый интерес в качестве индуктора представляет *орто*-гидроксibenзойная (салициловая) кислота (СК), являющаяся промежуточным продуктом реакций защитного ответа. Представлено большое количество работ, в которых оценивалось действие экзогенной СК на устойчивость к неблагоприятным факторам биотической и абиотической природы [1]. Интересно, что протекторный эффект отмечен и для структурных аналогов СК – бензойной, сульфосалициловой и метилсалициловой кислот [2]. Однако сведений об изменении содержания эндогенной СК в растениях, обработанных салицилатами, пока недостаточно. Учитывая способность природных фенольных соединений проявлять рострегулирующую активность и влиять на многие ферменты [3], в том числе проантиоксидантные, целесообразно оценить влияние экзогенной СК на эндогенный пул салицилатов и окислительный статус растений.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись 6-дневные проростки ячменя *Hordeum vulgare* L сорта Магутны, выращенные при температуре +23°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) в режиме 14/10 ч. В работе использовали растворы СК, 3,5-динитросалициловой кислоты и фенилсалицилата (10^{-5} М), эмульсию этилсалицилата (10^{-5} М). Семена проращивали на водопроводной воде, в возрасте 3-х дней проростки опрыскивали 4 мл растворов или дистиллированной воды (контроль) с помощью пульверизатора. Содержание СК в проростках оценивали на 6-е сут. после высевания семян. Анализировали часть листовой пластинки, расположенную ниже 1 см от верхушки. Экстракцию проводили последовательно 70- и 90%-ным этанолом, супернатанты двух экстракций объединяли. Спирт испаряли под вакуумом, сконцентрированные экстракты гидролизировали 4н HCl в течение 60 мин при температуре 80°C. Салицилаты извлекали двукратной экстракцией смесью этилацетат:циклогексан (1:1). Органические растворители испаряли, салицилаты смывали 0,5 мл подвижной фазы (25%-й метанол + 75%-й ацетатный буфер, pH 5,5). Изократное разделение СК проводили на хроматографе Shimadzu LC 20 Prominence (Shimadzu, Япония) на колонке EC 250/3 Nucleodur Hilik, 5 μm (Macherey-Nagel, Германия) при скорости потока 0,5 мл/мин. Выход СК регистрировали с помощью флуоресцентного детектора.

Общее содержание активных форм кислорода (АФК) оценивали с помощью спектрофлуориметра Solar CM 2203 (Беларусь) по окислению 2',7'-дихлорфлуоресцеина диацетата экстрактом листьев, содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – по количеству ТБК-активных продуктов в ткани листьев.

Результаты и обсуждение

Обработка 3-дневных проростков раствором 3,5-динитросалициловой кислоты не изменяла общего содержания СК в листьях по сравнению с контролем (рис. 1). Действие экзогенной СК и фенилсалицилата приводило к возрастанию общего пула СК в листьях на 23% и 34%, соответственно. При обработке этилсалицилатом наблюдали значительное возрастание

эндогенного уровня СК в листьях (в 4,6 раз). Т.о., степень повышения содержания эндогенной СК при действии одинаковой концентрации разных производных СК значительно отличалась.

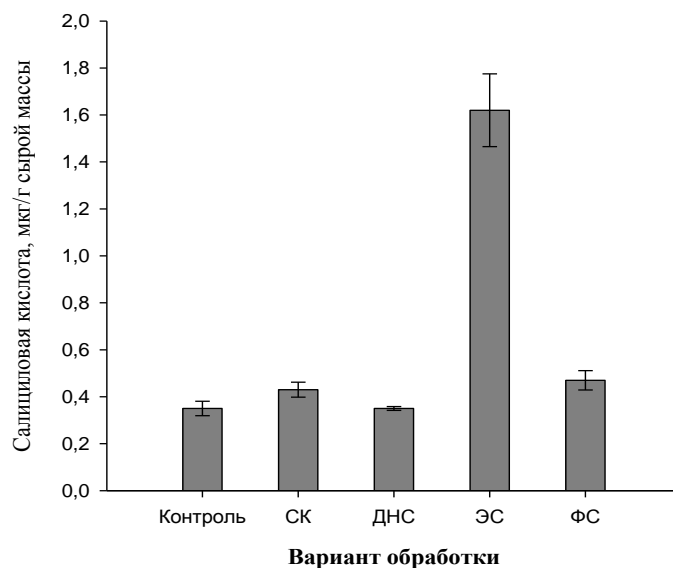


Рисунок 1 - Влияние обработки салициловой кислотой (СК) и ее производными на содержание СК в листьях 6-дневных проростков ячменя. (ДНС - 3,5-динитросалициловая кислота, ЭС - этилсалицилат, ФС – фенолсалицилат).

Figure 1 - Effect of treatment with salicylic acid (SA) and its derivatives on total SA content in 6-day-old barley seedlings. (DNS -3,5- dinitrosalicylic acid, ES – ethyl salicylate, PhS – phenyl salicylate).

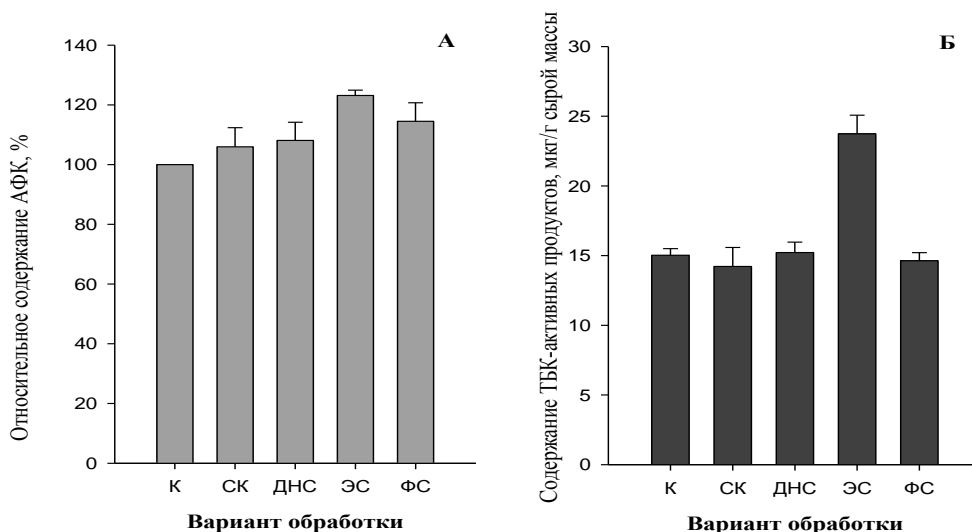


Рисунок 2 - Влияние обработки салициловой кислотой (СК) и ее производными на содержание АФК и продуктов ПОЛ в листьях 6-дневных проростков ячменя. (ДНС - 3,5-динитросалициловая кислота, ЭС - этилсалицилат, ФС – фенолсалицилат).

Figure 2 - Effect of treatment with salicylic acid (SA) and its derivatives on ROS and TBARS content in 6-day-old barley seedlings. (DNS -3,5- dinitrosalicylic acid, ES – ethyl salicylate, PhS – phenyl salicylate).

Возможно, одной из причин этих отличий является разная скорость метаболизма экзогенных салицилатов. Следует отметить, что, несмотря на повышение эндогенного пула СК в ткани листьев, особенно в варианте с этилсалицилатом, морфометрические показатели обработанных проростков не отличались от контроля (данные не представлены).

Известно, что эффекты СК в значительной степени связаны с ее способностью увеличивать содержание АФК. Анализ общего содержания АФК в ткани листа показал, что действие салицилатов привело к его возрастанию во всех вариантах (рис.2, А), но наиболее существенное повышение уровня АФК наблюдали при обработке этилсалицилатом. В листьях этого варианта регистрировали и значительное возрастание содержания продуктов ПОЛ (на 58%) (рис. 2, Б), не обнаруживаемое в других вариантах опыта. Полученные данные свидетельствуют о наличии окислительного стресса в проростках данного варианта, вызванного, скорее всего, значительным повышением содержания эндогенной СК.

Заключение

Внесение СК, 3,5-динитросалициловой кислоты, этилсалицилата или фенолсалицилата (10^{-5}) вызывало разное по величине повышение пула эндогенной СК в листьях ячменя. Значительное возрастание содержания СК при действии этилсалицилата сопровождалось генерацией АФК и существенной активацией процессов перекисного окисления липидов. Таким образом, при использовании экзогенных салицилатов, важно достичь концентрационного порога эндогенной СК, необходимого для активации систем защиты, но при этом не превысить концентрации СК, обеспечивающей нормальное функционирование растения.

Литература

1. Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В. Салициловая кислота и устойчивость растений к абиотическим стрессорам // Вестник Харьковского Национального Аграрного университета. Серия биология. 2009. Т. 2, № 17. С. 19-39.
2. Senaratna T., Merritt D., Dixon K. et al. Benzoic acid may act as the functional group in salicylic acid and derivatives in the induction of multiple stress tolerance in plants // Plant Growth Regul. 2003. V. 39, № 1. P. 77-81.
3. Вольнец А.П., Пальченко Л.А. // Метаболизм и механизм действия фитогормонов. Иркутск, 1979. С. 132 – 134.

SALICYLIC ACID CONTENT, REACTIVE OXIGEN SPECIES AND LIPID PEROXIDATION PRODUCTS IN BARLEY SEEDLINGS UNDER TREATMENT WITH SALICYLATES

Evdokimova O.V., Kabshnikova L.F., Savchenko G.E.

Treatment of barley seedlings with exogenous salicylic acid (SA) and its derivatives (10^{-5} M) leads to change of an endogenous salicylates pool in leaves in different extent. Under the influence of exogenous SA and phenyl salicylate there was moderate increase of the total content of endogenous SA. Ethyl salicylate raises endogenous SA pool in leaves more than four times. Moreover this solution leads significant increase of reactive oxygen species (ROS) accumulation and activation lipid peroxidation in leaves.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА В УСЛОВИЯХ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ НЕДОСТАТКА ВЛАГИ, УМЕРЕННОГО ОХЛАЖДЕНИЯ И ОБРАБОТКИ ПРЕПАРАТОМ МЕЛАФЕН

Жигачева И.В.¹, Генерозова И.П.², Бинюков В.И.¹, Миль Е.М.¹, Албантова А.А.¹

¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия, E-mail: zhigacheva@mail.ru

²ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, 127276, г. Москва, Россия, E-mail: igenerozova@mail.ru

митохондрии, атомно-силовая микроскопия, перекисное окисление липидов, регуляторы роста растений

Энергетический обмен играет важную роль в адаптивных реакциях организма. При этом митохондриям отводится ключевая роль в энергетических, окислительно-восстановительных и метаболических процессах в клетке. В клетках животных и дрожжей эти органеллы объединены в разветвленную сеть, именуемую "митохондриальным ретикулумом" [1]. У высших растений митохондрии одиночны и имеют либо сферическую, либо цилиндрическую форму [2]. В условиях стресса (тепловой шок, гипоксия, УФ-облучение, или при воздействии сильных окислителей), митохондрии образуют плотные кластеры, группирующиеся вокруг хлоропластов или в других областях цитозоля. Формирование «гигантских митохондрий» сопровождается увеличением генерации АФК. Антиоксиданты предотвращают как образование «гигантских митохондрий», так и рост генерации АФК этими органеллами [3]. Стандартная процедура выделения митохондрий в растворе сахарозы приводит к полному разрушению межмитохондриальных контактов. По этой причине, митохондрии представлены в виде отдельных пузырьков, размер которых 0.86–1.18 мкм в диаметре и 0,3–0,4 мкм в высоту. При этом морфология изолированных митохондрий, возможно, отражает их функциональное состояние.

Известно, что регуляторы роста и развития растений повышают устойчивость растений, как к биотическому, так и к абиотическому стрессу, в том числе и к водному дефициту. Одним из таких регуляторов роста растений является мелафен, повышающий устойчивость растений к стрессовым воздействиям в концентрациях 10^{-10} М - 10^{-9} М. В нашей работе мы исследовали совместное влияние дефицита влаги, умеренного охлаждения до 10–14° С, и обработки семян гороха регулятором роста растений мелафеном (меламиновой солью бис (гидроксиметил) фосфиновой кислоты) на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и АСМ имиджи изолированных митохондрий 5 дневных проростков гороха (*Pisum sativum*).

Материалы и методы

Семена гороха (*Pisum sativum* L.), сорт Альфа замачивали в течение 60 мин либо в воде, либо в 2×10^{-12} М растворе мелафена. Спустя 2-ое сут. половину проростков, обработанных мелафеном, переносили на сухую фильтровальную бумагу в открытые кюветы, где они находились при 14°С в течение двух суток. Вторая половина семян, обработанных мелафеном, и половина контрольных семян в течение этого же времени находилась в закрытых кюветках с периодически увлажняемой фильтровальной бумагой при 14°С. Через двое сут. все проростки переносили в помещение с температурой воздуха 22° С и помещали в закрытые кюветы с периодически увлажняемой бумагой. Контрольная группа проростков в течение всего эксперимента находилась при температуре 22°С.

Выделение митохондрий из 5-дневных эпикотилей проростков гороха проводили по методу [4] в нашей модификации.

Образцы митохондрий для АСМ готовили на полированной силиконовой подложке. Промытые буфером без БСА митохондрии на подложке фиксировали 2% глутаровым альде-

гидом в течение 2 мин с последующей промывкой водой и воздушной сушкой. Исследование проводили на приборе SOLVER P47 SMENA на частоте 150кГц в полуконтактном режиме. Использовался кантилевер NSG11 с радиусом кривизны 10нм. Геометрические параметры имиджа митохондрий определяли, используя “Image Analysis” и “Statistica 6”. Сечение производили на высоте 30 нм. В каждой выборке более 80 имиджей.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [5]. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvon GmbH (Германия). Результаты выражали в условных единицах флуоресценции пересчитанных на мг белка.

Результаты и обсуждение

Сочетанное действие недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения приводило к существенному изменению АСМ имиджей митохондрий проростков гороха. Статистический анализ длины и объема предварительно фиксированных, глутаровым альдегидом препаратов митохондрий, выделенных из группы проростков, подвергшихся стрессовому воздействию, свидетельствует о появлении одиночных, не делящихся митохондрий большего объема и длины, чем митохондрии, выделенные из контрольной группы. Аналогичные данные были получены Logan D. C и Scott I. при обработке листьев *Arabidopsis thaliana* метилвиологеном [3]. Сопоставляя литературные данные с данными, полученными в нашем эксперименте, можно предположить, что сочетанное действие умеренного охлаждения и недостаточного увлажнения приводило к набуханию митохондрий с последующим увеличением генерации АФК [6]. Действительно, в мембранах митохондрий этой группы проростков наблюдалась активация ПОЛ. При этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий возрастала в 2,5 - 3 раза. Замачивание семян в 2×10^{-12} М растворе мелафена приводила к снижению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ почти до контрольного уровня. Такая обработка предотвращала изменения морфологии митохондрий. Размеры митохондрий были сопоставимы с контрольными. При этом происходило увеличение числа делящихся митохондрий, как это наблюдалось в контроле. Снижение интенсивности ПОЛ, а, следовательно, и сохранение морфологических характеристик митохондрий проростков гороха, вероятно, связано с антирадикальными свойствами препарата, поскольку эффективная константа скорости (k_7) взаимодействия мелафена с пероксильными радикалами довольно высока и составляет $1,64 \times 10^6 (\text{Mc})^{-1}$.

Выводы

Методом атомно-силой микроскопии (АСМ) обнаружено статистически достоверное изменение формы митохондрий - набухание и уменьшение числа делящихся митохондрий при сочетанном действии недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения. Препарат мелафен в концентрации 2×10^{-12} М предотвращал морфологические изменения митохондрий и восстанавливал их способность к делению. Предполагается, что протекторные свойства препарата обусловлены его антиоксидантными свойствами.

Литература

1. Bakeeva L.E., Yu.S Chentsov, V.P. Skulachev. Mitochondrial framework in rat diaphragm muscle//. *Biochim. et biophys. Acta.* 1978, **501**(3), 349–369(4)
2. Logan D.C, C.J. Leaver C.J. Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells//. *J. Exp. Bot* 2000, **51**, 865-871(5)
3. Scott I., D.C Logan, Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in *Arabidopsis*// *New Phytologist* 2008, **177**, 90–101 (6, 11)
4. Попов, В.Н, Э.К Руге, А.А. Старков. Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха// *Биохимия* 2003, **68**(7), 910–916 (9)
5. Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. Measurement of Fluorescent Lipid Peroxidation Products in Biological Systems and Tissues // *Ann. Biochem.* 1973, **52**, 1–9.(10)

6. Zhang L., Li. Yinshu, Da-Xing, Caiji Gao, Characterization of mitochondrial dynamics and subcellular localization of ROS reveal that HsfA2 alleviates oxidative damage caused by heat stress in *Arabidopsis*// Journal of Experimental Botany 2009, **60**,2073–2091(7)

MITOCHONDRIAL MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PEA SEEDLINGS UNDER COMBINED ACTION MOISTURE DEFICIT, MODERATE COOLING, AND MELAPHEN

Zhigacheva I.V., Generozova I.P., Binyukov V.I., Mil' E.M., Albantova A.A.

mitochondria, atomic force microscopy, lipid peroxidation, plant growth regulators

In our work, we investigated the effects of combined action of insufficient moisture with moderate cooling to 10-14 ° C, and melamine salt of bis(oxymethyl)-phosphonic acid (melaphen) on the AFM images of isolated mitochondria 5 day-old seedlings of pea (*Pisum sativum*). These stress actions lead to a significant increase in volume (swelling) of mitochondria and decreasing mitochondrial division compared with mitochondria isolated from the control group. 2×10^{-12} M melaphen prevented mitochondrial swelling and retain their ability to divide.

ОБРАЗОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРОРОСТКАХ ДИПЛОИДНОГО И ТЕТРАПЛОИДНОГО СОРТОВ ГРЕЧИХИ (*FAGOPYRUM ESCULENTUM* L.)

Казанцева В.В.¹, Фесенко А.Н.², Загоскина Н.В.¹

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, 127276, г. Москва, Россия, E-mail: .k.v.-90@mail.ru

²ГНУ ВНИИ зернобобовых и крупяных культур РАСХН, ул. Молодежная, 10, корп.1, Стрелецкий пос. Орловского р-на Орловской обл., Россия

Fagopyrum esculentum L., гречиха, проростки, фенольные соединения, накопление

Введение

Фенольные соединения являются одними из наиболее распространенных в высших растениях вторичных метаболитов [1]. В большинстве случаев в надземных органах их накопление выше, а состав разнообразнее, по сравнению с подземными, что может быть следствием формирования в зеленых тканях растений – хлоропластов, являющихся одним из важнейших мест биосинтеза флавоноидов [1, 2]. Следует также отметить, что растения значительно отличаются по содержанию полифенолов. И в этом случае большой интерес вызывают представители рода *Fagopyrum*, широко культивируемые во многих странах мира [3,4]. В частности, *F. esculentum* L. является одной из важнейших крупяных и медоносных культур России, которая помимо пищевой ценности, широко применяется в народной медицине и фармакологии [5]. Именно из ее листьев получают препарат рутин (3-О-рутинозид кверцетина), обладающий антиоксидантными, ангиопротекторными, антибактериальными и гепатопротекторными свойствами [6].

В ряде литературных источников отмечалась взаимосвязь между уровнем ploидности растительных тканей и их способностью к образованию различных классов фенольных соединений [7, 8]. Однако до сих пор этот вопрос является дискуссионным.

Целью исследования являлось изучение особенностей образования флавоноидов в проростках сортов гречихи, отличающихся уровнем ploидности.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись два сорта гречихи (*F. esculentum* L.): диплоидный – Девятка и тетраплоидный – Большевик 4. Сорт Девятка являлся среднеспелым, детерминантным ограниченноветвящимся, высоко урожайным, устойчивым к полеганию [9]. Сорт Большевик 4 среднеспелый, обладает высокой урожайностью, устойчивостью к полеганию [10]. Проростки выращивали рулонным способом при 24°C и 16-час. фотопериоде в камере фитотрона ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ РАН.

Фенольные соединения извлекали из листьев проростков 6-, 11- и 19-дневного возраста 96%-ным этанолом. В экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание фенилпропаноидов и флавоноидов [11, 12].

Результаты и обсуждение

Основными компонентами фенольного комплекса листьев растений являются флавоноиды, к числу которых относится и характерный для гречихи рутин [1, 6]. В молодых проростках обоих сортов гречихи уровень накопления этих вторичных метаболитов был невысок и практически одинаков (рис. 1). К 11 дню он повышался на 35% и 53% у сортов Девятка и Большевик 4, соответственно. К 19 дню выращивания, когда уже отмечалось старение семядольных листьев, дальнейших изменений в накоплении флавоноидов не наблюдалось. Исходя из полученных данных можно заключить о незначительных отличиях в накоплении этих наиболее характерных для листьев высших растений соединений фенольной природы, а именно флавоноидов, у диплоидного и тетраплоидного сортов гречихи.

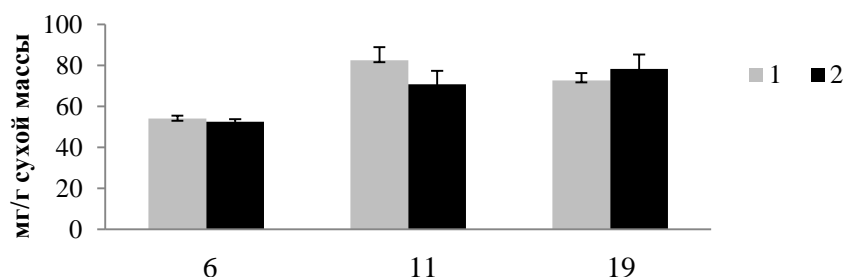


Рисунок 1 - Изменения содержания флавоноидов в листьях проростков *F. esculentum* L. сортов Большевик 4 (1) и Девятка (2) по мере их роста

Figure 1 - Changes in the content of flavonoids in the leaves of *F. esculentum* L. varieties Bolshhevik 4 (1) and Deviatka (2) as they grow

Еще одним классом фенольных соединений, образующихся в высших растениях, являются фенилпропаноиды [1]. В большинстве случаев они не накапливаются в клетках, а служат предшественниками для биосинтеза других полифенолов [13].

Как следует из полученных нами данных, на начальных этапах роста проростков количество фенилпропаноидов в листьях исследованных сортов гречихи было самым низким и практически одинаковым (рис. 2).

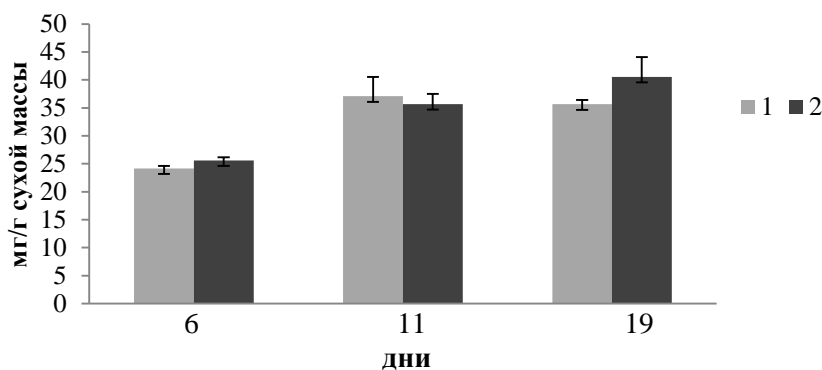


Рисунок 2 - Изменения содержания фенилпропаноидов в листьях *F. esculentum* L. сортов Большевик 4 (1) и Девятка (2) по мере их роста

Figure 2 - Changes in the content of phenylpropanoids in leaves of *F. esculentum* L. varieties Bolshhevik 4 (1) and Deviatka (2) as they grow

К 11 дню роста оно увеличилось (на 53,5% и 39,4%, соответственно для сорта Большевик 4 и Девятка), а к 19 дню сохранялось на том же уровне в листьях тетраплоидного сорта, тогда как у диплоидного – еще незначительно возрастало.

Таким образом, у тетраплоидного сорта гречихи накопление различных классов фенольных соединений достигало наибольших значений на более ранних фазах роста проростков, по сравнению с диплоидным сортом.

Литература

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 271 с.
2. Запрометов М.Н., Николаева Т.Н. Способность изолированных хлоропластов из листьев фасоли осуществлять биосинтез фенольных соединений // Физиология растений. 2003. Т. 50. С. 699-702.
3. Li S.Q., Zhang Q.H. Advances in the development of functional foods from buckwheat // Crit Rev. Food Sci. Nutr. 2001.V. 41. P. 451-64.

4. Зотиков В.И., Глазова З.И., Борзенкова Г.А., Новиков В.М., Мартыненко Г.Е., Хлебников А.И., Юрлова Е.В. Ресурсосберегающая технология производства гречихи: методические рекомендации. Орел: ГНУ ВНИИЗБК. 2009. 40 с.
5. Якименко А.Ф. Гречиха. М.: Колос, 1982. 196 с.
6. Куркин В.А. Фармакогнозия. Самара: ООО «Офорт». 2007. 900 с.
7. Загоскина Н.В., Федосеева В.Г., Запрометов М.Н. Уровень пloidности каллусных культур чайного растения и образование фенольных соединений // Физиология растений. 1997. Т. 44. С. 931-934.
8. Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A color model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology // Plant Physiol. 2001. V. 126. P. 485–493.
9. Мартыненко Г.Е., Фесенко Н.В., Фесенко А.Н. Создание холодостойкого детерминантного сорта гречихи Девятка // Вестник ОрелГАУ. 2010. Т. 4. С. 85-87.
10. Кадырова Ф.З., Кадырова Л.Р., Шигапова Л.Х., Хуснутдинова А.Т. Морфологические особенности, нектарная и семенная продуктивность тетраплоидных сортов гречихи // Вестник Казанского государственного аграрного университета. 2013. Т.28. № 2. С. 120-122.
11. Ларькина М.С., Кадырова Т.В., Ермилова Е.В. Изучение динамики накопления фенолкарбоновых кислот в надземной части василька шероховатого // Химия растительного сырья. 2008. №3. С. 71–74.
12. Загоскина Н.В., Олениченко Н.А., Чжоу Юньвэй, Живухина Е.А. Способность различных сортов пшеницы к образованию фенольных соединений // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. С. 113-116.
13. Santiago R., Butron A, Arnason J.T., Reid L.M., Souto X.C., Malvar R.A. Putative role of pith cell wall phenylpropanoids in *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance // J. Agr. Food Chem. 2006. V. 54. P. 2274–2279.

FORMATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN DIPLOID AND TETRAPLOID SEEDLINGS BUCKWHEAT VARIETIES (*FAGOPYRUM ESCULENTUM* L.)

Kazantseva V.V., Fesenko A.N., Zagoskina N.V.

Fagopyrum esculentum L., buckwheat, seedlings, phenolic compounds, accumulation

Studied the formation of phenylpropanoids and flavonoids in the leaves of seedlings diploid buckwheat, different levels of ploidy (2n and 4n). Found that the greatest amount of polyphenols was on the 11-th day of growth of tetraploid varieties, whereas the diploid varieties – later.

ГНУ Дагестанская селекционная опытная станция виноградарства и овощеводства,
ул. Вавилова, 9, г. Дербент, 368601, Россия, E-mail: dsosvio@mail.ru; kre_05@mail.ru

виноград, семяпочка, околоплодник, интенсивность роста, бессемянность, регуляторы роста, сахаронакопление

Поиск критериев прогнозирования эффективности применения регуляторов роста, в частности, гиббереллина, был актуальным с первых лет исследований влияния гормонов на семенные сорта винограда. Однако в настоящее время нет универсальных критериев, позволяющих с высокой достоверностью оценивать и прогнозировать реакцию и целесообразность применения регуляторов роста на семенных сортах. Особенно этот вопрос встает в связи с выявлением нами большей эффективности совместного применения регуляторов роста различных групп. Мы считаем, что генетическая предрасположенность семенных сортов к преимущественному развитию околоплодника или семяпочек и вытекающие из этого явления морфофизиологические проявления в развитии элементов завязи могут быть основой достоверных критериев прогнозирования реакции семенных сортов на обработку регуляторами роста. Исследования показали, что различная склонность к преимущественному росту того или иного элемента ягоды может быть диагностирована уже на начальных этапах развития семян и околоплодника по величине интенсивности их роста и данный показатель может быть использован в качестве критерия прогнозирования целесообразности и эффективности обработки семенного сорта в практических целях. По результатам наших исследований мы предлагаем модели применения регуляторов роста на семенных сортах винограда с различными биологическими особенностями (табл.1).

Таблица 1 - Модели применения регуляторов роста на винограде

Table 1 - Model of the use of growth regulators on the vine

Группа сортов	Биологические особенности	Развитие элементов завязи	Практические рекомендации
I	Функциональная партенокарпия и стеноспермокарпия, преимущественный рост околоплодника	Высокая интенсивность роста околоплодника, низкая интенсивность роста семяпочек	Индукция стеноспермокарпии, получение бессемянных ягод, повышение сахаронакопления, обработки на этапе постоплодотворения
II	Функциональная стеноспермокарпия	Средняя интенсивность роста семяпочек и околоплодника	Индукция стеноспермокарпии и феноспермии, обработки на этапе постоплодотворения
III	Функциональная феноспермия, преимущественный рост семяпочек	Низкая интенсивность роста околоплодника, высокая интенсивность роста семяпочек	Индукция феноспермии, повышение сахаронакопления, обработки на этапе начало эмбриогенеза

Установлено, что тип функциональной бессемянности и особенности роста семяпочек (семян) и околоплодника на ранних стадиях развития могут служить критериями прогнозирования эффективности и целесообразности применения регуляторов роста на семенных сортах винограда с обоеполым типом цветка.

Результаты практического применения регуляторов роста в полевых условиях подтвердили обоснованность предложенной модели и экономическую целесообразность, эффективность и перспективность применения экзогенных фитогормонов для решения прикладных задач в виноградарстве Южного Дагестана.

Применение регуляторов роста на сорте Мускат гамбургский (1 группа) подтвердило нашу гипотезу о целесообразности индукции стenosпермокарпии у данного сорта (табл. 2).

Таблица 2 - Увологические показатели сорта Мускат Гамбургский
Table 2 - Viticultural indicators of a grade the Muskat Hamburg

Вариант	Количество ягод, шт.				Масса 100 ягод, г	Массовая кон- центрация саха- ров, г /дм ³
	семен- ные	пусто- семянные	бессе- мянные	недораз- витые		
Опыт	0	0	102	10	532	208
Контроль	84	0	5	8	544	154
НСР ₀₅	-	-	-	-	28	8

У данного сорта достигалась полная бессемянность грозди, повышение количества ягод в грозди с сохранением их массы. Более того, удалось избежать у данного сорта одревеснения гребня. Отличительной особенностью также явилось значительное повышение содержания сахаров, в данном случае, в бессемянных ягодах (на 50 и более г/дм³) и ускорение созревания урожая на 15 – 20 дней. Индукция стenosпермокарпии оказалась успешной и у сорта Супер ран Болгар (2 группа), однако, повышение массовой концентрации сахаров у данного сорта в бессемянных ягодах было незначительным (табл. 3).

Таблица 3 - Увологические показатели сорта Супер ран Болгар
Table 3 - Viticultural indicators varieties Super Bulgarians RAS

Вариант	Количество ягод в грозди, шт.				Масса 100 ягод, г	Массовая концен- трация сахаров, г /дм ³
	семен- ные	пустосе- мянные	бессе- мянные	недораз- витые		
Опыт	0	0	68	3	476	161
Контроль	56	0	4	12	484	143
НСР ₀₅	-	-	-	-	37	-

У сортов 3 группы, в данном случае, Каберне-Совиньон, целесообразна индукция феноспермии обработкой на этапе начало эмбриогенеза (10 – 12 дней после опыления) (табл. 4).

Таблица 4 - Увологические показатели сорта Каберне-Совиньон
Table 4 - Viticultural indicators of Cabernet Sauvignon

Вариант	Количество ягод в грозди, шт.				Масса 100 ягод, г	Массовая концен- трация сахаров, г /дм ³
	семенные	пустосе- мянные	бессе- мянные	недораз- витые		
Опыт	3	84	8	5	121,4	234
Контроль	88	0	0	5	124,5	184
НСР ₀₅	-	-	-	-	14,3	-

За счет формирования феноспермических (пустосемянных) ягод, в которых формируются семена, морфологически не отличающиеся от нормальных, ввиду гибели зародыша на поздних этапах развития семян, достигается повышение массовой концентрации сахаров в

ягодах на 40 – 50 г/дм³ без снижения показателей урожайности. Учитывая, что в данную группу входят сорта технического направления, индукция феноспермии у этих сортов может быть перспективной в зонах низкого сахаронакопления и в годы, с неблагоприятными условиями для сахаронакопления.

MODELS OF USE OF REGULATORS OF GROWTH IN WINE GROWING

Kazakhmedov R.E.

grapes, semyapochka, okoloplodnik, intensity of growth, bessemyannost, regulators of growth, saharonakoplenie

On the basis of an experimental material practical recommendations about effective use of regulators of growth depending on biological features of seed grades of grapes are offered

ВЛИЯНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ГОРМОНАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ НА ВСХОЖЕСТЬ СЕМЯН СТАРОЙ РЕПРОДУКЦИИ РАСТЕНИЙ РОДА *BRASSICA*

Казахмедов Р.Э., Гаджимустапаева Е.Г., Пулатова К.Д.

ГНУ Дагестанская селекционная опытная станция виноградарства и овощеводства, ул. Вавилова, 9, г. Дербент, 368601, Россия, E-mail: dsosvio@mail.ru; kre_05@mail.ru

виды и сорта капусты, физиологически активные соединения, всхожесть семян

Широкое распространение капусты и ее видов в разных регионах мира – результат ее экологической пластичности, способности переносить действие биотических и абиотических условий среды. Капустные культуры в мировом и российском овощеводстве занимают важное место. В Республике Дагестан капусту и ее виды выращивают повсеместно и используют в пищу в большом количестве, чем другие овощи, особенно в зимний период. Важное значение в сохранении генетических ресурсов растений в т.ч. и овощных культур, а также для селекционной работы имеют исследования, направленные на поиск методов и способов повышения жизнеспособности семян. Эффективным средством решения проблемы могут служить физиологически активные соединения.

Цель исследований – изучить влияние физиологически активных соединений (ФАС) на прорастание семян старой репродукции овощных культур.

Материалы и методы

Опыты были проведены на базе ДСОСВиО и Дагестанской ОС ВИР. Объектом исследований служили семена капусты старой репродукции - 2006-2013гг. Изучались 4 сортаобразца белокочанной капусты селекции ДСОСВиО, 13 - цветной, 3 - азиатских видов, 1- декоративной капусты из коллекции ВИРа. Семена проращивали в чашках Петри, при температуре +18-19°C – первые 3 сут. от закладки опыта и с 4 сут. повышали до 23-24°C. Опыт снимали утром на 8 сутки. Было использовано три физиологически активных соединения, синтетические аналоги эндогенных фитогормонов, обозначены как №№ 1, 2, 3. Семена старой репродукции замачивали в *препаратах* ФАС в различных концентрациях и *экспозиции* – 2; 4 и 8 часов. Далее, по истечении времени экспозиции, отжатые и слегка подсушенные образцы семян раскладывали в чашки Петри и переносили в шкаф для проращивания. Контролем для каждой экспозиции и сортаобразца была вода. Учет вели по количеству всхожих семян и длине проростка, при этом учитывали длину черешка и корешка в контроле и в опытном варианте. Для более строгой и объективной оценки результатов исследований проростки менее одного сантиметра в длину учитывались отдельно, так как их жизнеспособность была под сомнением и могла снизить практическую значимость исследований. Опыт проводили в двукратной повторности.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что во всех вариантах опыта с применением ФАС у 21 сортаобразца капусты старой репродукции нами получены всходы. Действие препаратов различалось в зависимости от их природы, концентрации и времени экспозиции в растворе.

Капуста белокочанная. Сорт белокочанной капусты Дербентская местная улучшенная (ДСОСВиО) 2006 года репродукции в контроле всхожесть 0% во всех концентрациях и экспозициях. В варианте с препаратом № 1 при концентрации 5мг/л и экспозиции 4 и 8 ч получены всходы 2 и 4%, а с учетом проростков до 1см - 8 и 10%.

Сорт Лиза (ДСОСВиО) 2008 года репродукции, в контрольном варианте всхожесть 0%, а в концентрации 5мг/л и по экспозициям 3; 7 и 9% всхожести семян.

Сорт Июньская (Россия), репродукция 2013 года - всхожесть в контроле 0%, а в варианте с препаратом №1 концентрации 20мг/л и экспозиции 2 и 4 ч всхожесть семян составила

18 и 39 % соответственно. В варианте №3 концентрация 10мг/л, всхожесть семян при экспозиции 2 и 4 ч – 28 и 34 %.

Капуста цветная. По сортообразцам репродукции 2006-2009гг., всхожесть в контрольном варианте слабая. Влияние препаратов №1 и №3 на всхожесть семян существенно различается в зависимости от концентрации препаратов и времени экспозиции.

Сорт Pronto (Нидерланды) репродукции 2007 года. При применении препарата №2 в концентрации 1мг/л всхожесть по экспозициям составила 24; 26 и 36 %, когда как в контрольном варианте - 8%. Препарат №1 показал более низкую эффективность - всхожесть по экспозициям 14; 8 и 10 %.

Сорт 003 (Япония) репродукция 2008 года, всхожесть в контрольном варианте 16%, а при применении препаратов №1 и №3 процент всхожести превысил во всех концентрациях и экспозициях более, чем на 20%. Нужно отметить, что препарат №3 вызывал формирование более жизнеспособных проростков с хорошо развитыми корешками и черешками.

Азиатские виды капусты. Испытываемые ФАС проявили ингибиторный эффект. В частности, всхожесть семян в контроле 46-68 и 80-92% у сортов Пава и Ворожея 2006 года репродукции, соответственно. Применение препаратов угнетает всхожесть семян и в процентном соотношении доходит до 2-6 и 3-9.

Декоративная капуста сорта Карменсита проявила аналогичную картину

В целом, при применении препаратов №2 и №3 во всех концентрациях и экспозициях всхожесть семян была низкой, но при обработке препаратом №3 формировались проростки с мощной, хорошо развитой корневой системой с боковыми корнями длиной до 7 см.

Таким образом, исследования показали, что физиологически активные соединения позволяют не только повысить всхожесть семян старой репродукции коллекции овощных культур особо ценных сортов и гибридов, но и дают возможность использовать для посева невсхожие семена овощных культур.

INFLUENCE OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE CONNECTIONS OF THE HORMONAL NATURE ON VIABILITY OF SEEDS OF AN OLD REPRODUCTION OF A TYPE OF *BRASSICA*

Kazakhmedov R.E., Gadzhimustapayeva E.G., Pulatova K.D.

types and cabbage grades, physiologically active connections, viability of seeds

Results of studying of FAS of the hormonal nature for increase of viability of seeds of an old reproduction of different types and cabbage grades are presented. Prospects of application of the studied connections in preservation of genetic resources of vegetable cultures and in selection work are revealed.

Институт Ботаники НАН Азербайджана, Патамдарское шоссе, 40, AZ 1073 Баку,
Азербайджан, E-mail: biotexnoloqaz@mail.ru

шафран, in vitro морфогенез, органогенез, клубнелуковицы

Шафран (*Crocus S.L.*) с древнейших времен известен как ценнейшее лекарственное растение.

В последние годы потребность в шафране возрастает, что связано с известными антиоксидантными свойствами и антиопухолевого активностью препаратов, полученных из рылец его цветков.

Увеличивающийся в мире спрос на цветочную продукцию шафрана стимулирует исследования, связанные с его воспроизводством, в том числе и с применением современных методов.

Биотехнологические исследования имеют цель, как для разработки собственно микроклонального размножения через культуру меристем, так и путем индукции соматического морфогенеза из каллусных клеток. Кроме того, успехи в биотехнологическом размножении шафрана могут явиться основой для реализации будущих достижений в молекулярно-генетическом усовершенствовании этой культуры по определенным признакам.

Исследования в области клеточной биотехнологии шафрана уже имеют свою историю и определенные успехи [1,2]. К настоящему времени основные усилия направлены на увеличение эффективности размножения *in vitro*, поиску новых подходов в этих направлениях исследований.

Кроме обычных методологических проблем в индукции морфогенеза для данной культуры существуют специфические, без учета которых вероятность и стабильность результатов *in vitro* являются в определенной степени проблематичными.

Поиск наиболее эффективных подходов для увеличения коэффициента размножения во многом должен учитывать стадийные процессы онтогенетического развития этого геофита, которые он проходит в природных условиях. Так, только на основании фенологических наблюдений можно выделить 4 стадии развития этого растения, хотя по данным молекулярных исследований их число может превышать 6 [3].

Время, предшествующее цветению, цветение и этап после цветения необходимо выделить в отдельные стадии развития, так как, несмотря на кратковременность и скоротечность цветения, эти периоды сопряжены с активацией различных регуляторных систем, конкурирующих на этих этапах за одни и те же субстраты, сопровождаются изменением гормонального баланса, что, естественно, сказывается на компетентности к определенным индукторам каллусообразования и морфогенеза в исследованиях *in vitro*. Временные рамки течения этих процессов, за исключением самого цветения, в настоящее время неизвестны.

Практически *Crocus S.L.* во времени не имеет периода покоя, когда каждый последующий этап онтогенеза в своем проявлении является продолжением предыдущего. Увеличенное регистрируемое количество этапов в ряде случаев можно объяснить экотипическими особенностями этого вида, адаптированного веками к климатическим условиям мест произрастания. Наши исследования показали сложность точного определения времени использования клубнелуковиц на отдельных этапах онтогенеза, в качестве исходного материала для каллусообразования и морфогенеза, из-за нестабильности и несовпадения климатических параметров каждого сезона. Исходя из того, что в условиях, когда природные показатели окружающей среды, определяющие функционирование программы онтогенетического развития *Crocus S.L.*, изменяются настолько различно по годам, то единственным вариантом,

позволяющим гарантировать вероятность реализации эффектов *in vitro*, может быть стандартное и последовательное моделирование этапов онтогенеза в искусственных условиях при культивировании исходного материала для использования его в биотехнологических работах.

Имеется также ряд факторов, способных оказывать существенное влияние на морфогенетические процессы *in vitro* и, как следствие, на эффективность и коэффициент размножения в изолированной культуре. К ним следует отнести фоновое содержание селена в почве, его накопление в растениях при определенных условиях [4]. После цветения клубнелуковицы в значительной степени освобождаются от селеносодержащих соединений, которые являются ингибиторами клеточного деления и для растительных клеток. Культивирование клубнелуковиц *Crocus S.L.* в течение одного сезона на искусственных субстратах дало нам возможность значительно повысить компетентность исходных тканей к гормональным индукторам в условиях *in vitro*.

Другим важным моментом является установленная компетентность этого вида к такому гормональному фактору *in vivo*, как гиббереллин. В природе, в течение периода пониженных температур, происходит переход гиббереллиновых соединений и гиббереллина в свободную форму, что и определяет, во многом, течение морфофизиологических процессов. Увеличение уровня экзогенного гиббереллина может значительно повышать образование цветочных побегов [5]. В настоящее время использование гиббереллиновой кислоты в составе питательных сред является одним из подходов к увеличению эффективности образования клубнелуковиц *de novo* в условиях *in vitro*. Однако в изолированной культуре экзогенный гиббереллин на фоне определенных соотношений ауксинов и цитокининов, в ряде случаев, оказывается не только малоэффективным, но и может влиять отрицательно на процессы органогенеза, что может быть связано с высоким пулом эндогенных гиббереллинов или гиббереллиновых соединений в исходном материале.

Учет всех вышеперечисленных факторов, могущих оказывать определенное влияние на эффективность органогенеза в условиях *in vitro*, применение температурных градиентов, не описанных ранее, позволили нам реализовать индуцированный морфогенез на этапе органогенеза и *de novo* получить клубнелуковицы *in vitro*. В зависимости от вариантов среды и комбинации гормональных факторов образовывалось от 10 до 25 клубнелуковиц в одной колбе (рис. 1, 2).

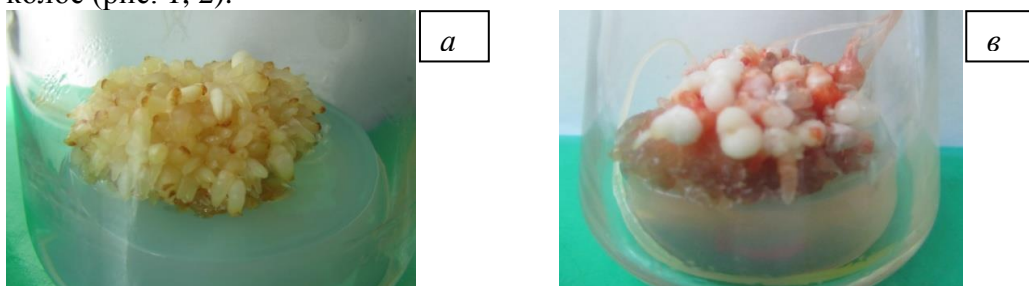


Рисунок 1 - Начальные последовательные стадии эмбриогенеза (а) и морфогенеза (в)
Figure 1 - Initial successive stages of embryogenesis (a) and morphogenesis (b)

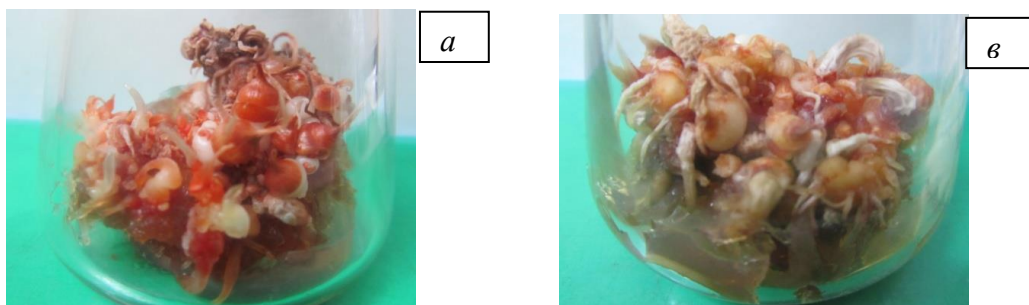


Рисунок 2 - Образование микроклубней *Crocus S.L.* в культуре *in vitro*
Figure 2 Saffron corms formation *in vitro* conditions

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Фонда Развития Науки при Президенте Азербайджанской Республики-Грант № EIF-2011-1(3)-82/49/3 УДК 581.14.

Литература

1. Fernández J.A., 2004. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Recent Research in Developmental Plant Science 2, 127–159.
2. Fernandez, J.A., 2007. Genetic resources of saffron and allies (*Crocus* spp.). Acta Horticulturae 739, 167–185.
3. Zubor A.A., Surányi G., Györi Z., Borbély G., Prokisch J., 2003. Molecular biological approach of the systematics of *Crocus sativus* L. and its allies. I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology.(SBT). Notes (2004) Albacet, Spain, 22-25 October 2003,р.3.
4. Карагезов Т.Г., Мамедова М.Г., Азизов И.В., Асадова С.Ш. Особенности каллусообразования и регенерации растений шафрана (*Crocus S.L.*). Мат. Межд. конференции с элементами научной школы для молодежи.22-25 сентября 2010 г. Мичуринск, с.163-167.
5. Азизбекова Н.Ш.,Миляева Э.Л.,Лобова Н.В. ,1978 . Влияние гиббереллина и кинетина на формирование цветочных органов шафрана. ж.Физиология растений, т.25, вып.3, 603-609.

MORPHOGENESIS AND ORGANOGENESIS OF SAFFRON (*CROCUS SL*) UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

Karagyozev T.G., Asadova S.Sh., Mamedova M.G., Azizov I.V.

saffron, in vitro morphogenesis, organogenesis, corms

Factors influencing morphogenesis and organogenesis of saffron (*Crocus SL.*) are considered. By using a temperature gradient under *in vitro* conditions was obtained *de novo* from 10 to 25 corms.

**ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ И СЕЛЕНАТА НАТРИЯ НА АКТИВНОСТЬ
ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ РАПСА
(*BRASSICA NAPUS*)**

Каташов Д.А., Хрянин В.Н.

ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет» ул. Красная, 40, г. Пенза,
440026, Россия, E-mail: viktor.khryanin@gmail.com

рапс, фитогормоны, селенат натрия, АФК, пероксидаза, пролин, МДА

Введение

Активные формы кислорода (АФК) - это вещества, которые постоянно образуются на протяжении всего онтогенеза растения и являются продуктами различных физиологических процессов. Воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды повышает содержание АФК, что приводит к разрушению органических молекул. Поддержанием концентрации АФК в клетке на достаточно низком уровне и локализацию их действия осуществляет специализированная многокомпонентная антиоксидантная система (АОС), от состояния которой зависит устойчивость растений к стрессовым воздействиям (Bolwell, 1997, Скулачев, 1998). Поэтому изучение влияния регуляторов роста на активность АОС имеет большое практическое значение.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовались растения рапса (*Brassica napus*) сорта "Ратник". Растения выращивались в открытом грунте, на естественной длине дня. Первая серия опытов включала замачивание семян в растворах фитогормонов: индолилуксусная кислота (ИУК -5 мкМ), гибберелловая кислота (ГК - 10 мкМ), 6-бензиламинопурин (6-БАП - 5 мкМ), брассинолид (БС - 1 мкМ), фузикоцин (ФК - 1 мкМ); растворе селената натрия (0.005 мкМ) в течении 12 ч и вторая - опрыскивание растений в фазу третьего листа. В работе использовались растения, взятые в фазу цветения. Для анализа брали листья третьего яруса. Измерение активности фермента пероксидазы проводили по методу Бояркина (1951) на спектрофотометре при длине волны 590 нм. Содержание свободного пролина измеряли по методу Bates et al. (1973) при длине волны 490 нм и 540 нм. Содержание малонового альдегида определяли по методике Н. Л. Радюкиной и др., 2011. Все эксперименты были проведены в 3 биологических и 10 аналитических повторностях. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью критерия Стьюдента (Шмидт, 1984).

Результаты и обсуждение

АОС растений многокомпонентна и число соединений, относимых к антиоксидантам, постоянно возрастает. Наиболее удобно классифицировать группы антиоксидантов в соответствии с их молекулярной массой (Меньшикова, Зенков 1993, Кулинский 1999). При этом первую группу составляют низкомолекулярные соединения, а вторую - высокомолекулярные ферменты и белки. Одним из важнейших компонентов второй группы антиоксидантов являются пероксидазы. Опыты по изучению влияния фитогормонов и микроэлемента селена на активность пероксидазы показали, что использование ИУК, ГК, ФК и селената натрия приводит к увеличению активности фермента на 30%, использование БС на 15% (рис. 1). Различий в активности фермента при замачивании семян и непосредственной обработке растений выявлено не было.

Одним из компонентов АОС растений относящимся к группе низкомолекулярных соединений является пролин. В ходе исследования было выявлено, что применение ГК и ФК приводит к увеличению содержания пролина на 35%, использование БС и замачивание семян в растворе селената Na на 20% (рис.2). При этом в опытах с замачиванием семян содержание пролина оказалось выше, чем в опытах с обработкой растений.

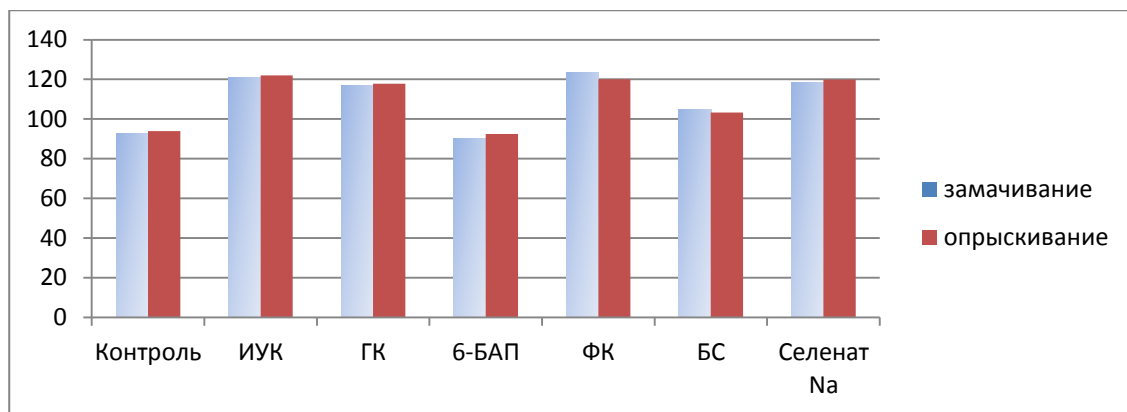


Рисунок 1 - Влияние фитогормонов и селената Na на активность пероксидаз
Figure 1 - Effect of plant hormones and Na selenate on peroxidase activity

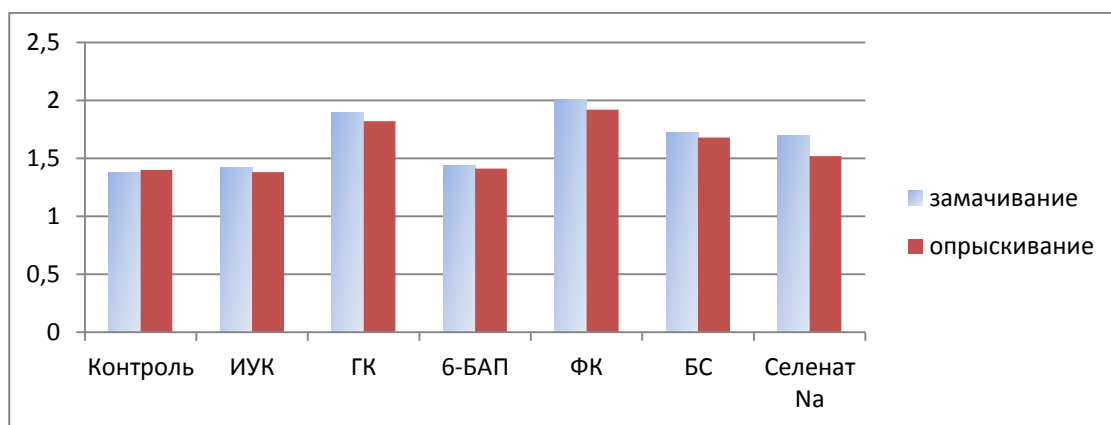


Рисунок 2 - Влияние фитогормонов и селената Na на содержание пролина мг/г сырого веса
Figure 2 - Effect of plant hormones and selenate Na content of proline mg/g wet weight

Наиболее общим индикатором степени развития окислительного стресса, вызванного АФК, является состояние перекисного окисления липидов мембран (ПОЛ), о чём судят по количеству образованного малонового диальдегида (МДА). Использование ИУК, ГК и ФК приводит к снижению содержания МДА на 30% (рис. 3).

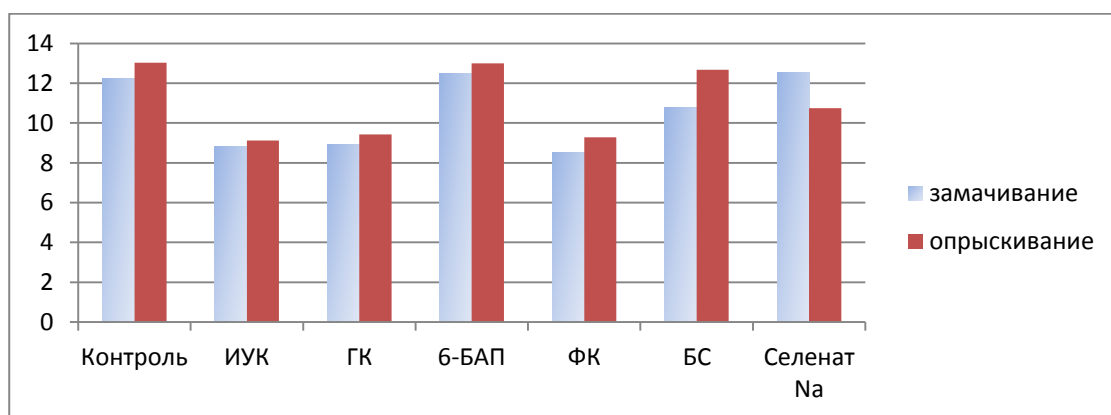


Рисунок 3 - Влияние фитогормонов и селената Na на содержание МДА, в нмоль/г сырой массы
Figure 3 - Effect of plant hormones and Na selenate on MDA content in nmol/g wet weight

Таким образом, было установлено, что обработка фитогормонами и селенатом Na, за исключением цитокинина, положительно сказалось на состоянии АОС растений рапса, бла-

годаря синтеза основных её компонентов. В результате их работы происходит ослабление перекисного окисления липидов, что отражается в уменьшении содержания МДА, которое является основным показателем окислительных процессов в клетке, обусловленных действием АФК. А это и приводит к повышению устойчивости растений к факторам стресса.

Литература

1. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений // под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 487 с.
2. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В.И. Кулинский // Соросовский Образовательный Журнал. 1999. -Т.38, №1. - С.2-7.
3. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов. М.: «Наука». Успехи современной биологии. - 1993. - Т. 113, вып. 4. - С. 442-456.
4. Скулачев В. П. О биохимических механизмах эволюции и роли кислорода // Биохимия. 1998.-Т. 63, № 11.- С. 1570- 1579.
5. Шмидт В. М. Математические методы в ботанике: Учеб.пособие. Л.: Изд-во ЛГУ, 1984. - 288 с.
6. Bolwell G.P., Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of oxygen species in plant defence a broad perspective. // Phisiol. Mol. Plant Pathol. -1997. -V.51. -P.347-366.

INFLUENCE OF PHYTOHORMONES AND SODIUM SELENATE ON ENZYME ACTIVITY OF ANTIOXIDANT SYSTEM OF RAPE PLANTS (*BRASSICA NAPUS*)

Katashov D., Khryanin V.

rape, phytohormones, sodium selenate, ROS, peroxidase, proline, MDA

The influence of phytohormones and sodium selenate on the antioxidant system of plants rapeseed (*Brassica napus*) varieties Ratnik. Determined peroxidase activity and proline content and malondialdehyde.

**ВЛИЯНИЕ КАРБОКСИЛАТНОГО КОМПЛЕКСА БИОГЕННЫХ МЕТАЛЛОВ,
СОЗДАННОГО С ПОМОЩЬЮ НАНОТЕХНОЛОГИЙ,
НА ФОТОСИНТЕЗ ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ**

Киризий Д.А., Стасик О.О.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
ул. Васильковская 31/17, г. Киев, 03022, Украина, E-mail: kiriziy@gmail.com

Triticum aestivum L., фотосинтез, биогенные металлы, карбоксилаты

Введение

Микроэлементы играют уникальную роль в жизнедеятельности растительного организма и поэтому являются важной составляющей минерального питания растений [1]. Применение комплексных микроудобрений в современных технологиях выращивания сельскохозяйственных культур увеличивает эффективность использования растениями макроэлементов, положительно влияет на качество урожая, повышает устойчивость растений к неблагоприятным условиям внешней среды и патогенам.

Эффективным способом восполнения дефицита микроэлементов являются внекорневые подкормки с применением хелатных микроудобрений [2]. В качестве хелатирующих агентов в большинстве коммерческих препаратов используют этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) и оксиэтилидендифосфоновую кислоту (ОЭДФ). Хелатные микроудобрения хорошо растворимы в воде, по сравнению с солями неорганических кислот гораздо быстрее и в более полно усваиваются растениями. Однако практически все используемые синтетические хеланты являются для растений ксенобиотиками, при разложении которых образуются токсичные соединения.

Для решения этой проблемы предпринимаются попытки создания комплексонов биогенных металлов с использованием в качестве хелантов природных соединений, в частности органических кислот, участвующих в метаболизме растений. Синтезировать такие соединения и создать на их основе препараты комплексных микроэлементов, соответствующие высоким экологическим требованиям, удалось с помощью современных нанотехнологий.

Карбоксилатный комплекс Аватар-1 (производитель ООО «Аватар», Киев, Украина) получают диспергированием гранул высокочистых металлов импульсами электрического тока в деионизированной воде с последующей реакцией прямого взаимодействия наночастиц с органическими кислотами (лимонной, фолиевой, янтарной, малеиновой, фумаровой или их смесью – 0,5-10 г/л) [3]. Концентрация металлов в этом комплексе составляет: Со – 0,0001-0,0025, Cu – 0,01-0,08, Zn – 0,001-0,007, Fe – 0,0015-0,008, Mn – 0,0005-0,005, Mo – 0,00001-0,0025, Mg – 0,01-0,08 % по действующему веществу. Применение нанотехнологий обеспечивает высокую степень чистоты основного продукта реакции.

В полевых мелкоделяночных опытах показано, что внекорневая обработка растений озимой пшеницы в фазу колошения комплексом Аватар-1 на 10 % повышала зерновую продуктивность [4]. При этом обнаружено, что действие препарата было больше связано с увеличением чистой продуктивности фотосинтеза, чем с возрастанием площади ассимиляционной поверхности посева.

Целью работы было изучение влияния комплексного микроудобрения Аватар-1 на интенсивность ассимиляции CO₂ флаговых листьев озимой пшеницы в репродуктивный период развития растений.

Материалы и методы

Растения озимой пшеницы сорта Смуглянка выращивали в условиях вегетационного опыта на двух фонах минерального питания – высоком (при набивке сосудов вносили N₁₆₀P₁₆₀K₁₆₀) и низком (вносили N₃₂P₃₂K₃₂ мг/кг почвы). В фазу выхода в трубку часть расте-

ний обработали 0,064 %-м раствором препарата Аватар-1 (из расчета расхода препарата 2 л/га). Контрольные растения обрабатывали водой.

Измерения интенсивности газообмена проводили на неотделенных от растений флаговых листьях в фазы колошения, цветения и молочно-восковой спелости. Параметры CO_2 -газообмена определяли в контролируемых условиях при помощи установки, смонтированной на базе инфракрасного газоанализатора ГИАМ-5М, включенного по дифференциальной схеме. Температуру листа в камере поддерживали на уровне $25\text{ }^\circ\text{C}$, освещенность – 400 Вт/м^2 ФАР. Через камеру продували атмосферный воздух со скоростью 1 л/мин. Интенсивность транспирации определяли термоэлектрическим микропсихрометром.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют, что обработка растений нанопрепаратом привела к повышению интенсивности видимого фотосинтеза флаговых листьев (в среднем на 10 %), причем этот эффект сохранялся на протяжении всего периода наблюдений (рис. 1).

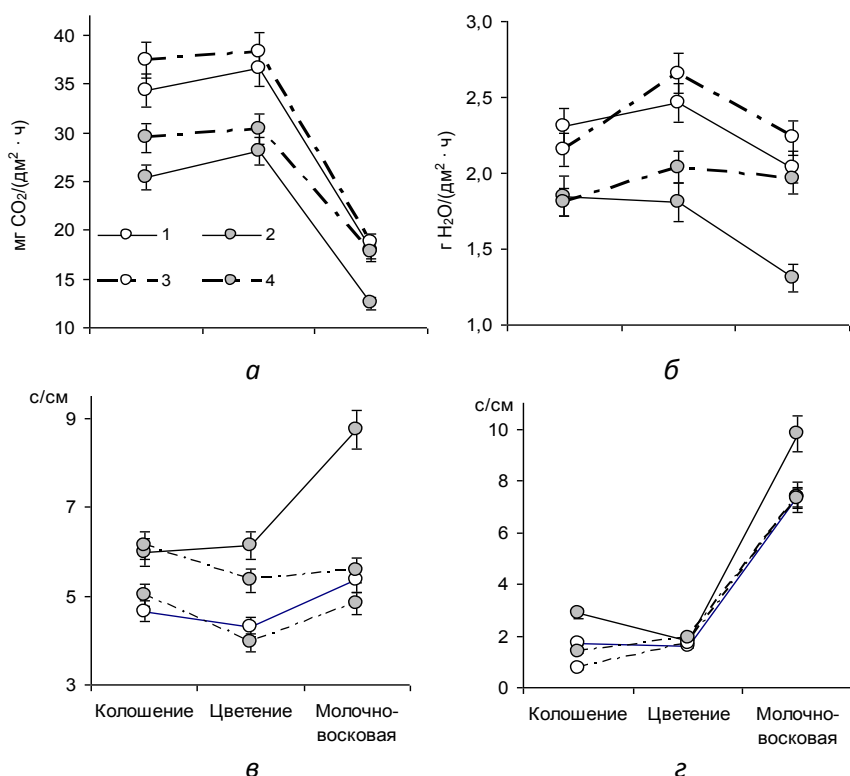


Рисунок 1 - Динамика интенсивности фотосинтеза (а), транспирации (б), листового сопротивления (в) и сопротивления мезофилла (г) флаговых листьев растений озимой пшеницы, выращенной на высоком (1, 3) и низком (2, 4) фоне минерального питания, обработанных препаратом Аватар-1 (3, 4)

Figure 1 - Course of net assimilation (a), transpiration (б) rate, leaf (в) and mesophyll (г) resistance of flag leaves of winter wheat plants grown at high (1, 3) and low (2, 4) level of mineral nutrition, and treated with preparation Avatar-1 (3, 4)

Особенно заметным он был у растений на низком фоне минерального питания, где в фазу молочно-восковой спелости обработанные растения сравнялись по интенсивности фотосинтеза с растущими на высоком фоне, в то время как у необработанных этот показатель был почти на 30 % меньше. На высоком фоне минерального питания отмечена лишь тенденция к превышению интенсивности фотосинтеза обработанных препаратом растений над необработанными, тогда как на низком фоне в фазы колошения и молочно-восковой спелости это превышение было существенным.

Влияние препарата Аватар-1 на фотодыхание флаговых листьев было менее выраженным. Можно отметить лишь некоторое уменьшение этого показателя у растений на высоком

фоне мінерального живлення в фазу колошення. В інших випадках різниці між обробленими і необробленими рослинами були несуттєвими.

Інтенсивність транспірації рослин, оброблених нанопрепаратом, помітно зросла, особливо в період наливу зерна, причому ефект був виражений сильніше на низкому фоні мінерального живлення, як це спостерігалося і для інтенсивності фотосинтезу. Розрахунки опортів дифузії листків для CO₂ показали, що суттєве збільшення інтенсивності фотосинтезу листків оброблених рослин на низкому фоні мінерального живлення в фазу молочно-воскової спелості було обумовлено зниженням як листового, так і мезофільного опортів. Однак при цьому листове опортів, основною складовою якою є опортів устьць, знизилось сильніше, ніж опортів мезофілла.

Заклучение

Таким образом, обробка рослин озимої пшениці в фазу виходу в трубку карбоксилатним комплексом біогенних металів, отриманого з допомогою нанотехнології, підвищує інтенсивність фотосинтезу прапорового листа в період наливу зерна, причому ефект виражений сильніше при недостатку основних елементів мінерального живлення. Це може бути перспективним для підвищення продуктивності пшениці в стресових умовах.

Литература

1. Власюк, П.А. Мікроелементи в обміні речовин рослин / П.А. Власюк. – Київ: Наукова думка, 1976. – 154 с.

2. Бульгін, С.Ю., Демишев, Л.Ф., Доронін, В. А. Мікроелементи в сільському господарстві / С.Ю. Бульгін, Л.Ф. Демишев, В. А. Доронін. – Дніпропетровськ: Сич, 2007. – 100 с.

3. Патент України на корисну модель № 44139. Спосіб отримання гідрофільних металевих наночастинок «Електроімпульсна аквананотехнологія отримання гідрофільних металевих наночастинок» // Косінов М. В., Каплуненко В.Г. / МПК (2009): B01J 13/00, B32B 5/00, A61N 1/44 (2009.01), H01J 19/00. Опубл. 25.09.2009, бюл. № 18/2009.

4. Стасик, О.О., Прядкіна, Г.О., Каплуненко, В.Г., Косінов, М.В. Вплив позакореневої обробки рослин озимої пшениці наноаквахелатним комплексом мікроелементів «Аватар-1» на показники продукційного процесу та структуру урожаю / О.О. Стасик, Г.О. Прядкіна, В.Г. Каплуненко, М.В. Косінов // Етика нанотехнологій та нанобезпека. Тези доповідей міжнародного семінару (Київ, 13 жовтня 2011). – К: НАНУ, 2011. – С. 44-45.

EFFECT OF BIOGENIC METALS ACID COMPLEX CREATED BY NANOTECHNOLOGY ON PHOTOSYNTHESIS OF WHEAT LEAVES

Kiriziy D.A., Stasik O.O.

Triticum aestivum L., photosynthesis, biogenic metals, acid complex

It was shown that treatment of winter wheat plants at stalk-shooting with biogenic metals acid complex created by nanotechnology enhanced flag leaf net photosynthetic rate at grain forming, and effect was expressed stronger under the deficit of main mineral nutrition elements.

ФОРМИРОВАНИЕ УРОЖАЯ РАСТЕНИЯМИ СОИ ПРИ БИНАРНОЙ ИНОКУЛЯЦИИ СЕМЯН

Кириченко Е.В.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
ул. Васильковская 31/17, г. Киев, 03022, Украина, E-mail: leki07@mail.ru

соя, урожай, моноинокуляция, бинарные инокулянты, ризобии, азотобактер, лектин

Введение

Соя – одна из наиболее востребованных продовольственных зернобобовых культур на мировом рынке агропродукции, посевные площади которой стремительно увеличиваются, что требует разработки биотехнологических способов повышения ее продуктивности. При выращивании сои обязательной является предпосевная инокуляция семян специфичными растениям клубеньковыми бактериями, образующими на корнях симбиотические структуры – клубеньки, в которых происходит процесс преобразования молекулярного азота в соединения, доступные растениям [1]. Микробные биотехнологии – перспективный элемент современных агробиотехнологий [2]. Актуальным является применение комплексных бактериальных препаратов, поскольку инокулянт в виде монокультуры реализует свой потенциал лишь на 60-70%. Перспективными биологическими агентами для создания комплексных инокулянтов с более высокой и стабильной эффективностью действия являются *Bradyrhizobium japonicum* (специфичные растению-хозяину клубеньковые бактерии, которые используются в качестве основы микробных инокулянтов под данную культуру), азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter*, характеризующиеся комплексом положительных эффектов действия на растения и почву, растительные метаболиты лектины – белки с широким спектром биологической активности относительно растений, почвенных азотфиксирующих микроорганизмов и фитопатогенных грибов [3].

Целью нашего исследования была оценка эффективности действия бинарных инокулянтов, созданных на основе специфичных растению сои клубеньковых бактерий, модифицированных лектином сои и ризосферных diaзотрофов рода *Azotobacter* при предпосевной бактериализации семян.

Материалы и методы

Объектом исследований были симбиотические системы сои *Glycine max* L. Merr. сорта Аннушка (раннеспелый), созданные с *Bradyrhizobium japonicum* 634б при моно- и бинарной инокуляции семян.

Для инокуляции семян использовали монокультуру специфичных растению-хозяину *B. japonicum* 634б – высокоактивных, конкурентноспособных и эффективных в симбиозе с растениями. Бинарный инокулянт бактериальной природы создан на основе штаммов *B. japonicum* 634б и *Azotobacter chroococcum* Т79. Бинарный инокулянт лектин-бактериальной природы создан на основе *B. japonicum* 634б и лектина семян сои. Штаммы бактерий хранятся в коллекции азотфиксирующих микроорганизмов отдела симбиотической азотфиксации ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ НАН Украины (Киев, Украина). Культуры бактерий выращивали соответственно на питательных средах маннитно-дрожжевом агаре и Эшби в течение 10 и 3 сут при температуре 28°С. Титр ризобияльных клеток - 10⁹ кл/мл. Для создания бинарных инокулянтов компоненты смешивали в соотношении 1:1 и инкубировали при 28 °С 1 сут с сохранением равной ризобияльной нагрузки инокулюмов.

Эффективность действия моно- и комплексной инокуляции семян сои оценивали в вегетационных условиях при природном освещении и температуре в 5-кратной повторности по вариантам в 10-кг сосудах Вагнера на песчаном и почвенном субстратах с питательной смесью Гельригеля (0,25 нормы минерального азота). Оценивали показатели всхожести семян, нитроге-

назной активности корневых клубеньков, массы вегетирующих растений и урожая семян (структура урожая). Опыты проводили по следующей схеме:

№ варианта:

Обработка семян:

Без инокуляции (обработка семян водой, абсолютный контроль)

Инокуляция *B. japonicum* 634б (штамм-контроль)

Инокуляция *B. japonicum* + *A. chroococcum* Т79 (бинарная бактериальная композиция)

Инокуляция *B. japonicum* + лектин семян сои (бинарная лектин- бактериальная композиция)

Результаты и обсуждение

Установлено, что бинарные композиции при предпосевной обработке семян сои активировали выход семян из состояния покоя и их прорастание. По данной способности (рострегуляторная активность инокулянтов) отмечено максимальное действие лектин-бактериальной композиции (№ 4): количество всходов превышало показатель абсолютного контроля (а.к.) на 47%, штамм-контроля – на 29%. Бактериальная композиция (ризобии + азотобактер, № 3) привела к увеличению количества всходов на 37-52 и 20-27% соответственно. Действие ризобияльного моноинокулянта проявлялось в ускорении прорастания семян по сравнению с абсолютным контролем на 14-20%.

Таким образом, уже на самых ранних этапах онтогенеза растений сои отмечены преимущества действия бинарных композиций по сравнению с моноинокулянтом. Стимуляция прорастания и всхожести семян сои происходит, вероятно, за счет способности как клубеньковых бактерий, так и азотобактера к синтезу веществ рострегуляторного действия [4]. Такими соединениями, в первую очередь, являются гормоны цитокининовой и ауксиновой природы. Фитолектин при экзогенном действии также повышает уровень продукции ауксиновых и цитокининовых гормонов почвенными микроорганизмами, а также содержание гормонов (ИУК, зеатина, зеатинрибозида) в листьях вегетирующих растений, способствует развитию растений на протяжении всего вегетационного периода, а также формированию зерновой продуктивности [3].

Положительное действие бинарных инокулянтов зафиксировано на протяжении всего периода вегетации сои: растения интенсивно формировали вегетативную массу. При этом на раннем этапе онтогенеза (один настоящий листок) наблюдалась лишь тенденция, что объясняется одинаковым исходным уровнем минерального азота (0, 25 нормы) в среде роста растений. Незначительное преимущество действия бинарных инокулянтов может быть связано с дополнительным влиянием микробных метаболитов (азотобактер является активным продуцентом витаминов, аминокислот, гормонов) и лектина семян сои как биологически активного вещества на растения и ризосферную микрофлору [3].

Во вторую половину вегетации сои отмечено достоверное увеличение показателей «надземная масса» (в 1,2-1,5 раза) и «масса корня» (в 1,3-1,6 раза) в вариантах с применением бинарных инокулянтов по сравнению с ризобиями. Это может быть результатом более высокого уровня функциональной (нитрогеназной) активности симбиозов и обеспеченности растений азотом как базовым элементом питания, играющим основную роль в формировании продуктивности культурных растений. Удельная нитрогеназная активность симбиотических систем, образованных бинарными композициями (№ 3, 4) увеличилась по сравнению со штамм-контролем (№ 2), соответственно, в 1,1-1,5 раза и 1,2-2,6 раза. Лектин-бактериальная композиция (№ 4) была более эффективной в сравнении с бактериальным бинарным инокулянтом (№ 3). Очевидна четкая положительная зависимость в увеличении показателей «нитрогеназная активность клубеньков» и «массы растений», что доказывает существенную роль азотного питания растений, в частности биологического азота, в формировании их продуктивности.

Бинарная инокуляция семян является более эффективным способом, чем моноинокуляция, поскольку повышает урожай семян сои (на сосуд) на 32, 23% и 12, 30% соответственно при использовании композиций ризобии+азотобактер и ризобии+лектин сои. Анализ структуры уро-

жая (фаза полной спелости семян) свидетельствует о перспективности применения бинарных инокулянтов для предпосевной бактериализации семян с целью повышения степени реализации продуктивного потенциала сои сорта Аннушка. Прибавка урожая в варианте № 3 (ризобии+азотобактер) получена за счет увеличения количества семян в бобе, соответственно для песчаной и почвенной культуры, на 9 и 24%, количества бобов в плодузле на 8 и 15%, массы одного боба на 6 и 21%, массы бобов на растении на 25 и 28%, массы семян с растения на 33 и 26%, а также массы 1000 семян на 7 и 12%. В вариантах с бинарной лектиновой композицией (№ 4) прибавка урожая получена за счет увеличения количества бобов на растении, соответственно для песчаной и почвенной культур, на 19 и 26%, количества семян с растения на 10 и 31%, количества бобов в плодузле на 8 и 23%, массы бобов (на 24 и 32%) и семян (на 13 и 30%) с растения. Однако масса 1000 семян не отличалась от варианта с ризобиальной инокуляцией (песчаная культура) или на 13% превышала ее (почвенная культура).

Выводы

Таким образом, преимущество предпосевной обработки семян бинарными инокулянтами по сравнению с бактериализацией специфичными растению-хозяину ризобиями проявляется в интенсификации процесса выхода семян из состояния покоя и его прорастания, формирования растениями зеленой массы и корневой системы, более высоком уровне функционирования симбиотического аппарата, повышении семенной продуктивности сои. Исходя из этого, при выращивании сои раннеспелого и среднеурожайного сорта Аннушка с целью повышения степени реализации его семенного продуктивного потенциала рекомендуется обязательное применение приема предпосевной бактериализации семян, в частности инокуляция бинарными композициями бактериальной (ризобии + азотобактер) и лектин-бактериальной (ризобии + лектин сои) природы как более эффективная по сравнению с традиционной моноинокуляцией специфичными клубеньковыми бактериями.

Литература

1. Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф., Даценко В.К., Кругова Е.Д., Кириченко Е.В., Мельникова Н.Н., Михалкив Л.М. Биологическая фиксация азота. Бобово-ризобиальный симбиоз. – Киев: Логос, 2010. – Т. 1. – 506 с.
2. Тихонович И.А., Круглов Ю.В. Биопрепараты в сельском хозяйстве (Методология и практика использования микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве) – М.: Россельхозакадемия, 2005. – 154 с.
3. Кириченко Е. Роль фитолектинов в регуляции функционирования симбиозов и ассоциаций. Биологическая активность лектинов бобовых и зерновых культур. – Saarbrücken, Deutschland: Palmarium Academic Publishing, 2012. – 84 с.

FORMING OF THE SOYBEAN PLANTS HARVEST AT THE BINARY SEED INOCULATION

Курченко О.В.

soybean plants, harvest, monoinoculation, binary inoculation, rhizobium, azotobacter, lectin

In greenhouse experiments with sandy and soil culture it was shown that advantage of the presowing treatment of soybean seed of the binary inoculants on the base of specific for plants rhizobium and azotobacter as well as rhizobium and soybean lectin intensified the process of seed germination, forming the first real leaf and plants vegetative mass, increased the level of the functioning of symbiotic system as well as the soybean harvest formation.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЯБЛОНИ, СОДЕРЖАЩИХ ШПИЛЕЧНУЮ КОНСТРУКЦИЮ КОМПЛИМЕНТАРНУЮ ВТОРОМУ ЭКЗОНУ ГЕНА АСО ЯБЛОНИ

Клементьева А.А.¹, Скляр Ю.А., Пушин А.С.¹, Тимербаев В.Р.², Долгов С.В.^{1,2}

¹ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, пр. Науки, 6, г. Пущино Московской обл., 142290, Россия

²ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, ул. Тимирязевская, 42, г. Москва, 127550, Россия,
E-mail: anutik.vlasowa@yandex.ru

яблоня, лежкость плодов, АЦК-оксидаза, РНК-интерференция, полигалактуроназа, ОТ-ПЦР

Введение

Проведение генетических исследований на яблоне (*Malus domestica* L.) – трудоемкий и длительный процесс, что связано в первую очередь с продолжительным циклом воспроизведения. Однако, вскоре после первой успешной попытки трансформации яблони [1,2], она стала достаточно популярным объектом для исследования регуляции уровня биосинтеза этилена, прежде всего из-за своей экономической значимости и хорошо изученных физиологических аспектов процесса созревания плодов. Одним из направлений генетической трансформации яблони является модификация процесса созревания плодов с целью увеличения сроков их хранения.

Существует несколько основных стратегий регуляции процесса созревания плодов на генетическом уровне. Так, одна из них основана на подавлении экспрессии генов, кодирующих ферменты, которые участвуют в деградации клеточной стенки растительных клеток (полигалактуроназа и пектин-эстераза), другая же позволяет замедлить процесс созревания плодов благодаря регуляции экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза этилена [3].

Современные методы биотехнологии позволяют регулировать уровень экспрессии эндогенных генов и получать трансгенные сорта с увеличенным сроком хранения плодов на основе хорошо известных и популярных сортов, полученных традиционной селекцией.

Целью данной работы является проведение генетического анализа трансгенных растений яблони, содержащих шпилечные конструкции, образованные последовательностями 2 экзона гена АЦК-оксидазы (*MdACO1*) в двух ориентациях antisense-sense, sense-antisense из яблони и 4 экзона гена АЦК-оксидазы (*LeACO1*) в ориентации antisense-sense из томата.

Материалы и методы

В экспериментах по анализу эффективности синтеза этилена в растениях яблони использовали сорт Мелба.

Для экстракции геномной ДНК яблони использовался растительный материал, полученный *in vivo*. Для растирания в жидком азоте брали верхушечные листья с однолетних приростов. Выделение ДНК проводилось по модифицированной методике Rogers и Bendich [4].

Экстракция тотальной РНК также проводилась из листьев растений яблони сорта Мелба и трансгенных линий. В работе использовалась модифицированная методика Meisel и Fonseca [5]. Выделение проводилось с использованием нового проавтокловированного пластика; 0,1% DEPC-вода, экстракционный буфер и 10 М LiCl (приготовленный на 0,1% DEPC-воде) предварительно автоклавировались.

Трансгенные линии анализировали двумя парами праймеров: на вставку селективного маркерного гена (*np11* или *hpt*) и на вставку смыслового гена (фрагмента АЦК-оксидазы). Отсутствие агробактериальной контаминации в препаратах растительной ДНК подтверждалось ПЦР-анализом на агробактериальный *virB* ген. А также анализировались на экспрессию гена АСО. В работе использовались олигонуклеотиды фирмы «Синтол» (Москва). Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре Bio-Rad SmartSpec 3000. Для освобождения пре-

парата РНК от ДНК обрабатывали образцы ферментом DNase I (Fermentas) концентрация 1 Ед/мкл, согласно протоколу к ферменту.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозных гелях концентрацией 1,2%. Визуализацию ДНК проводили с помощью трансиллюминатора и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Результаты и обсуждение

Для получения трансгенных растений яблони с редуцированным уровнем синтеза этилена с применением технологии РНК-интерференции в нашей лаборатории было создано несколько бинарных векторов с фрагментами генов АЦК оксидаз яблони и томата в различных ориентациях. Три из них содержали целевой ген под управлением CaMV35S промотора – pARTMdACOsa, pARTMdACOas, pCamMdACOsa; другие три вектора содержали плодоспецифичный промотор полигалактуроназы томата (PG) - pARTPGMdACOas, pARTPGMdACOsa, pARTPGLeACOas.

На первом этапе нашей работы был проведен ПЦР-анализ полученных линий. В результате, были подтверждены вставки селективных генов *nptII* и *hpt* во всех образцах (всего 62). Наличие смысловой конструкции было подтверждено для 3 из 3 линий растений яблони, полученных с помощью вектора pARTMdACOsa, 9 из 16 линий, трансформированных конструкцией pCamMdACOsa, и 8 из 9 линий, полученных в результате трансформации конструкцией pARTMdACOas. А также для 18 из 20 линий, полученных при помощи pARTPGLeACOas, для 6 из 10 линий - pARTPGMdACOas и 4 из 4 линий, созданных при помощи вектора pARTPGMdACOsa. В растениях, трансформированных векторами pCam, наличие вставки целевых генов было подтверждено не во всех полученных линиях. Это может быть вызвано тем, что смысловой ген в конструкции следует за селективным геном. А также возможно происходит разрыв Т-ДНК при встраивании в растительный геном. Также был проведен молекулярно-биологический анализ уровня экспрессии гена АСО в листьях полученных ранее трансгенных растениях яблони, а также дана оценка влияния некоторых факторов на эффективность ингибирования экспрессии генов. Результаты, полученные при анализе растений с 35S и PG промоторами методом полуколичественной ОТ-ПЦР, представлены на рис. 1.

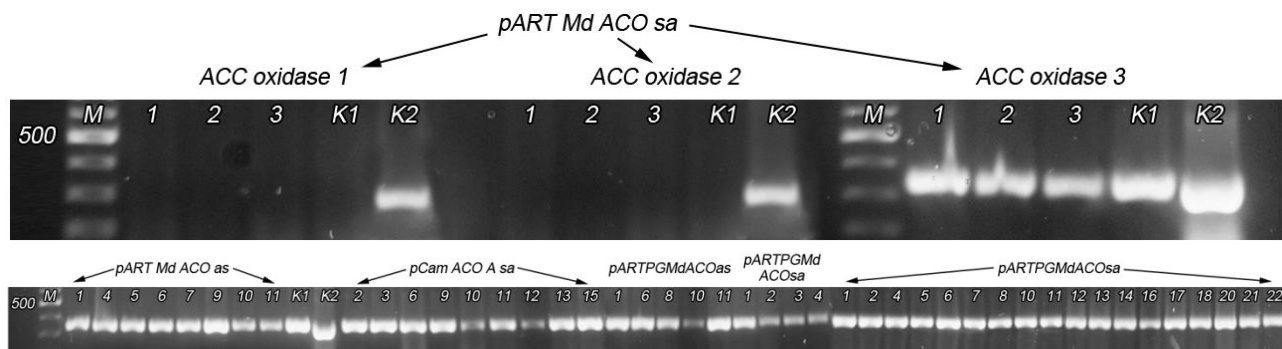


Рисунок 1 - Полуколичественный ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов оксидаз в листьях трансгенных растений яблони. М-маркер, цИститут физиологии растений обозначены трансгенные линии, K1-кДНК нетрансгенного растения, K2-ДНК нетрансгенного растения

Figure 1 - Semiquantitative RT-PCR analysis of oxidase gene expression in leaves of apple transgenic plants. M- molecular weight marker, numerals denote transgenic lines, K1-cDNA non-transformed control, K2-DNA nontransformed control

Результат, полученный в реакции с праймерами на *pdk*-интрон (рис.2), который является спейсером между плечами «шпильки», подтвердил присутствие ПЦР-продукта расчетного размера во всех реакциях, проведенных для листьев трансгенных растений AS и SA.

Поскольку в отрицательном контроле в отсутствие ревертазы сигнал на *pdk*-интрон, как и на все остальные анализируемые гены, отсутствует, можно считать, что реакция идет именно с синтезируемой кДНК, а не с геномной ДНК.

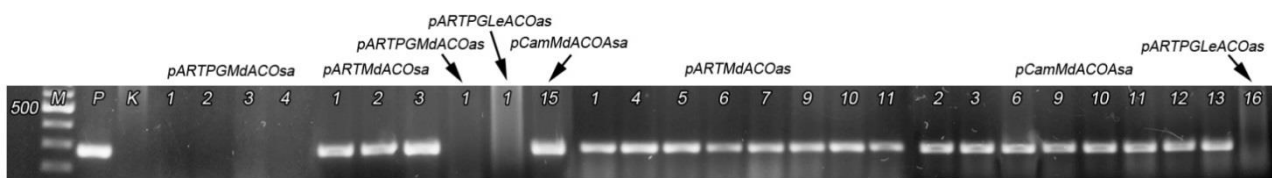


Рисунок 2 - Полуколичественный ОТ-ПЦР анализ на *pdk*-интрон в листьях трансгенных растений яблони. М- маркер, Р-плазмида pCam ACO A sa , К- нетрансгенное растение, цИ- институт физиологии растенийами обозначены трансгенные линии

Figure 2 - Semiquantitative RT-PCR analysis of *pdk*-intron in leaves of apple transgenic plants. M- molecular weight marker, P-plasmid pCam ACO A sa, K-nontransformed control, numerals denote transgenic lines

Заклучение

В результате наших исследований было подтверждено наличие вставки смыслового гена ACO в 48 трансгенных линиях из 62. Анализ экспрессии гена ACO и *pdk*-интрона в листьях трансгенных линий, дает нам основание предполагать, что полученные плоды от этих линий будут с замедленным сроком созревания.

Литература

1. James D.J., Passey A.J., Baker S.A., Wilson F.M. Transgenes display stable pat-terns of expression in apple fruit and Mendelian segregation in the progeny. //Bio. Technology – 1996. – V.14. – P.56–60.
2. James D.J., Passey A.J., Barbara D.J., Bevan M. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill) using a disarmed Ti-binary vector. // Plant Cell Rep. – 1989. – V.7. – P.658-666.
3. Gray J., Picton S., Shabbeer J., Schuch W., Grierson D. Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. Plant Molecular Biology. – 1992. – V.19. – P.69–87.
4. Rogers S. O. and Bendich A J. Extration of total cellular DNA from plants, algae and fungi. // Plant Molecular Biology Manual [eds. S. B.Gelvin, R.A.Schilperoort]. –Dordrecht: Kluwer Academic Publish. – 1994. – P.1–8.
5. Meisel L., Fonseca B., Gonzalez S. et al. A rapid and efficient method for high quality total RNA from peaches for functional genomics analyses // Biol. Res.-2005.-V.38.-P.83-88.

GENETIC ANALYSIS OF TRANSGENIC APPLE PLANTS CONTAINING A COMPLIMENTARY HAIRPIN STRUCTURE TO THE SECOND EXON OF THE APPLE GENE ACO

Klementjeva A.A.¹, Sklyar Y.A., Pushin A.S.¹, Timerbayev V.R.², Dolgov S.V.^{1,2}

apple, fruit ripening stage, ACC-oxidase, RNA interference, polygalacturonase, RT-PCR

The aim of this study is to determine the level of ethylene synthesis in apple plants containing the hairpin structure complementary to the second exon of the apple gene ACO (self-complementary gene fragments ACC oxidase of apple plants in different orientations of the anti-sense-sense and sense-antisense). In our studies we have confirmed the presence of the target gene ACO in 48 of 62 transgenic lines. Analyzed expression of gene ACO and *pdk*-intron in the leaves of the transgenic lines we suggest that the obtained fruits of these lines will have delayed period of maturation.

**РОЛЬ ФУНГИЦИДА КАРАМБА В ПОВЫШЕНИИ ПРОДУКТИВНОСТИ
АГРОЦЕНОЗОВ РАПСА (*BRASSICA NAPUS L.*) В УСЛОВИЯХ
КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ**

Козаченко И.С., Григорович Л.М.

ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет»,
Советский пр., 1, г. Калининград, 236022, Россия, E-mail: agronomia@mail.ru

рапс, технология, фунгицид, эффективность

В условиях Калининградской области озимая форма рапса периодически страдает от неблагоприятной перезимовки, а вегетация растений ярового рапса существенно сокращается за счет негативного влияния болезней и ускоренного развития растений в условиях длинного светового дня. Создание благоприятных условий для растений путем введения в технологические схемы возделывания современных приемов, оптимизирующих негативные процессы, является одной из самых актуальных проблем в повышении продуктивности агроценозов рапса в условиях региона. Среди таких приемов - применение фунгицида Карамба, который, кроме подавляющего действия на развитие болезней, регулирует рост и развитие растений.

Цель наших исследований - изучение влияния фунгицида Карамба (действующее вещество метконазол, производитель – фирма БАСФ, Германия) на рост и развитие растений рапса в агроэкологических условиях Калининградской области [1].

Серия полевых испытаний проведена в ряде хозяйств в агроценозах ярового рапса, где подобраны участки с идентичными характеристиками: тип почвы - дерново-слабоподзолистая глееватая, по гранулометрическому составу - средний суглинок; окультуренность – средняя; рН_{сол.} 4,8 -6,5; содержание гумуса 1,9-3,72 %; доступных форм фосфора 7,6-25 мг/100 г; обменного калия 12-21,8 мг/100 г; серы 6-8 мг/кг. Посев семян проводился в третьей декаде апреля с нормой высева 3,2 - 3,5 кг/га. Величину и качество урожая семян, биометрические показатели растений определяли стандартными методами [2].

Карамба - системный фунгицид, предназначен для контроля альтернариоза (*Alternaria brassicola* Sacc.) и фомоза (*Phoma lingam* Desm.), а также повышения устойчивости к полеганию. Рекомендован для опрыскивания растений ярового рапса в фазе начала вытягивания стеблей – начала образования стручков в нижнем ярусе с нормой расхода 0,75-1 л/га [3].

Результаты исследований свидетельствуют, что применение регуляторов роста из группы азолов, к которым относится Карамба, позволяет направленно регулировать отдельные этапы роста и развития растений, это мобилизует потенциальные возможности, заложенные в гено-типе растения. При этом в растениях повышается содержание цитокининов, которые подавляют действие фитогормонов (гиббереллинов и ауксинов), стимулирующих рост клеток [4].

Опрыскивание фунгицидом Карамба через месяц после посева по растениям в фазе начала стеблевания (стадия развития 30 по Zadoks) в полевых испытаниях вегетационных сезонов 2011-2012 гг. в КФХ ИП Фон Дер Деккен В.С. и ООО «Долгов и К» продемонстрировало положительные результаты [5; 6], которые были подтверждены опытами 2013 г. На опытных участках ярового рапса препарат стимулировал образование мощной корневой системы (длина в среднем от 15,9 до 22,1 см, диаметр корневой шейки от 8,4 до 9,9 мм) и рост боковых побегов – в среднем от 6,5 до 9,1 шт. у каждого растения, снизил высоту растений в среднем на 8,3-15,9 см, обеспечил дружное равномерное цветение и выравненность растений (табл. 1).

Введение фунгицида Карамба в технологию возделывания ярового рапса в хозяйствах Калининградской области для опрыскивания растений в фазе начала стеблевания (стадия развития 30 по Zadoks) с нормой расхода 0,7 – 1 л/га позволило повысить продуктивность

агроценозов этой культуры: урожайности семян увеличилась в 1,5 раза (от 29,2 до 35,4 ц/га) по сравнению с вариантом без обработки.

Таблица 1 - Эффективность фунгицида Карамба в посевах ярового рапса, гибрид Юра, КФХ ИП Фон Дер Деккен В.С., 2013 г.

Table 1 - Efficiency of caramba fungicide in the process of spring rape cultivation, hybrid Yura, at the peasant farm enterprise of the Private Entrepreneur Von Der Deckken V.S., 2013

Вариант	Корень			Количество боковых побегов, шт.	Высота растений, см	Урожайность, ц/га
	длина, см	диаметр шейки, мм	сухая масса, г			
Карамба, 0,75 л/га	16,0	8,4	4,3	6,5	115,1	32,7
Контроль, без обработки	11,7	5,6	2,9	4,0	123,4	23,6
±, к контролю	+ 4,3	+2,8	+ 1,4	+ 2,5	- 8,3	+ 9,1

Литература

1. Брысозовский И. И. Справочник агронома по химизации сельского хозяйства / И. И. Брысозовский, Л. М. Григорович, В. И. Панасин. – Калининград, 2008. – 352 с.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. - М., 1985. – 351 с.
3. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории РФ. – М., 2013. - Справочное издание, 636 с.
4. Рапс / Д. Шпаар, Н. Маковски, В. Захаренко, А. Постников, и др. – Минск, 1999. – 208 с.
5. Григорович, Л.М. Опыт применения фунгицида Карамба в посевах ярового рапса (*Brassica napus* L. ssp. *Oleifera annua* Metzger) / Л.М. Григорович, И.С. Козаченко // Инновации – сельскому хозяйству / Всероссийская научно-практическая конференция (Калининград, 24-27 сентября, 2013) / КГТУ. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВПО «КГТУ», 2013. – С. 17-19.
6. Григорович Л.М. Эффективность фунгицида Карамба при возделывании ярового рапса (*Brassica napus* L. ssp. *Oleifera annua* Metzger) в Калининградской области / Л.М. Григорович, И.С. Козаченко // Научные достижения – в сельскохозяйственную практику: межвузовский сборник научных трудов. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет», 2012. - С.118-122.

EFFICIENCY OF CARAMBA FUNGICIDE IN THE PROCESS OF SPRING RAPE (*BRASSICA NAPUS* L.) CULTIVATION IN KALININGRAD REGION

Kozachenko I.S., Grigorovich L.M.

spring rape, process, fungicide, efficiency

Caramba fungicide performance test over the sowings of spring rape in Kaliningrad region has showed the successful results: yield of seed grains has increased 1,5-fold and reached the amount of 29,2-35,4 hundreds kilograms per hectare.

ВЛИЯНИЕ ГЕНА БИОСИНТЕЗА АУКСИНА *TMS1* НА КЛУБНЕОБРАЗОВАНИЕ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO*

Колачевская О.О.¹, Алексеева В.В.², Сергеева Л.И.¹, Ломин С.Н.¹, Гетман И.А.¹,
Рукавцова Е.Б.², Бурьянов Я.И.², Романов Г.А.¹

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, г.
Москва, 127276, Россия, E-mail: gar@ipgras.ru

²ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и
Ю.А.Овчинникова РАН, пр. Науки, 6, г. Пущино Московской обл., 142290, Россия

картофель, ауксины, ген tms1, клубнеобразование, продуктивность

Введение

Картофель является одной из основных сельскохозяйственных культур в мире, поэтому вопросы регуляции клубнеобразования и роль фитогормонов в этом процессе имеют не только научное, но и большое практическое значение [1]. В случае ауксинов были получены данные о том, что введение ИУК в среду культивирования картофеля увеличивало число и ускоряло рост клубней [2, 3], а выросшие в почве более крупные клубни содержали больше ИУК по сравнению с более мелкими [4]. Недавно было показано, что концентрация ауксинов в кончиках столонов возрастала в несколько раз непосредственно перед инициацией клубней [5]. Все это указывало на существенную роль ауксинов в процессах инициации и роста клубней. В этой связи представляло интерес изучить эффекты направленного изменения эндогенного содержания ауксинов в растениях картофеля, с использованием трансгенного подхода.

Материалы и методы

Объектом исследования служили растения картофеля сорта Дезире, которые выращивали на агаризованной среде Мурасиге-Скуга без гормонов с добавлением 2% сахарозы. Агробактериальный ген триптофанмонооксигеназы (*tms1*, или *iaaM*), отвечающий за первый этап биосинтеза ИУК, был клонирован в бинарный растительный вектор pV33-Vin под контроль тканеспецифичного промотора гена пататина класса I (V33-промотор). Для трансформации листья 4-недельных пробирочных растений картофеля отрезали и помещали чашки Петри с 30-40 мл разбавленной агробактериальной суспензии. Чашки помещали на 15 мин на шейкер при комнатной температуре и затем инкубировали 48 ч в темноте.

Анализ геномной ДНК и кДНК трансгенных растений методом ПЦР проводили на амплификаторе Терцик (ДНК-Технология). Реакцию проводили в объёме 25 мкл, содержащем 2.5 мкл dNTP, 2.5 мкл 10x буфера (Силекс), 0.3 мкл Hot-Taq полимеразы, 5 мкл геномной ДНК или 1 мкл кДНК, и по 10 пмоль каждого праймера. После начальной денатурации в течение 2 мин при 95°C, проводили 30 циклов ПЦР (денатурация при 95°C в течение 50 с, отжиг при 55°C в течение 60 с, синтез при 72°C в течение 30 с) и выдерживали в конце 5 мин при 72°C.

ПЦР реального времени проводили на амплификаторе АНК-32 (Синтол). Реакцию проводили в объёме 25 мкл, содержащем 12.5 мкл SYBR-Green; 1 мкл кДНК (не менее 100 нг вещества) и по 0.1 мМ каждого праймера. Праймеры подбирали так, чтобы длина амплифицируемых фрагментов составляла ≈ 100 н.п. Аналитическая повторность опытов трехкратная. После начальной денатурации в течение 10 мин при 95°C проводили 30 циклов ПЦР-РВ (денатурация при 95°C в течение 15 сек, отжиг при 60°C в течение 30 сек, синтез при 72°C в течение 30 сек) и выдерживали в конце 5 мин при 72°C.

Исходное количество ДНК-матриц определяли по калибровочным прямым, построенным по данным ПЦР-РВ для генов домашнего хозяйства картофеля (актина и тубулина), взятых в четырёх концентрациях (исходная концентрация ДНК, разведения $\times 10^{-1}$, $\times 10^{-2}$, $\times 10^{-3}$).

Определение ИУК в экстрактах тканей проводили со стандартом ИУК на tandemном квадрупольном масс-спектрометре Waters Xevo. Количество ИУК определяли по калибровочной кривой с известными количествами стандартов. Результаты анализировали, используя программное обеспечение MassLynx4.1 (Waters).

Результаты и обсуждение

Полученные в результате агробактериальной трансформации линии растений картофеля характеризовались устойчивостью к антибиотику канамицину, содержали рекомбинантную генетическую конструкцию *B33:tms1*, которая на первом этапе роста (1 месяц), включающем его вегетативную фазу и начало клубнеобразования, экспрессировалась преимущественно в клубнях. Эти особенности растений стабильно воспроизводились в потомстве при их вегетативном размножении. Определение гормонального статуса изучаемых линий картофеля показало повышенное содержание ауксина, приуроченное именно к клубням.

Исследование характеристик клубнеобразования трансгенных растений картофеля проводили в модельной системе *in vitro* на искусственной питательной среде известного состава, в строго контролируемых условиях температуры и освещения. Такая модельная система позволяет за короткое время оценить с необходимой статистической достоверностью продукционный потенциал растений картофеля при различных условиях выращивания.

Согласно полученным данным, клубнеспецифичная экспрессия гена *tms1* в трансгенных растениях ускоряла начало клубнеобразования при различных фотопериодических режимах (длинный или короткий день).

Урожайность трансформантов картофеля в сравнении с контрольными растениями приведена в табл. 1, 2.

Таблица 1 - Урожайность (мг клубней на 1 растение) растений в возрасте 6 недель при культивировании *in vitro* в условиях короткого дня (КД) при различном содержании сахарозы в среде

Table 1 - Tuber yield (mg per plant) of 6-week old plants grown *in vitro* at short day (SD) and various sucrose content in the medium

Растения	3% сахарозы	5% сахарозы	8% сахарозы
Контроль	3±1	21±2	32±1
A1-2	8±1	33±2	60±3

Таблица 2 - Урожайность (мг клубней на 1 растение) растений в возрасте 6 недель при культивировании *in vitro* в условиях длинного дня (ДД) при различном содержании сахарозы в среде

Table 2 - Tuber yield (mg per plant) of 6-week old plants grown *in vitro* at long day (LD) and various sucrose content in the medium

Растения	3% сахарозы	5% сахарозы	8% сахарозы
Контроль	6±1	26±1	32±1
A1-2	29±2	90±2	195±1

Как видно на примере линии A1-2 (табл. 1 и 2), трансформированные растения обладали более высокой (в диапазоне от 1.6 до 6 раз) урожайностью по сравнению с исходными не трансформированными растениями при всех условиях культивирования в модельных системах, включая неоптимальное для клубнеобразования содержание сахарозы в среде культивирования.

Заключение

В результате исследования показана возможность получения сортов картофеля повышенной продуктивности с помощью нового подхода: изменения гормонального баланса растения на заданной стадии развития и в заданном органе путём введения дополнительного гена биосинтеза ауксина *tms1* под контролем клубнеспецифичного промотора B33. Этот генно-

инженерный подход в перспективе может найти применение для получения раннеспелых и более продуктивных линий на основе различных сортов картофеля.

Литература

1. Aksenova N.P., Sergeeva L.I., Kolachevskaya O., Romanov G.A. Hormonal regulation of tuber formation in potato. In: *Bulbous Plants: Biotechnology*. Boca Raton (USA). CRC Press, Taylor & Francis Group. 2013. P. 3-36.

2. Аксенова Н.П., Константинова Т.Н., Голяновская С.А., Коссман Й., Вильмитцер Л., Романов Г.А. Генетические трансформанты картофеля как модель изучения гормональной и углеводной регуляции клубнеобразования // *Физиология растений*. 2000. Т. 47. С. 420-430.

3. Romanov G.A., Aksenova N.P., Konstantinova T.N., Golyanovskaya S.A., Kossmann J., Willmitzer L. Effect of indole-3-acetic acid and kinetin on tuberization parameters of different cultivars and transgenic lines of potato *in vitro* // *Plant Growth Regul.* 2000. V. 32. P. 245-251.

4. Пузина Т.И., Кириллова И.Г., Якушкина Н.И. Динамика индолилуксусной кислоты в органах картофеля на разных этапах онтогенеза и ее роль в регуляции роста клубней // *Изв. АН. Сер. биол.* 2000. № 2. С. 170-177.

5. Roumeliotis E., Visser R.G., Bachem C.W. A crosstalk of auxin and GA during tuber development // *Plant Signal. Behavior*. 2012. V. 7. P. 1360-1363.

THE EFFECT OF AUXIN BIOSYNTHESIS GENE *TMS1* ON POTATO TUBERIZATION *IN VITRO*

Kolachevskaya O.O., Alexeeva V.V., Sergeeva L.I., Lomin S.N., Getman I.A., Rukavtsova E.B., Buryanov Y.I., Romanov G.A.

potato, auxin, gene tms1, tuberization, productivity

The auxin biosynthesis gene *tms1* from *Agrobacterium tumefaciens* driven by the tuber specific patatin B33-promoter was inserted into the genome of potato plants grown *in vitro*. The expression of *tms1* in transgenic plants was characterized by molecular methods. Some of the lines transformed with *tms1* demonstrated earlier tuberization and higher productivity.

СОЗДАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ ФОРМ КОРМОВЫХ ЗЛАКОВЫХ ТРАВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНОМНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Кондрацкая И.П.¹, Столепченко В.А.², Нам И.Я.³, Васько П.П.², Фоменко Т.И.¹

¹ГНУ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2в, г. Минск, 220012, Беларусь, E-mail: ikondratskaya@mail.ru

²РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию», ул. Тимирязева, 1, г. Жодино, 222160, Беларусь

³ФГБОУ ВПО «Брянский государственный университет им. академика И.Г.Петровского», ул. Бежицкая, 14, г. Брянск, 241036, Россия

межвидовые гибриды, ДНК, ISSR-анализ

Введение

Основные направления селекции многолетних злаковых трав направлены на создание генотипов с хорошей отрастаемостью и стабильностью урожая; высокой устойчивостью к основным болезням, зимостойкостью, теневыносливостью; хорошей конкурентной способностью в многокомпонентных травостоях; а также стабильной семенной продуктивностью.

Эффективность использования отдаленной гибридизации для создания новых форм растений с реконструированными геномами значительно возросла благодаря современным методам *in vitro*, молекулярной генетики и цитогенетики. Скрещивание представителей различных видов и родов позволяет не только улучшать сорта существующих культурных растений, но и создавать совершенно новые, сельскохозяйственные культуры с хозяйственно-ценными признаками.

Результатом нашей работы по межвидовой гибридизации с использованием выявленных ген-источников хозяйственно-ценных признаков («продуктивность кормовой массы и мягкость листьев») было создание овсяницы тростниковой «Таямница», которая включена в селекционный процесс.

В данной работе представлены исследования по созданию межвидовых гибридов лисохвоста лугового и лисохвоста вздутого

Нами предпринята попытка разработать геномную технологию селекции лисохвоста лугового на основе дубликации генома, интрогрессивной гибридизации с использованием ДНК-маркирования с целью целенаправленно преобразования генома, расширения генофонда исходного материала и повышения эффективности селекции.

Метод ISSR широко используется при обнаружении внутривидового полиморфизма, в первую очередь у близкородственных генотипов культивируемых растений. Это особенно актуально в связи с программами современной селекции сортов принципиально нового качественного уровня, для которой требуется создание обширного генофонда исходного материала, сочетающего множество хозяйственно-ценных признаков, что не возможно без расширения генетического пула предварительной оценки природного разнообразия вида.

ISSR-маркеры с успехом использовались для оценки полиморфизма у таких культур, как кукуруза [22, 23], ячмень [22, 24], ярового тритикале [25], пшеница [22, 26], гречихи [27] и других сельскохозяйственных культур. Нами была предпринята попытка показать полиморфизм межвидовых гибридов лисохвоста.

Материалы и методы

Объектом исследования служили родительские и гибридные формы лисохвоста лугового (*Alopecurus platensis* L.) и лисохвоста вздутого (*Alopecurus ventricosus* Pers.). При скрещивании близкородственных видов для преодоления постгамной несовместимости, выражаю-

щейся в атрофии эндосперма, применялся метод извлечения зародыша и выращивания его на искусственных питательных средах.

Выделение ДНК проводили из семян и листьев межвидовых гибридов лисохвоста. Для ISSR-анализа использовали 3 праймера, которые содержали динуклеотидные повторы: ISSR 2 (AC)₈G, ISSR 3 (GA)₈C и ISSR 5 (CA)₇RC. Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 20 мкл содержала: dNTP, MgCl₂, праймер, буфер, Taq-полимеразу и 8нг ДНК. Условия амплификации были следующие: начальная денатурация 5 мин при 94⁰С, 32 цикла: денатурация при 94⁰С -45⁰С, отжиг при рассчитанной температуре – 56⁰С, элонгация при 72⁰С -90⁰С, заключительная элонгация 7 мин при 72⁰С. Продукты реакции разделяли в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия при 110 V.

Результаты и обсуждение

В результате проведения гибридизации в фитотронно-тепличном комплексе и полевых условиях, отбора по хозяйственно-ценным признакам было получено 14 высокопродуктивных форм межвидовых гибридов лисохвоста.

ISSR-маркеры с успехом использовались для оценки полиморфизма у таких культур, как кукуруза [22, 23], ячмень [22, 24], ярового тритикале [25], пшеница [22, 26], гречихи [27] и других сельскохозяйственных культур. Нами была предпринята попытка показать полиморфизм межвидовых гибридов лисохвоста.

Анализ ISSR-PCR образцов ДНК, выделенных из семян межвидовых гибридов лисохвоста показал, что основная зона фрагментов расположена в диапазоне 200–2050 п.н. Каждый из образцов имел свой определенный спектр амплифицируемых фрагментов, отличающийся количеством, размером и степенью выраженности.

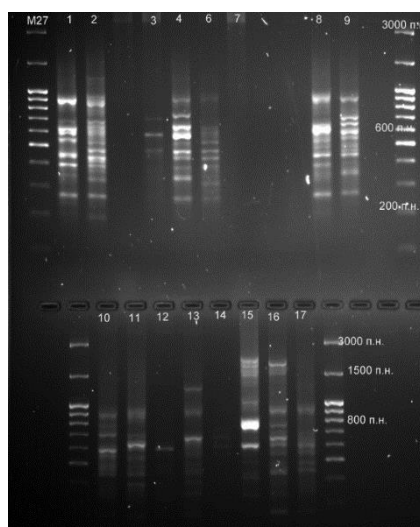


Рисунок 1 - ISSR-PCR анализа ДНК из семян межвидовых гибридов лисохвоста
Figure 1 - Analysis of DNA of inter-specific hybrids of foxtail with ISSR-PCR method

Следует отметить, что все амплифицированные фрагменты были полиморфными, то есть степень полиморфизма, выявляемая с помощью ISSR 2-праймера, составила 100 %. Число локусов, полученных при амплификации ДНК исследуемых образцов для ISSR2 варьировало от 3 до 14, наибольшее количество полиморфных фрагментов у сортообразцов 1,2,4,6,8,9,15,16. Из общего количества фрагментов выделяются два ампликона у сортообразца 8 с длиной 601 п.н и у сортообразца 16 с длиной 750 п.н.

Анализ ISSR-PCR образцов ДНК, выделенных из листьев межвидовых гибридов лисохвоста, показал, что использование праймеров IS2, IS3, IS5 позволяет получить достаточно высокий полиморфизм ДНК, отражающий генетическое разнообразие полученных гибридных форм (рис. 2).

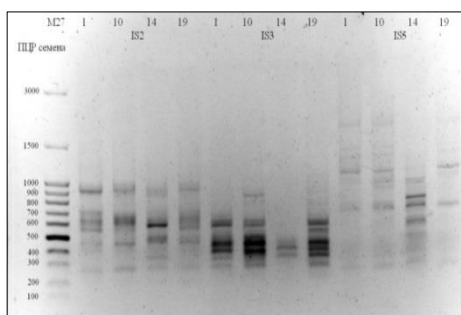


Рисунок 2 - ISSR-PCR –анализ ДНК из листьев межвидовых гибридов лисохвоста.
Figure 2 - Analysis of DNA of inter-specific hybrids of foxtail with ISSR-PCR method

Выводы

Результатом проведенной работы явилось создание межвидовых гибридов лисохвоста лугового (*A. pratensis*) с лисохвостом вздутым (*A. ventricorus*). Анализ гибридов по ДНК- маркам методом ISSR-PCR выявил высокий полиморфизм образцов. Комплексная оценка созданных форм межвидовых гибридов лисохвоста лугового (*A. pratensis*) с лисохвостом вздутым (*A. ventricorus*) на анализирующих фонах позволила провести отбор морфотипов с высоким качеством корма и стабильной семенной продуктивностью.

Литература

1. Moose SP, Mumm RH., 2008. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiol* 147: 969-977.
2. Gupta S., R.K. Varshney, P.C. Sharma, B. Ramesh, 1999. Molecular markers and their application in wheat breeding. *Plant breeding*. 118: 369–390.
3. Васько П.П., 2000. Продуктивность многолетних злаковых трав и пути ее повышения. *Земледелие и растениеводство: Научные труды / Белорусский научно-исследовательский институт земледелия и кормов*. Минск. 37: 113-119.
4. Кондрацкая И.П., Столепченко В.И., Фоменко Т.И. Биохимическая характеристика межродовых гибридов райграса пастбищного и овсяницы луговой. «Проблемы и пути повышения эффективности растениеводства в Беларуси»: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию образования Института земледелия.- Минск.- 2007.- С.124-127.
5. Столепченко В.А., Кондрацкая И.П., Васько П.П., Фоменко Т.И. Разработка биотехнологических подходов создания межвидовых гибридов лисохвоста. Факторы экспериментальной эволюции организмов, Киев, 2013, т 12, с. 313-318.

CREATION AND IDENTIFICATION OF HIGHLY PRODUCTIVE FORMS OF FEED CEREAL GRASSES WITH THE HELP OF GENOMIC BIOTECHNOLOGY

Kondratskaya I.P., Stolepchenko V.A., Nam I.Y., Basko P.P., Fomenko T.I.

inter-specific hybrids, DNA, ISSR-PCR

Analysis of inter-specific hybrids by DNA markers by ISSR-PCR method allowed revealing high polymorphism of samples. Complex assessment of the created forms of interspecific hybrids of a foxtail meadow (*Alopecurus pratensis* L.) with a foxtail blown up (*Alopecurus ventricorus* Pers.) on analyzing backgrounds I allowed to make selection of morphotypes with high quality of a forage and stable seed efficiency.

**УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК НЕМОРФОГЕННОГО КАЛЛУСА
ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ**

Костюкова Ю.А., Румянцева Н.И.

ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, ул. Лобачевского, 2/31,
а/я 30, г. Казань, 420111, Россия, E-mail: j.kostyukova@mail.ru*гречиха татарская, каллус, ультраструктура клеток***Введение**

Каллусные культуры растений представляют удобную модель для физиологических и биохимических исследований. Сведения о строении и организации органелл клеток в процессе культивирования позволяют не только глубже понять физиологические особенности объекта исследования, но и правильно интерпретировать реакцию культуры на определенное экспериментальное воздействие. В данной работе описаны изменения ультраструктуры клеток неморфогенного каллуса гречихи татарской в ходе культурального цикла.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали неморфогенные каллусы гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn линии 1-8р. Неморфогенный каллус был отселектирован как клон, сформированный на морфогенном каллусе, полученном из незрелого зародыша. Приготовление препаратов для электронномикроскопических исследований проводили по общепринятой методике с фиксацией в 2.5%-ном глютаровом альдегиде на фосфатном буфере и постфиксацией в 1%-ном OsO₄. Полутонкие гистологические срезы окрашивали 0,5%-ным раствором толуидинового синего в 0.1%-ном растворе Na₂CO₃. Цитохимическое выявление липидов осуществляли, используя Судан III. Электронномикроскопические срезы просматривали на микроскопе Jeol 1200SX (Япония).

Результаты и обсуждение

Проведенные гистологические и электронномикроскопические исследования каллусных культур гречихи на 4 и на 11 дни культивирования свидетельствуют об изменении строения органелл каллусных клеток в течение пассажа. Неморфогенные каллусы гречихи татарской образованы паренхимными клетками. Большую часть клетки занимает центральная вакуоль, ядро имеет пристенное положение. Характерной особенностью ядер каллуса является наличие многочисленных глубоких лопастей. *In vivo* лопастные ядра описаны в клетках нектарников *Padus racemosa*, клетках запасяющей ткани *Ricinus communis*, в жгучих клетках *Urtica dioica* [1], корневых волосках *Raphanus sativus* [2]. *In vitro* лопастную или нерегулярную форму ядра наблюдали в неморфогенных каллусах *Beta vulgaris* [3], *Plantago asiatica* [4], *Allium fistulosum* [5]. Лопастная форма ядра в клетках, не подверженных действию стресса, обусловлена увеличением количества ДНК в ядре и наблюдается в дифференцированных, неделящихся клетках (как результат эндоредупликации), а также в делящихся полиплоидных клетках. Bourdon и соавт. [6] была выявлена корреляция между увеличением содержания ДНК в дифференцированных клетках перикарпия томата и изменением их формы от округлой к лопастной. Авторами было показано, что увеличение пloidности клеток сопровождается увеличением глубины ядерных лопастей, а также площади ядра. Известно, что увеличение размеров площади поверхности ядра в полиплоидных клетках активизирует ядерно-плазменные отношения, что выражается в усилении обмена белками и рибонуклеопротеидами между ядром и цитоплазмой. Проведенный ранее подсчет хромосомных чисел в клетках неморфогенных каллусов гречихи татарской показал преобладание в них полиплоидных клеток [7], что, по-видимому, объясняет наличие лопастных ядер в каллусных клетках. Интересным наблюдением можно считать скопление митохондрий в инвагинациях ядер, по-видимому, в тех участках клетки, где возникает наибольшая потребность в АТФ;

аналогичная локализация митохондрий была отмечена в клетках перикарпия томата, имеющих ядра с большими лопастями [6].

На 4 день культивирования в клетках каллуса преобладали ядра с ядрышками, ядра с ядрышковыми вакуолями, что свидетельствует об активном синтезе рРНК. Эндоплазматический ретикулум (ЭР) представлен короткими шероховатыми цистернами. Вокруг цистерн аппарата Гольджи (АГ) многочисленны везикулы, что может свидетельствовать об активном синтезе полисахаридов и белков, основных компонентов экстраклеточного матрикса. Присутствие густого секрета в межклетниках каллуса позволяет сделать вывод об усилении процессов экстраклеточной секреции. Ранее было отмечено, что основной пик митотической активности клеток неморфогенного каллуса гречихи татарской наблюдается через сут. культивирования каллуса [7]. На 4 сут. клетки находятся на экспоненциальной фазе роста, происходит рост вакуоли, активный синтез компонентов клеточных стенок, клетки увеличиваются в размере. Окрашивание Суданом III выявило незначительное количество липидных капель в цитоплазме. К 4-ому дню культивирования в недавно поделившихся клетках митохондрии имеют округлую форму, матрикс средней плотности, расширенные кристы и просветления в центральной части органелл. Пластиды, в основном, чашевидные, с редкими мелкими крахмальными зёрнами. Поскольку неморфогенные каллусы гречихи не способны к фотосинтезу – они являются гетеротрофными культурами, и их рост полностью зависит от сахарозы и минеральных элементов среды культивирования. Тем не менее, в первые дни пассирования в клетках неморфогенного каллуса происходит гидролиз крахмала амилопластов и липидов сферосом. Можно предположить, что увеличение пула свободных сахаров вследствие гидролиза запасных углеводов и жиров и вовлечение их в процессы гликолиза, цикл Кребса и пентозофосфатный шунт обеспечивает высокую синтетическую активность клеток каллуса, необходимую для активного и достаточно синхронного деления. Установлено, что в пластидах гетеротрофной культуры томата на экспоненциальной фазе роста до 78% глюкозо-6-фосфата метаболизируется через пентозофосфатный шунт [8]. Гликолиз, который позволяет метаболизировать запасенный крахмал в триозы, которые затем экспортируются из пластид и вовлекаются в дыхательные циклы, вероятно, также активен на экспоненциальной фазе роста культуры.

На 11 сут. культивирования неморфогенный каллус гречихи татарской находится на стационарной фазе роста. К этому времени клетки не только уже не делятся, но и перестают растягиваться. Увеличение свободного пула гексоз на стационарной фазе роста каллуса полностью зависит от утилизации сахарозы из среды культивирования, которая обеспечивается активностью инвертаз, переносчиков сахарозы и сахарозосинтазы. Органеллы клетки приобретают признаки, характерные для клеток со сниженной метаболической активностью: лопастные ядра без ядрышек, в нуклеоплазме – отдельные глыбки гетерохроматина, ЭР представлен короткими шероховатыми цистернами, АГ образован расширенными цистернами. Экстраклеточный матрикс в межклетниках отсутствует. На 11 день в цитоплазме клеток присутствуют амилопласты с большими, простыми зёрнами крахмала. Как установлено Rontein и соавт. [8] на гетеротрофной суспензионной культуре томатов, аккумуляция крахмала достигает наибольших значений на стационарной фазе роста культуры, хотя синтез крахмала в клетках начинается сразу после того, как клетки прекращают деление. При этом синтез компонентов клеточных стенок, активный на экспоненциальной фазе роста, на стационарной фазе полностью прекращается. Можно предположить, что активность пентозофосфатного цикла и гликолиза в пластидах на стационарной стадии роста неморфогенного каллуса гречихи татарской значительно снижается и гексозофосфат вовлекается главным образом в синтез крахмала. К 11 дню культивирования в цитоплазме увеличивается количество липидных капель. Митохондрии в клетках на 11 сут. культивирования – удлинённые, с развитой системой крист, нередко делятся почкованием, что может свидетельствовать об активации происходящих в них метаболических процессов по сравнению с 4 сутками культивирования. Известно, что в митохондриях происходит превращение пирувата в ацетил-КоА; в том случае, если

энергетические потребности клетки не велики – работа дыхательной цепи тормозится, а ацетил-КоА используется в синтетических процессах, например, синтезе липидов.

Выводы

Показано, что неморфогенный гетеротрофный каллус гречихи татарской на стационарной стадии роста накапливает запасные соединения: крахмал и липиды, которые гидролизуются и используются в ходе активного деления и растяжения клеток при переводе культуры на новую среду. Высокая метаболическая активность культуры, вероятно, обусловлена полиплоидной природой каллуса, имеющего крупные ядра с многочисленными глубокими инвагинациями.

Работа была выполнена при поддержке РФФИ (грант №13-04-97136-р-поволжье-а)

Литература

1. Васильев А.Е. Секреторные структуры//Атлас ультраструктуры растительных тканей. 1980. С.235-278.
2. Данилова М.Ф., Бармичева Е.М. Ризодерма//Атлас ультраструктуры растительных тканей. 1980. С.286-307.
3. Häsler J., Wuest J., Gaspar T., Crevecouer M. Long-term *in vitro* cultured plant cells show typical neoplastic features at the cytological level// Biol. Cell. 2003.V.95. P.357-364.
4. Makowczynska J., Andrzejewska-Golec E., Marek K. Cream-coloured and green coloured lines of the non-morphogenic callus of *Plantago asiatica* L.- ultrastructure analysis// Acta societatis botanicorum Poloniae. 2005. V.74. P.187-192.
5. Joachimiak A., Ilnicki T. Nuclear morphology, polyploidy and chromatin elimination in tissue culture of *Allium fistulosum* L.//Acta Societatis botanicorum Poloniae. 2003. Vol. 72. P.11-17
6. Bourdon M., Pirrello J., Cheniclet C., Coriton O., Bourge M., Brown S., Moïse A., Peypelut M., Rouyere V., Renaudin J.-P., Chevalier C., Frangne N. Evidence for karyoplasmic homeostasis during endoreduplication and a ploidy-dependent increase in gene transcription during tomato fruit growth // Development. 2012. V.139. P.3817-3826.
7. Сибгатуллина Г.В., Румянцева Н. И., Хаертдинова Л. Р., Акулов А. Н., Тарасова Н. Б., Гумерова Е.А. Получение и характеристика устойчивой к аминотриазолу линии морфогенного каллуса *Fagopyrum tataricum* //Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 701–709
8. Rontein D., Dieuaide-Noubhani M., Dufourc E.J., Raymond P., Rolin D. The metabolic architecture of plant cells. Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells// The J. Biol. Chem. 2002. V.277. P.43948-43960.

THE ULTRASTRUCTURE OF NON-MORPHOGENIC CALLUS OF TATAR BUCKWHEAT

Kostyukova Yu., Rumyantseva N.I.

tatar buckwheat, callus, ultrastructure

The electron microscopy study of ultrastructure of non-morphogenic callus cells of tatar buckwheat showed that the greatest changes in a structure of organelles during a culture cycle were observed in mitochondria and plastids. Substantially, these changes are caused by synthesis of starch and lipids on a stationary growth phase of culture and their oxidation during active division and expansion of callus cells – on an exponential phase.

**БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА СТЕВИИ
(*STEVIA REBAUDIANA BERTONI*)**

Кочетов А.А.¹, Соловьева А.Е.²

¹ГНУ Агрофизический научно-исследовательский институт РАСХН,
Гражданский проспект, 14, г. С.-Петербург, 195220, Россия, E-mail: kochetoval@yandex.ru

²ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства
им. Н.И. Вавилова РАСХН, ул. Б. Морская, 42-44, г. С.-Петербург,
190000, Россия, E-mail: alsol64@mail.ru

стевия, различные генотипы, фенольные соединения, органические кислоты, антиоксидантная активность

Условия окружающей среды, образ жизни и питание современного человека резко повысили уровень радикалообразующих процессов в его организме. Возникновение нарушения баланса между воздействием прооксидантных факторов и функциональными возможностями физиологической антиоксидантной системы организма ведет к избыточному неферментному свободнорадикальному окислению (1) и может служить причиной различных болезней, таких как онкология, атеросклероз, нарушение мозгового и коронарного периферического кровообращения, преждевременное старение и других. Снижение негативного действия свободных радикалов можно обеспечить как за счет увеличения содержания антиоксидантов в продуктах питания, так и за счет использования биологически активных добавок, содержащих комплексы флавоноидов, витаминов (А, Е, С) и минералов.

В последнее время в результате многочисленных исследований существенно увеличился перечень растений, с высоким содержанием природных антиоксидантов. Особенно это касается новых и малораспространенных культур, среди которых необходимо выделить стевию (*Stevia rebaudiana Bertoni*). Широкую известность это растение получило лишь в последние 20-30 лет, благодаря использованию содержащихся в ней природных натуральных диетических подсластителей, превышающих по сладости сахарозу в 300 и более раз. Кроме этих хорошо изученных сладких дитерпеновых гликозидов, в листьях стевии содержатся флавоноиды, оксикоричные кислоты (кофейная, хлорогеновая), водорастворимые хлорофиллы и ксантофиллы, витамины А, С, Д, Е, К, Р, сапонины, дубильные вещества (2,3). Результаты, полученные в ряде исследований, показывают, что *S. rebaudiana* имеет значительный потенциал для использования ее в качестве природного антиоксиданта(4,5).

В лаборатории экофизиологии растений Агрофизического института проводятся многолетние комплексные исследования по интродукции стевии в Россию. Разработана и реализована технология круглогодичного культивирования стевии с использованием светокультуры для сохранения растений стевии в зимнее время, их размножения и последующего выращивания в открытом грунте с целью получения урожая сухих листьев и переработки(6,7). Проведен отбор наиболее продуктивных генотипов для открытого грунта Ленинградской области. Целью настоящей работы явилось изучение биохимических различий по комплексу биологически активных веществ среди отобранных генотипов стевии.

Материалы и методы

Для биохимического анализа брали свежие листья от 3-х генотипически различных образцов стевии из коллекции Агрофизического НИИ с разной продуктивностью и морфологией. Растения выращивали в светокультуре под лампами ДНаТ-400 при облученности 30-50 Вт/м² ФАР на длинном дне. Морфологические особенности и продуктивность разных генотипов, использованных при анализе, описаны в предыдущей работе (8). Пробу для анализа (1-10 г свежих листьев, 17-20% сухого вещества) кипятили в течение 1 мин. в 80% этаноле, растирали и фильтровали. Фильтрат исследовали методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ), для этого 0.2 мл фильтрата высушивали, добавляли внутренний стандарт и силилирующий агент. Затем нагревали в течение 1 ч при 100°C и помещали в вials для ГЖХ. Подготовленные пробы анализировали на жидкостном хроматографе «Agilent 6850» по методике, описанной в работе (9).

Результаты и обсуждение

Исследованные образцы содержали комплекс биологически активных веществ (фенольные соединения, витамины и др.) в значительных концентрациях. Они сильно различались по содержанию сахаров, органических кислот, фенольных соединений и каротиноидов (табл.1). Особенно интересны выявленные различия между образцами по составу и содержанию органических кислот (табл.2).

Таблица 1 - Содержание органических соединений в образцах стевии (на сыр. массу)

Table 1 - The content of organic compounds in different stevia samples (on fresh weight)

Генотип	Аскорб. к-та, мг/100г	Моно-сахара, %	Дисахара, %	Сумма сахаров %	Орган. к-ты, %	Фенол. соед., мг/100г	Сумма хлороф., мг/100г	Каротиноиды, мг/100г	β-каротин, мг/100г
обр.а15	84,38	0,034	0,092	0,126	0,785	612,39	116,19	6,88	4,19
обр.х2	62,97	0,012	0,087	0,099	1,452	1379,83	144,92	11,79	5,46
обр.3.7	74,53	0,004	0,062	0,066	0,725	652,9	135,17	5,95	4,61

Органические кислоты в растениях образуются в важнейших биологических процессах – в фотосинтезе и дыхании, и используются для образования аминокислот, жиров, углеводов и других соединений. Возникая при окислении сахаров и участвуя в их синтезе, органические кислоты, таким образом, являются активными метаболитами углеводного обмена. В вегетативных органах стевии их общее содержание варьировало от 0,7 до 1,4 % на сырое вещество. *Нами выделены 16 кислот, среди которых наиболее высокое содержание в листьях стевии отмечено для хлорогеновой и хинной кислот* (табл. 2). В значительных количествах в листьях обнаружены кофейная, шикимовая и азелаиновая кислоты. Все эти кислоты относятся к группе фенольных соединений и могут определять высокую антиоксидантную активность образцов, которая по нашим данным составляла 70-72% (8).

Таблица 2 - Содержание органических кислот в различных образцах стевии (мг/100 г сыр.массы)

Table 2 - The content of organic acids in various stevia samples (mg /100 г fresh weight)

№	Название соединения	Обр.а15	Обр.х2	Обр.3.7
1	Щавелевая	2.25	0.92	4,82
2	Молочная	16.82	11.93	3,70
3	Пировиноградная	3,80	-	-
4	Бензойная	7,53	9,59	2,02
5	Фосфорная	26.79	21.57	58,31
6	Янтарная	12.22	6.34	7,12
7	Глицериновая	11.27	4.98	3,10
8	Муравьиная	25.02	5.94	7,48
9	Яблочная	28.89	15.60	19,50
10	Эритроновая	5.65	7.74	3,68
11	Сахарная	-	-	6,27
12	Азелаиновая	47,20	26,44	7,48
13	Шикимовая	34,30	18,53	18,54
14	Хинная	487,92	498,45	280,07
15	Кофейная	35,43	95,77	50,02
16	Хлорогеновая	40,48	728,13	253,16
	Сумма	785.56	1451.93	725.27

Наиболее сильные различия между образцами наблюдали по содержанию хлорогеновой кислоты. Известно, что хлорогеновая кислота является сложным эфиром кофейной кислоты с одним из стереоизомеров хинной кислоты и обладает сильными антиоксидантными свойствами. Именно ее высокое содержание определило 2-х кратное превышение содержания фенольных соединений у образца х2 по сравнению с двумя другими. В этом образце также обнаружено значительное содержание кофейной кислоты. В целом, можно констатировать, что в листьях генотипа х2 содержится комплекс биологически активных веществ и этот образец может быть использован для промышленного выращивания

и селекционной работы. Различия между образцами по биохимическим показателям, вероятно, генетически детерминированы, так как анализируемые растения выращивали на одинаковых субстратах при сходной облученности. В пользу данного предположения свидетельствуют результаты диссертационной работы Подпориновой Г.К., показавшей, что на содержание в растениях стевии хлорогеновой кислоты не влияло изменение условий их питания. Поиск генотипов стевии с высоким содержанием биологически активных веществ является перспективным. Необходимо проведение селекционной работы по созданию высокопродуктивных форм стевии с высоким содержанием в них как сладких гликозидов, так и биологически активных веществ.

Литература

1. Воскресенский О.Н., Бобырев В.Н. // Вопр. мед. химии. –1992. – Т.38, № 4.– С.21–33.
2. Коренман Я.И., Мельникова Е.И., Нифталиев С.И., Боева С.Е. Оптимизация параметров экстрагирования физиологически ценных компонентов *Stevia rebaudiana* В. // Современные наукоемкие технологии. 2007.- №4.- С.16-18.
3. Ursula Wölwer-Rieck The Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review//J. Agric. Food Chem.- 2012.- 60 (4).-P. 886–895.
4. Srijani Ghanta, Anindita Banerjee , Avijit Poddar and Sharmila Chattopadhyay Oxidative DNA Damage Preventive Activity and Antioxidant Potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a Natural Sweetener\\ J. Agric. Food Chem., 2007, 55 (26), P. 10962–10967.
5. П-Сук Кима, Мира Янга, Ок-Хван Леб, Сук-Нам Канг The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts// LWT - Food Science and Technology.2011. V. 44, Issue 5, P. 1328–1332.
6. Кочетов А.А. Стратегия ускорения интродукции новых культур при использовании регулируемой агроэкосистемы [На примере стевии и дайкона] // Аграрная Россия, 2001; N 6. С. 60-62.
7. Кочетов А.А. Перспективы выращивания стевии [*Stevia rebaudiana* bertoni (L.)] в нечерноземной зоне России// Аграрная Россия. 2012. № 2. С. 2-4.
8. Демина Н.В., Кочетов А.А., Шевченко Я.А., Канарский А.В., Канарская З.А. Изучение антиоксидантной активности экстрактов из листьев различных генотипов стевии, выращенных в светокультуре// Вестник Казанского технологического университета. 2013. Т. 16. № 20. С. 144-147.
9. Тюнникова Н. В., Шаварда А. Л. Хромато-масс-спектрометрический компонентный анализ экстрактов из листьев двух видов рода *Galeopsis* (*Lamiaceae*) с предварительным получением триметилсилильных производных // Раст. ресурсы. 2005. Т. 41, вып.4. С. 61-67.

BIOACTIVE COMPOUNDS OF *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI

Kochetov A.A., Soloveva A.E.

stevia, phenolic compounds, organic acids, antioxidant activity

Complex biochemical researches of bioactive compounds of 3th cultivar types *Stevia rebaudiana* Bertoni has been investigated. The content of phenols and antioxidant activity of methanol extracts from stevia leaves were defined. 16 organic acids were isolated from the alcohol extract. Distinction of degree between stevia genotypes on the total phenol content and their qualitative compound, the content of a total chlorophylls, organic acids, carotenoids and β -carotene were defined. Were shown that main phenol acids in stevia are chlorogenic and quinic. Among the cultivar types the source of bioactive substances were revealed and recommended for selection.

ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ТОРФА НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ, УРОЖАЙНОСТЬ И КАЧЕСТВО ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ

Кравец А.В., Николаева Д.Л.

ГНУ Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства и торфа РАСХН,
ул. Гагарина, 3, г. Томск, 634050, Россия, E-mail: sibniit@mail.tomsknet.ru

гуминовые вещества, пигменты фотосинтеза, сырой протеин, урожайность.

В последнее время все чаще в растениеводстве используют вещества гуминовой природы, получаемые из различных органических веществ (торф, бурый уголь). Гуминовые вещества обладают свойствами адаптогенов, повышают сопротивляемость сельскохозяйственных культур к неблагоприятным почвенно-климатическим условиям и болезням, позволяют повысить урожайность. С другой стороны необходимость растениям кальция подтверждена многими исследованиями. Кальций необходим для нормального роста и развития надземных органов и корней растений. Потребность в нём проявляется ещё в фазе прорастания, а так же в течение всего периода активного роста. Кальций принимает участие в поддержании структуры хромосом, рибосом и митохондрий [1]. В связи с этим актуальным является изучение ростостимулирующей активности препаратов на основе физиологически активных гуминовых кислот и биогенного элемента – кальция.

Цель работы - исследовать эффективность воздействия гуминового препарата с кальцием на фотосинтетические пигменты, рост и развитие растений ярового ячменя в условиях полевого опыта.

Исследовали новый стимулятор роста растений. Гуминовый препарат с кальцием приготовлен смешиванием Гумостима (препарат получен из торфа по ТУ 0392-030-00493929-06, действующее вещество - гумат аммония) и раствора хлорида кальция в эквивалентных количествах [2]. Препарат применяли на яровом ячмене *Hordeum sativum L.*, сорт Ача. Полевые опыты проводили на агросерой оподзоленной почве по минеральному фону (Кемира N₃₀P₃₀K₃₀). Применяли концентрации препарата, оказавшие положительное влияние на семена ячменя в лабораторных тестах. Схема полевого опыта включала следующие варианты:

1. Контроль (без обработки);
2. Гуминовый препарат с Са в концентрации 0,01% по гуминовым кислотам;
3. Гуминовый препарат с Са в концентрации 0,0001%.

Закладка полевых опытов проведена на стационаре СибНИИСХиТ п. Лучаново (Томский район) по методике Б.А. Доспехова в 3-кратной повторности [3]. Размещение вариантов систематическое, площадь делянок 40м², учетная 32м². Предпосевную обработку семян осуществляли ручным опрыскивателем из расчета 10 л/т непосредственно перед севом. Норма высева ярового ячменя составила 5 млн. всхожих семян на гектар посевов. Эффективность применения препарата оценивали по определению биометрических показателей в разные фазы вегетации; структуры и урожайности ячменя; содержанию сырого протеина в зерне. Содержание фотосинтетических пигментов определяли в спиртовой вытяжке [4] на спектрофотометре UV-1601 фирмы Shimadzu (Япония) с программным управлением. Полученные данные обрабатывали методом дисперсионного анализа с помощью пакета прикладных программ Snedecor [5].

Погодные условия вегетационного периода 2011г. характеризовались высоким накоплением суммы эффективных температур от средней многолетней, что позволило вегетационный период 2011г определить в целом как умеренно теплый и влажный.

Обработка семян ярового ячменя гуминовыми препаратами увеличила полевую всхожесть на 4%. Измерение площади листовой поверхности по фазам вегетации показало, что

обработка семян гуминовым препаратом увеличила листовую поверхность на 3 - 29%. Лучшие результаты показал гуминовый препарат в меньшей концентрации.

Листовой индекс увеличивался по мере прохождения растениями фенофаз: в фазу полных всходов в контроле индекс был 0,34, тогда как в опытных вариантах – 0,41-0,46. В фазу кущения листовой индекс возрос от 1,26 в контроле до 1,34 в опыте. В фазу выметывания опытный вариант № 3 показал листовой индекс 2,63 против 2,22 в контроле.

Вегетативная масса также нарастала по мере прохождения фенофаз. Опытные варианты превысили контроль на 10-20%. В фазу полных всходов в контрольном варианте сухая масса 10 растений составила 0,40г, в опытных – 0,44-0,48г. В фазу кущения опытные варианты также превосходили показатели контрольного варианта (в контроле 1,92г, в опытных – 2,04-2,11г). В фазу выметывания сухая вегетативная масса 10 растений была в контроле 15,0г, а в опыте – 17,1г. По этим показателям также лучшим был вариант с наименьшей концентрацией препарата.

Расчеты по определению чистой продуктивности фотосинтеза (ЧПФ) показали, что в фазу всходы – начало кущения в контроле этот показатель составил $9,7\text{г}/\text{м}^2 \times \text{сутки}$, а в опытных вариантах возрос до $9,73 - 9,83 \text{ г}/\text{м}^2 \times \text{сутки}$. В фазу выметывания сохранилась та же тенденция: в контроле $12,84\text{г}/\text{м}^2 \times \text{сутки}$, а в опытных вариантах - $13,18 - 13,61\text{г}/\text{м}^2 \times \text{сутки}$.

Измерения пигментного комплекса в подфлаговом листе ячменя в фазу выметывания показали различия в количестве пигментов в опытных вариантах. Обработка гуминовым препаратом с кальцием позволила увеличить количество как зеленых, так и желтых пигментов. Количество пигментов варианте с концентрацией гуминового препарата 0,01% не превышало контрольные показатели. Гуминовый препарат в концентрации 0,0001% увеличил содержание суммы хлорофиллов от 1,63 до 1,79 мг/г сухой массы. Количество каротиноидов также возросло с 0,36 в контроле до 0,41 мг/г сухой массы в опытном варианте.

Увеличились размеры пигмент-белковолипидных комплексов (ПБЛК) фотосистем и светособирающего комплекса (ССК). Уровень ПБЛК возрос с 0,84 мг/г сухой массы в контроле до 0,9 мг/г сухой массы в опытном варианте № 3. Также выросли показатели ССК с 0,79 до 0,89 мг/г сухой массы.

С увеличением фотосинтезирующей поверхности и количества пигментов при обработке гуминовым препаратом с кальцием связано и увеличение хлорофиллового индекса, который составил в контроле $146,5 \text{ г}/\text{м}^2$, а в варианте № 3 - $177,1 \text{ г}/\text{м}^2$. Следует отметить, что при обработке гуминовым препаратом в концентрации 0,01% исследованные фотосинтетические параметры были на уровне контроля.

Урожайность в варианте с гуминовым препаратом в концентрации 0,01% осталась на уровне контроля, тогда как в варианте с меньшей концентрацией возросла на 6%. При этом натурная масса опытных вариантов осталась на уровне контроля (592-604 г). Масса 1000 зерен возросла с 48,61 г в контроле до 49,38г в варианте № 3.

При определении содержания сырого протеина в зерне нового урожая выяснилось, что в контрольном варианте содержится 8,63%, в варианте № 3 - 8,88%, а в варианте № 2 содержание сырого протеина достоверно превышало контроль и составило 9,38%. Поэтому при расчетах по сбору белка с посевной площади оказалось, что оба варианта с применением гуминового препарата превысили сбор белка в контроле. Обработанные гуминовым препаратом варианты позволили собрать 343,4-343,7 кг/га белка, тогда как без обработки - только 317,6 кг/га.

Таким образом, испытанный в полевом опыте гуминовый препарат с кальцием оказал положительное влияние на показатели роста и развития растений, содержание фотосинтетических пигментов в листьях ярового ячменя. Применение препарата в концентрации 0,0001% позволило увеличить содержание сырого протеина, урожайность зерна ячменя. В целом, проведенные исследования свидетельствуют о целесообразности применения Гумостима с кальцием при производстве ярового ячменя.

Литература

1. Малиновский В. И. Физиология растений. Учебное пособие. Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2004. 106с.
2. Касимова Л.В., Кравец А.В., Николаева Д.Л. Стимулятор роста растений, обогащенный кальцием, способ его получения и способ обработки семян. Заявка на изобретение № 2012134999 пр. 15.08.2012.
3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М: Колос, 1968. 336с.
4. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии. М.: Наука. 1971. С. 154 –170.
5. Сорокин О.Д. Прикладная статистика на компьютере. Новосибирск, 2004. 162с.

INFLUENCE HUMIC SUBSTANCES FROM PEAT ON THE PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY, STRUCTURE AND QUALITY OF THE CROP SPRING BARLEY

Kravets A.V., Nikolaeva D.L.

humic substances, pigments of photosynthesis, crude protein, yield

In a field experiment investigated the influence of humic preparation with calcium preliminary treatment of seeds of spring barley. Revealed an increase in the amount of photosynthetic pigments, photosynthetic surface area, vegetative mass. Increases productivity and collecting protein crop area.

СОДЕРЖАНИЕ ИОНОВ КАЛИЯ В КАРТОФЕЛЕ СО ВСТРОЙКОЙ ТРАНСГЕНА *HvNHX2* ПРИ ПОВЫШЕННОМ УРОВНЕ NaCl

Кривошеева А.Б.¹, Юрьева Н.О.¹, Беляев Д.В.^{1,2}, Холодова В.П.¹

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, г. Москва, 127276, Россия, E-mail: positive.melody@mail.ru

²Национальный исследовательский университет – Московский физико-технический институт (государственный университет), Институтский пер., 9, г. Долгопрудный Московской обл., 141700, Россия

картофель, NHX-антипортеры, солеустойчивость, генная инженерия

Введение

Изучение функций и механизмов регуляции вакуолярных NHX-изоформ, осуществляющих сопряженный $K^+(Na^+)/H^+$ обмен на мембранах растений, имеет большое значение в связи с необходимостью этих белков для важнейших процессов роста и развития растительной клетки: роста клетки за счет растяжения, регуляции клеточного объема, ионного гомеостатирования, регуляции pH, процессинга и транспорта белков [1].

В 1999 году впервые был описан NHX-антипортер растений - белок AtNHX1 из арабидопсиса [2]. Было показано, что уровень транскриптов AtNHX1 в арабидопсисе повышался в присутствии NaCl, и экспрессия этого белка частично восстанавливала солеустойчивость *nhx1*-мутантов дрожжей [2]. Сверхэкспрессия AtNHX1 в арабидопсисе позволила повысить устойчивость трансгенных растений к засолению [3]. Эти исследования дали начало циклу работ по идентификации NHX-гомологов, к настоящему моменту в базе данных GenBank представлены последовательности ДНК, кодирующие NHX-белки из более чем 60 видов растений. Тем не менее, особенности экспрессии, локализация в растении, регуляция и функции отдельных NHX-изоформ изучены слабо.

В настоящей работе изучали влияние экспрессии в картофеле гена *HvNHX2*, кодирующего вакуолярный NHX-антипортер ячменя, на содержание K^+ в листьях, стеблях и корнях трансгенных линий.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 12 независимых трансгенных линиях картофеля исходного сорта Юбилей Жукова со встройкой гена *HvNHX2*. Сравнение проводили с нетрансформированными растениями. Стеблевые экспланты с одной пазушной почкой из средней части растений укореняли на среде MS-0 (соли MS, пиридоксин (1 мг/л), тиамин (1 мг/л), сахароза (20 г/л)) на целлюлозных мостиках в колбах на 300 мл. Далее экспланты перенесли на среду MS-150 с добавлением 150 mM NaCl. Растения выращивали в климатической камере фитотрона ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ РАН при температуре 22-24°C и 16-часовом освещении люминесцентными лампами белого света при освещенности 8 кЛк. Через три недели измеряли длину побега, число листьев, сырую массу листьев, стеблей и корней, а также содержание K^+ и Na^+ в этих органах. Контролем служили растения, росшие на среде MS-0 без внесения NaCl.

Для определения содержания K^+ и Na^+ навеску 100 мг листьев высушивали и растирали до порошкообразного состояния. Из полученного материала водной экстракцией при 100°C извлекали соли и определяли концентрацию K^+ с помощью атомно-адсорбционного спектрофотометра Hitachi 207 (Hitachi, Япония). Содержание ионов рассчитывали на сырую массу. Экспериментальные данные обрабатывали в Microsoft Excel 2007.

Результаты и обсуждение

В работе анализировали реакцию ряда независимых трансгенных линий картофеля, экспрессирующих вакуолярный NHX-антипортер ячменя *HvNHX2*, на внесение в питательную среду 150 mM NaCl.

Повышенное содержание NaCl в среде негативно влияло на длину побега всех исследованных растений (рис. 1). Но по сравнению с нетрансформированными растениями рост большинства трансгенных линий (8 из 12) тормозился в меньшей степени, а длина побега линии 174 уменьшилась всего на 8% от значения для данной линии на среде MS-0. Также в стрессовых условиях число листьев трансгенных растений было в среднем на 30% выше, чем у нетрансформированных растений.

Важным параметром оценки устойчивости растений к засолению является изменение их сухой массы при стрессе. Нетрансформированные растения сохраняли 65% массы от значения без NaCl. У двух линий 179 и 165 этот параметр остался на уровне нетрансформированных растений, у других линий биомасса была достоверно больше. То есть трансгенные растения более успешно адаптировались к условиям засоления, чем нетрансформированные растения.

Различия в росте трансгенных линий могут быть вызваны различным уровнем экспрессии целевого гена, обусловленного позиционным эффектом инсерции гена в различные локусы генома или различным количеством его вставок.

Стебли большинства трансгенных линий (8 из 12) накапливали большее количество калия в единице сырой массы, чем нетрансформированные растения, как в контрольных условиях, так и при повышенном содержании NaCl; для листьев в тех же условиях наблюдалась обратная картина.

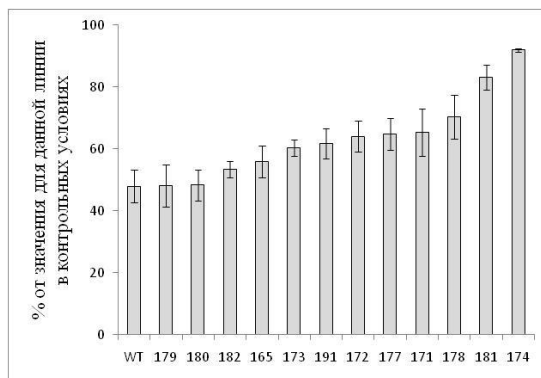


Рисунок 1 - Длина побега нетрансформированных растений (WT) и трансгенных линий (179-174) в присутствии 150 mM NaCl

Figure 1 - The length of the shoot untransformed plants (WT) and transgenic lines (179-174) in the presence of 150 mM NaCl

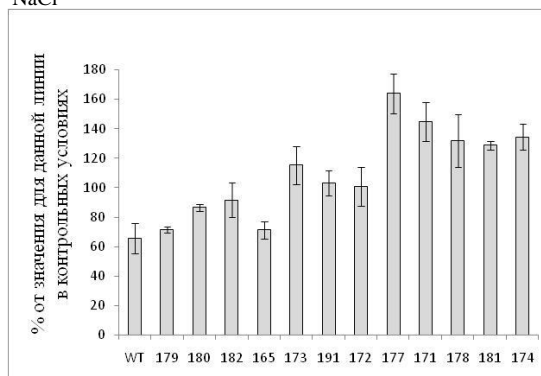


Рисунок 2 - Сырая масса нетрансформированных растений (WT) и трансгенных линий (179-174) в присутствии 150 mM NaCl

Figure 2.- The wet weight untransformed plants (WT) and transgenic lines (179-174) in the presence of 150 mM NaCl

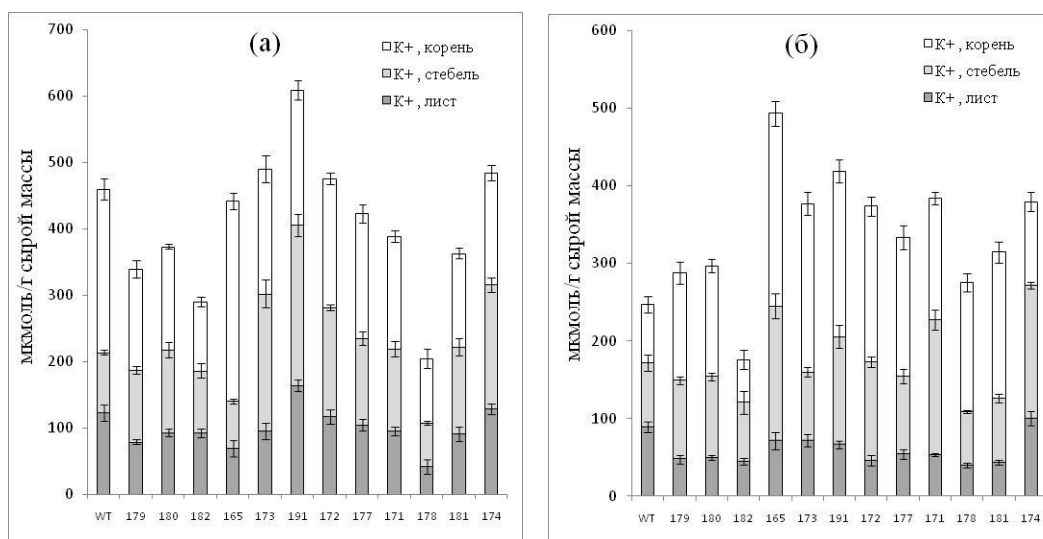


Рисунок 3 - Содержание ионов калия в корне, стебле и листьях нетрансформированных растений (WT) и трансгенных линиях (179-174) в контрольных условиях (а) и в присутствии 150 mM NaCl (б).

Figure 3 - The content of potassium ions in the root, stem and leaves of the untransformed plants (WT) and transgenic lines (179-174) at reference conditions (a) and in the presence of 150 mM NaCl (b).

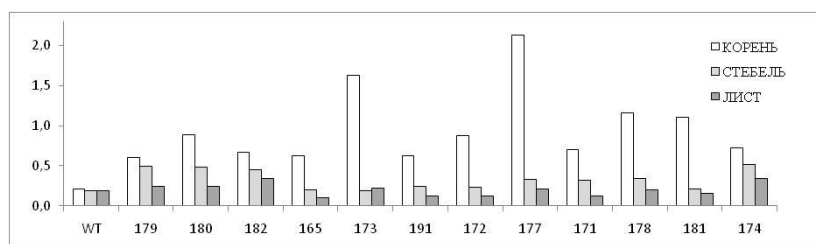


Рисунок 4 - Отношение K^+/Na^+ в корне, стебле и листьях нетрансформированных растений (WT) и трансгенных линиях (179-174) при 150 мМ NaCl.

Figure 4 - Ratio K^+/Na^+ in the root, stem and leaves of the untransformed plants (WT) and transgenic lines (179-174) in the presence of 150 mM NaCl.

Содержание калия в корнях нетрансформированных растений было в 3,3 ниже в присутствии NaCl, чем в контрольных условиях. В то же время корни трансгенных линий более успешно сохраняли калий. Вследствие этого в корнях поддерживалось более высокое отношение K^+/Na^+ (рис. 4)

Заключение

В условиях повышенного содержания NaCl трансгенные линии картофеля с экспрессией трансгена *HvNHX2* обладали большим числом листьев, были более высокими, активнее накапливали биомассу. Вероятно, возрастание солеустойчивости трансгенных линий связано с сохранением большего по отношению к нетрансформированным растениям содержания ионов калия в тканях стебля и корня, что позволило трансгенным линиям поддерживать более низкий водный потенциал и лучше насыщать ткани водой.

Кроме того, высокое отношение K^+/Na^+ в цитозоле при засолении важно из-за способности ионов натрия замещать ионы калия в сайтах связывания, необходимых для активации более чем 50 ферментов, чем обусловлена метаболическая токсичность ионов натрия [4]. Более успешная компартментация ионов натрия в вакуоли, обусловленная экспрессией *HvNHX2*, также могла повысить устойчивость изученных трансгенных линий картофеля к 150 мМ NaCl.

Авторы благодарят д.б.н. Бабакова А.В. за предоставленный ген *HvNHX2*.

Литература

1. Bassil E., Coku A., Blumwald E. Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na^+/H^+ antiporters in plant growth and development // *Journal of Experimental Botany*. 2012. V. 63. № 16. P. 5727–5740.
2. Gaxiola R., Rao R., Sherman A., Grisafi P., Alper S. L., Fink G.R. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. № 4. P. 1480–1485.
3. Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A., Blumwald E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*// *Science*.1999. 285(5431): 1256-8.
4. Tester M., Davenport R. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants // *Ann. Bot.* 2003. V. 91. P. 503–527.

ACCUMULATION OF POTASSIUM IN TRANSGENIC POTATO PLANTS EXPRESSING THE HVNHX2 GENE UNDER SALT STRESS

Krivosheeva A.B., Yur'eva N.O., Belyaev D.V., Kholodova V.P.

potato plant, NHX-antiporter, salt tolerance, genetic engineering

Transgenic potato plants with *HvNHX2* gene expression were more actively accumulating biomass under salt stress, had larger number of leaves, were higher than wild type plants under the same conditions. The increase of salinity tolerance is probably associated with larger content of potassium ions in stem and root tissues of transgenic plants, which allowed them to maintain a lower water potential and better saturation of tissues with water.

**ОЦЕНКА СТАТУСА ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ
ФИТОБИОТЕХНОЛОГИЙ НА ОСНОВЕ КАЛЛУСОГЕНЕЗА *IN VITRO***

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е.

ФГБУН Институт биологии УНЦ РАН, пр. Октября, 69, г. Уфа, 450054, Россия,
E-mail: kruglova@anrb.ru

Triticum aestivum L., зародыш, эмбриогенез, каллус, морфогенез *in vitro*

Введение

Регенерация растений из культивируемых *in vitro* каллусов различного происхождения – неотъемлемая часть ряда фитобиотехнологий [1-5]. Отдельная проблема в этой области – выявление особенностей экспланта, в условиях *in vitro* дающего начало морфогенному каллусу, тотипотентные клетки которого в ходе дальнейшего культивирования способны развиваться по различным путям морфогенеза, включая регенерацию растения [6].

В качестве экспланта для получения *in vitro* морфогенного каллуса у злаков перспективно использование незрелого зародыша. При описании инокулируемого зародыша исследователи указывают либо длину зародыша, либо сут. после опыления, на которые незрелый зародыш извлекался из зерновки [7-9]; при этом, как правило, не указывается стадия развития зародыша, отсутствует его четкое морфологическое и цито-гистологическое описание.

В связи с этим нами проведено цито-гистологическое исследование инокулируемых незрелых зародышей пшеницы на разных стадиях развития с целью уточнения особенностей зародыша в стадии, оптимальной для получения морфогенного каллуса *in vitro*.

Материалы и методы

Материалом для исследований послужила яровая мягкая пшеница сорта Симбирка. Растения выращивали на экспериментальных участках научного стационара Института биологии УНЦ РАН (Уфимский район), срезали на 2.5–25.0 сут после искусственного опыления. Зародыши инокулировали на последовательных стадиях развития, согласно авторской периодизации [10]. Для индукции каллусообразования использовали среду, составленную по прописи Мурашиге-Скуга [11], pH 5.8, с введением 0.2 мг/л кинетина и 2,4-Д в следующих концентрациях: 0.0 (контроль), 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 мг/л. Зародыши, размещенные на питательной среде щитком вниз, инкубировали в темноте при 27°C. Постоянные препараты зародышей и каллусов готовили по [12, 13] и анализировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Germany). Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Microsoft Office Excel 2003. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным данным, отзывчивость/неотзывчивость зародышей на условия культуры *in vitro* при прочих равных условиях определялась стадией эмбриогенеза и концентрацией 2,4-Д в питательной среде.

Формирование морфогенного, регенерационно способного каллуса в условиях выполненных экспериментов отмечено только при культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 3 стадии органогенеза, при концентрации 2,4-Д в 1.0–4.0 мг/л, через 3-5 сут от инокуляции. Морфологически это плотные компактные каллусы, матового желтовато-белого цвета, узловатой формы. Цито-гистологический анализ показал, что клетки морфогенного каллуса, несмотря на определенную гетерогенность, главным образом однородны и плотно прилегают друг к другу. По таким признакам, как правильная изодиаметрическая форма, незначительная вакуолизация и наличие крупных ядер,

занимающих центральное положение, большинство клеток каллуса можно характеризовать как меристематические.

Цито-гистологическое исследование инокулированных зародышей – «родоначальников» морфогенных каллусов – показало, что на подстадии 3 стадии органогенеза происходит обособление зачатков органов зародыша и их тканевая дифференциация; все органы такого зародыша представлены активно развивающимися меристематическими клетками, не покрытыми плотной клеточной стенкой.

Полученные результаты об оптимальной для индукции формирования морфогенного каллуса стадии развития зародыша согласуются с рядом литературных данных по пшенице (например [14]).

Заключение

Согласно проведенным экспериментам, основным условием формирования *in vitro* морфогенных каллусов является использование зародышей яровой мягкой пшеницы на подстадии 3 стадии органогенеза. Зародыш на этой стадии характеризуется определенным цито-гистологическим статусом: наличие органов на ранней стадии развития, характеризующихся наличием значительного количества меристематических клеток. Такой цито-гистологический статус зародыша должен коррелировать с его физиологическим состоянием, однако для точного ответа на этот вопрос необходимы специальные исследования. Установлено, что концентрация 2,4-Д также играет определенную роль в индукции формирования морфогенного каллуса, однако, на нашем мнению, не главенствующую, поскольку использование одной и той же концентрации этого синтетического ауксина вело к различной реакции разновозрастных зародышей пшеницы. Более того, в ряде вариантов отзывчивость экспланта не зависела от наличия 2,4-Д в среде. В целом, полученные данные свидетельствуют, что при прочих равных условиях компетентность клеток зародыша пшеницы к формированию морфогенного каллуса в условиях *in vitro* зависит не столько от внешних стимулов, сколько от статуса клеток зародыша в момент инокуляции, а именно – их меристематичности.

Полученные результаты еще раз подтверждают ранее высказанное мнение, что для злаков именно природа экспланта является основным фактором, определяющим морфогенетическую способность клеток зародыша к формированию каллуса и дальнейшую регенерацию растений из клеток каллуса в условиях культуры *in vitro* (по [15]). С другой стороны, клетки такого зародыша не только морфогенетически компетентны, но и являются исходными для меристематических клеток морфогенного каллуса, имеющих все морфогенетические возможности, присущие данной особи и реализующиеся различными путями морфогенеза *in vitro*, т.е. тотипотентных.

Исследования выполнены при поддержке Программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России» (2012-2014 гг.).

Литература

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
2. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. СПб.: Изд-во С.-Петербургского университета, 2010. 240 с.
3. Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011. 224 с.
4. Круглова Н.Н. Оптимизация биотехнологии получения растений пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Уфимского НЦ РАН. 2012. № 3. С. 59-61.
5. Сатарова Т.Н., Черчель В.Ю., Черенков А.В. Кукуруза: биотехнологические и селекционные аспекты гаплоидии. Днепропетровск: Новая идеология, 2013. 552 с.
6. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А. Пути морфогенеза *in vitro* клеток андроклинного каллуса пшеницы // Физиология растений и генетика. 2013. Т. 45. № 5. С. 382-389.

7. Дунаева С.Е., Лукьянова М.В., Ковалева О.Н., Козырева О.Г. Способность незрелых зародышей к образованию растений-регенерантов в культуре *in vitro* у ранне- и позднеспелых сортов ячменя. I. Регенерация растений в первичном каллусе, полученном от незрелых зародышей // Физиология растений. 2000. Т. 47. № 1. С. 53-57.

8. Vikrant R.A. Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf-base of *Triticale* // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 2001. V. 64. N 1. P. 33-38.

9. Chang Y., von Zitzewitz J., Hayes P.V., Chen T.H. High frequency plant regeneration from immature embryos of an elite barley cultivar (*Hordeum vulgare* L. cv. Morex) // Plant Cell Repts. 2003. V. 21. N 8. P. 733-738.

10. Круглова Н.Н. Периодизация эмбриогенеза пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Известия Уфимского НЦ РАН. 2012. № 2. С. 21-24.

11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. N 3. P. 473-497.

12. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цитогистологические аспекты. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.

13. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Н.Н. Круглова, О.В. Егорова, О.А. Сельдимирова, Д.Ю. Зайцев, А.Е. Зинатуллина. Уфа: Гилем, 2013. 128 с.

14. Przetakiewicz A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 2003. V. 73. N 3. P. 245-256.

15. Гапоненко А.К., Мунтян М.А., Маликова Н.И., Созинов А.А. Регенерация растений пшеницы *Triticum aestivum* L. *in vitro* // Цитология и генетика. 1985. Т. 19. № 5. С. 335-342.

THE VALUATION OF WHEAT EMBRYO STATUS FOR THE ELABORATION OF PHYTOBIOTECHNOLOGIES ON THE BASE OF CALLUSOGENESIS *IN VITRO*

Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E.

Triticum aestivum L., embryo, embryogenesis, callus, morphogenesis *in vitro*

The main condition of morphogenic callus formation *in vitro* from the wheat embryo is the using of immature embryo at the substation 3 of organogenesis. Such embryo is characterized by the definitely cyto-histological status, generally by ability of meristematic cells.

УРОЖАЙНОСТЬ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ СОРТОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРОКОВ ПРИМЕНЕНИЯ ФУНГИЦИДОВКурылева А.Г.¹, Курылев М.В.²¹ГНУ Удмуртский научно-исследовательский институт сельского хозяйства РАСХН, ул. Ленина, 1, с. Первомайский, 427007, Россия, E-mail: ugniish@yandex.ru²Филиал ФГБУ «Российский сельскохозяйственный центр» по Удмуртской Республике, ул. Лихвинцева, 52, г. Ижевск, 426034, Россия, E-mail: marat18rsc@mail.ru*сорта яровой пшеницы, сроки обработки растений фунгицидами***Введение**

Зерновые культуры являются важнейшими среди всех сельскохозяйственных культур, выращиваемых в Удмуртской Республике. Среди зерновых культур наибольшее продовольственное значение имеет пшеница, используемая для получения хлебобулочных, крупяных и макаронных изделий. Площадь посева яровой пшеницы в Удмуртской Республике составляет более 77 тыс. га (17 % от общей площади зерновых культур и 22 % от площади яровых хлебов). Средняя урожайность составляла 1,2 т/га, т.е. на 0,5 т/га ниже по сравнению со всеми зерновыми культурами. Такая низкая урожайность связана с рядом причин: почвенно-климатические условия выращивания яровой пшеницы, несоблюдение технологических приемов возделывания. В последние годы в силу ряда причин усилилась вредоносность грибных заболеваний зерновых колосовых культур. При отсутствии активных мероприятий или несвоевременности их проведения потери от грибных болезней могут достигать 15-30 % от величины планируемого урожая. Именно поэтому борьба с болезнями (мучнистая роса, различные виды ржавчины, пятнистости) должна базироваться на обязательном использовании химических средств защиты растений.

В условиях Удмуртской Республики листостебельными болезнями поражаются все зерновые культуры. В посевах яровой пшеницы ежегодно обнаруживают мучнистую росу, септориоз, бурую ржавчину. По результатам обследований в 2011-2013 гг. филиала ФГУ «Россельхозцентр» по УР на полях республики первые признаки проявления мучнистой росы отмечают в первой декаде июня на 10,3 % обследованной площади яровой пшеницы. Распространенность составила 15,2 %, развитие болезни – 5,9 %. Высокий процент зараженности мучнистой росой отмечен на 93 га, распространенность – 24,6 %, развитие – 8,0 %. Распространенность бурой ржавчины составила от 6,0 до 24,0 %, развитие – от 2 до 5 % [1].

Материалы и методы

Объектом исследований (2011-2013 гг.) явились сорта яровой пшеницы занесенные в Госреестр по Удмуртской Республике – Свеча (2006 г.), Симбирцит (2009 г.) [2]. Заложено трех факторный полевой опыт методом организованных повторений. Фактор А – сорт (Свеча и Симбирцит), Фактор В – фаза развития пшеницы, в которую проводили опрыскивание фунгицидами: фаза выхода в трубку; фаза флагового листа.; Фактор С – фунгициды: Колосаль, КЭ (250 г/л) – 0,5 л/га; Колосаль Про, КНЭ (300+200 г/л) – 0,4 л/га; Альто Супер, КЭ (250+80 г/л) – 0,6 л/га; Фалькон, КЭ (250+167+43 г/л) – 0,6 л/га. Опыт был заложен в экспериментальном севообороте ГНУ Удмуртского НИИСХ в четырехкратной повторности, общая площадь делянки 30 м², учетная площадь – 24,7 м². Почва опытных участков дерново-подзолистая среднесуглинистая со следующими агрохимическими показателями: содержание гумуса – среднее (2,0-2,5 %), подвижного фосфора – высокое и очень высокое (210-295 мг/кг), обменного калия – высокое и очень высокое (180-216 мг/кг). Обменная кислотность – слабокислая и близкая к нейтральной (рН_{KCl} 5,3-5,8).

Метод учета урожайности зерна двойной: сплошной с каждой делянки с последующим пересчетом на стандартную влажность зерна – 14 % (ГОСТ 12041-82) и на 100 % чистоту (ГОСТ 12037-81) и по пробным снопам (Методика государственного сортоиспытания..., 1983, 1989). Существенность разницы между вариантами опытов устанавливали методом дисперсионного анализа (Доспе-

хов Б.А., 1985). Фотосинтетическую деятельность растений определяли по фазам развития растений (Ничипорович А.А., 1961).

Результаты и обсуждение

Урожайность сортов яровой пшеницы в опытах варьировала по годам в зависимости от влагообеспеченности посевов, температурного режима почвы и воздуха. Созревание зерна яровой пшеницы в два года из трех лет исследований (2011 и 2013 гг.) проходило при недостаточной влагообеспеченности растений и повышенной температуры воздуха, это привело к недобору урожая зерна пшеницы. Наиболее высокой она оказалась в благоприятном 2012 г. – 3,18-4,06 т/га, а наименьшей в экстремально засушливом в 2013 г. – 1,20-1,31 т/га. Но формирование урожайности зерна зерновых культур зависит не только от метеорологических условий, но и от других немаловажных факторов, которые зависимы между собой. Одним из важнейших пунктов в технологии возделывания яровой пшеницы является защита растений от болезней фунгицидами.

В среднем за 2011-2013 гг. урожайность яровой пшеницы в контрольном варианте без обработки фунгицидами составила: у сорта Свеча – 2,28 т/га и у сорта Симбирцит – 2,22 т/га. Опрыскивание растений яровой пшеницы в фазе выхода в трубку любым из изучаемых фунгицидов способствовало увеличению урожайности по отношению к контрольному варианту: Свеча – на 3-10 %, Симбирцит – на 9-16 % (рис. 1).

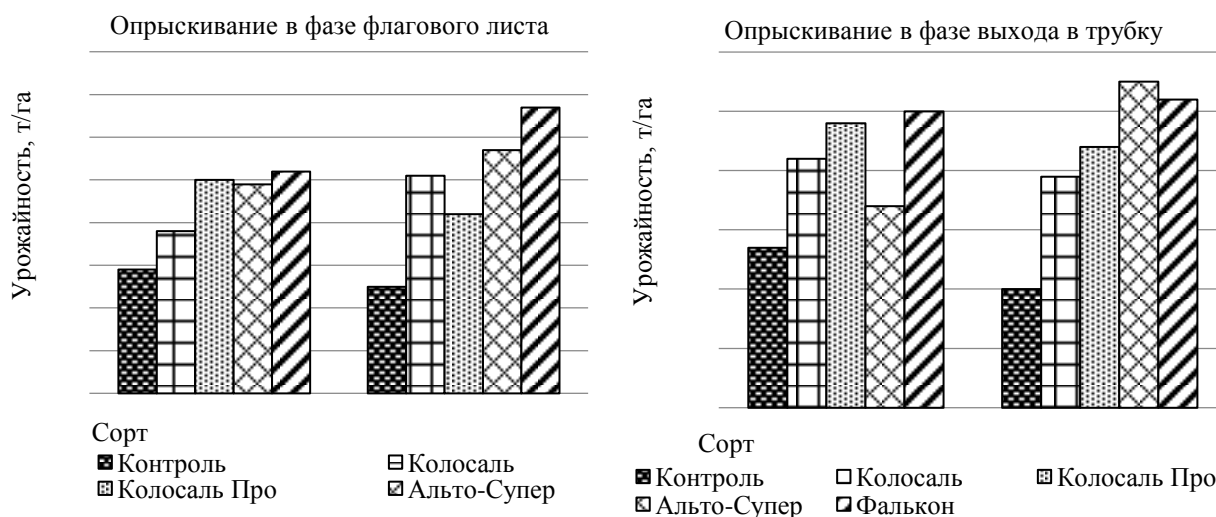


Рисунок 1 - Урожайность сортов яровой пшеницы в зависимости от сроков обработки фунгицидами, т/га (среднее за 2011-2013 гг.)

Figure 1 - Productivity of grades of a spring wheat depending on period of processing fungicides, tons/hectare (average 2011-2013)

Сорт Свеча положительно отзывался на опрыскивание посевов в фазе выхода в трубку фунгицидом Фалькон, обеспечивая прибавку на 0,23 т/га (10 %). По сорту Симбирцит выявлено, что все изучаемые препараты (за исключением Колосаль) эффективно защищали от листовых болезней и способствовали формированию хорошей и стабильной урожайности, превышающей контроль на 0,24-0,35 т/га (11-16 %).

Опрыскивание растений яровой пшеницы в фазе флагового листа фунгицидами также положительно сказалось на формировании урожайности. Так, препарат Фалькон обеспечил прибавку урожайности по сорту Свеча 10 % и по сорту Симбирцит – 19 %. Применение фунгицидов Колосаль и Альто Супер в защите от листовых болезней сорта Симбирцит способствовало повышению урожайности на 11-14 %. Препарат Колосаль ПРО обеспечивал формирование прибавки урожайности относительно контроля на 7 %.

Урожайность сельскохозяйственных культур определяется фотосинтетической деятельностью растений в посевах. Оптимальный ход формирования площади листьев заключается в быстром её

росте и сохранении активного состояния в течение длительного периода. Максимальную площадь листовой поверхности сорта пшеницы сформировали в фазе выхода в трубку от 24,2 до 25,7 тыс. м²/га. Площадь листовой поверхности в среднем по сортам составила: Свеча – 15,6 тыс. м²/га; Симбирцит – 17,0 тыс. м²/га. Опрыскивание посевов сорта Свеча в фазе выхода в трубку препаратами Альто Супер, Фалькон сохраняет площадь листовой поверхности к фазе колошения, увеличивая ее на 14-16 % относительно контроля (14,1 тыс. м²/га). По сорту Симбирцит отмечено аналогичное влияние фунгицидов Колосаль ПРО, Альто Супер и Фалькон, площадь листовой поверхности была выше контрольного варианта на 10-11 % (контроль – 15,8 тыс. м²/га). Положительное влияние данных фунгицидов на динамику площади листовой поверхности отмечено и в фазу молочного состояния. Так по сорту Свеча данный показатель превышал на 35-40 % (контроль – 8,5 тыс. м²/га), по сорту Симбирцит – на 22-23 % (контроль – 9,9 тыс. м²/га).

Опрыскивание посевов яровой пшеницы Свеча, в фазе флагового листа фунгицидами Альто Супер, Фалькон, сорта Симбирцит препаратами Колосаль ПРО, Альто Супер и Фалькон обеспечило сохранность площади листовой поверхности относительно контроля на 29-30 % (контроль – 10,0 тыс. м²/га), и на 29-34 % (контроль – 10 тыс. м²/га), соответственно.

Заключение

Таким образом, применение фунгицидов защищает растения от листостебельных болезней, что положительно влияет на площадь листовой поверхности и, соответственно, на формирование урожайности сортов яровой пшеницы. Площадь листовой поверхности увеличилась у сорта Свеча на 9-12 %, Симбирцит – на 5-9 %. В результате повышается урожайность зерна на 0,06-0,34 т/га (3-17 %) сорта Свеча и на 0,36-0,44 т/га (18-23 %) – Симбирцит. Анализ парной корреляции в среднем за 2011-2012 гг. показал зависимость урожайности зерна от площади листьев ($R=0,97$), рассматриваемые показатели имели прямую сильную корреляционную зависимость с урожайностью.

Литература

1. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию / Департамент растениеводства, химизации и защиты растений- МСХ.РФ; ФГБУ «Государственная комиссия РФ по испытанию и охране селекционных достижений». – М., 2013. – 392 с.

2. Обзор фитосанитарного состояния посевов сельскохозяйственных культур в Удмуртской Республике в 2012 г. Прогноз Развития и распространения основных вредителей и болезней в 2013 г. / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. Филиал ФГБУ «Россельхозцентр» по Удмуртской Республике; ответ. за выпуск [и др.]. – Ижевск, 2012. – 50 с.

3. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М., 1985. – 351 с.

4. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Справочное издание. – М., 2013. – 636 с.

PRODUCTIVITY AND PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY OF GRADES OF THE SPRING WHEAT IN DEPENDENCES ON TERMS OF USE OF FUNGICIDES

Kuryleva A.G., Kurylev M.V.

grades of a spring wheat, terms of processing of plants fungicides

Results of researches are given in this article about influence of fungicides at different terms of their spraying, on dynamics of a sheet surface and productivity of grades of a spring wheat the Svecha and Simbirsit.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТА – СУПЕРПРОДУЦЕНТА ζ -КАРОТИНА *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Ладыгин В.Г.

ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ул. Институтская, 2, г. Пущино Московской обл., 142290, Россия, E-mail: ladyginv@rambler.ru

Chlamydomonas reinhardtii, мутант С-41, каротиноиды, продуктивность

В настоящее время активно ведутся исследования каротиноидов в связи с участием их в структурно-функциональной организации мембран хлоропластов, роли отдельных каротиноидов в организации и функционировании пигмент-белковых комплексов фотосистем I и II [1] и защитных реакций виолаксантинового и лютеин-эпоксидного циклов, а также антиоксидантных свойств каротиноидов используемых в медицине и фармакологии [2]. Во многих направлениях этих исследований достигнуты значительные успехи [2–5]. Однако роль ζ -каротина до сих пор мало изучена [4–6].

Предварительные исследования показали, что у мутанта С-41 одновременно с β -каротином (45%) накапливались β -зеакаротин (до 17%) и значительное количество ζ -каротина (до 38%) [7, 8]. Следовательно, этот штамм можно использовать как супер-продуцент ζ -каротина [9]. Он может найти широкое практическое применение в медицине и фармакологической промышленности, в частности как противоопухолевое средство.

Учитывая удобства мутанта С-41 *Chlamydomonas reinhardtii*, как модельного объекта, для теоретических исследований, а так же возможную большую значимость ζ -каротина для практических целей, необходимо было подробно изучить биохимические и физиологические характеристики данного штамма.

Материалы и методы

Использовали исходный штамм дикого типа К(+) и новый мутантный штамм С-41 одноклеточной зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., который может быть использован для получения биомассы и чистых препаратов β -каротина, β -зеакаротина и ζ -каротина с целью использования их в медицине и фармакологической промышленности. Штамм С-41 способен накапливать до 60–70% хлорофиллов и каротиноидов от содержания их в клетках дикого типа К(+). Он светоустойчивый, жизнеспособный даже в фотоавтотрофных условиях роста. Скорость клеточных делений штамма С-41 в миксотрофных условиях роста сравнима с клетками исходного дикого типа К(+), поэтому можно легко наращивать большое количество биомассы и использовать ее для теоретических исследований и практических целей.

Используемые в работе методы описаны ранее: способ получения мутантов, метод гель-электрофореза, анализ спектральных свойств хлорофиллов, состава каротиноидов, общего содержания пигментов, фотохимической активности фотосистем и ультраструктурной организации хлоропластов [7–9].

В таблицах представлены результаты средне-арифметических величин 3–5 независимых опытов и их стандартные ошибки.

Результаты и обсуждение

Состав каротиноидов. Исследования каротиноидов методом тонкослойной хроматографии показали, что клетки дикого типа К(+) *Ch. reinhardtii* накапливают каротиноиды от 17 до 23% от суммы всех каротиноидов. Причем, α -каротин составляет 4–7%, а β -каротин – 93–96% от их суммарного содержания (табл. 1). У мутанта С-41 доля каротиноидов составляет от 31 до 38% от суммарного накопления каротиноидов, при этом, совершенно другого состава. Мутант С-41 утратил способность синтезировать α -каротин. Он накапливает 40–47% β -каротина, 17–22% β -зеакаротина и 33–41% ζ -каротина от общей суммы каротиноидов (табл. 1). Можно предположить, что у мутанта С-41 генетически нарушен ген *CrtL-e*, ответственный за синтез фермента ликопин- ϵ -циклазы, которая катализирует образование ϵ -кольца у α -зеакаротина, δ -каротина и α -каротина [2, 3].

Хлорофилл-белковые комплексы. Биохимический анализ мембран хлоропластов методом гель-электрофореза показал, что в отличие от клеток дикого типа К(+), у мутанта С-41 не формируется часть (нет полосы LH_o, но сохранилась полоса LH_x) светособирающего комплекса I.

Таблица 1 - Содержание каротинов в клетках дикого типа K(+) и мутанта C-41 *Ch. reinhardtii*
 Table 1 - The content of carotenes in the cells of wild type K(+) and C-41 mutant *Ch. reinhardtii*

Штаммы	Содержание каротинов, %			
	α -каротин	β -каротин	β -зеакаротин	ζ -каротин
Дикий тип K(+)	4.9 ± 1.7	95.1 ± 3.2	0	0
Мутант C-41	0	46.4 ± 2.6	17.1 ± 2.7	36.5 ± 2.7

У мутанта также уменьшился светособирающий комплекс II, как его мономерная форма LH₃, так и олигомерные LH₁ и LH₂, хотя все три полосы частично сохранились. Комплексы реакционных центров ФС-I (CP-I) и ФС-II (CP-II) также оба сохранились, но частично редуцированы, особенно (CP-II) [7].

Спектры флуоресценции хлорофилла нативных комплексов. Низкотемпературные (-196°C) спектры излучения флуоресценции хлорофилла целых клеток позволяют охарактеризовать не только наличие комплексов, но и, в значительной степени, их взаимодействие. Причем, разрешающая способность этого метода резко возрастает, если удается проанализировать не только исходные спектры, но и их вторые производные. Сравнивая спектры флуоресценции клеток дикого типа K(+) и мутанта C-41 легко обнаружить между ними большие различия [7, 8]. Так самая коротковолновая полоса при 681 нм, принадлежащая светособирающему комплексу II, хорошо обнаруживается только у мутанта C-41 и практически никогда не видна у контроля K(+) (см. максимум при 680 нм). Этот феномен обусловлен тем, что с этого комплекса на комплекс реакционного центра ФС-II, имеющего максимумы флуоресценции хлорофилла при 686 и 697 нм, миграция энергии осуществляется почти со 100% эффективностью. Поэтому наличие полос флуоресценции хлорофилла только при 686 и 697 нм в клетках дикого типа K(+) подтверждает как наличие обоих комплексов, так и хорошее их взаимодействие. Напротив, у мутанта C-41, хотя все три коротковолновые полосы есть, но низкий уровень флуоресценции при 681, 686, 697 нм в исходном спектре и слабая выраженность полос в спектре второй производной указывают не только на малое их количество, но и на слабое взаимодействие [7].

Что касается длинноволновой полосы флуоресценции хлорофилла при 715 нм то, как правило, она обусловлена суммарным свечением двух комплексов: светособирающего I при 707 нм и реакционного центра ФС-I при 720 нм [7, 8].

У мутанта C-41 обращает на себя внимание смещение длинноволнового суммарного максимума при 715 нм до 710 нм, что предполагает либо изменение соотношения полос свечения комплексов, либо нарушение их взаимодействия. В спектре второй производной мы четко обнаруживаем два максимума при 707 нм, принадлежащего светособирающему комплексу I и при 720 нм – комплексу реакционного центра ФС-I [8]. Мы полагаем, что у мутанта C-41 значительно изменилось соотношение этих комплексов, на что указывает смещение суммарного максимума до 710 нм. Кроме того выявление двух полос во второй производной спектра флуоресценции, характерных для двух индивидуальных комплексов, указывает на нарушение их взаимодействия [7].

Биопродуктивность клеток дикого типа K(+) и мутанта C-41. Накопление пигментов и биомассы при длительном культивировании клеток дикого типа K(+) и мутанта C-41 исследовали при выращивании в жидкой ацетатной среде. Молодые клетки логарифмической фазы роста получали через 2–3 сут роста, а клетки стационарной фазы роста через 5–6 сут роста на свету 15 тыс.Лк., когда клетки достигали максимальных размеров и практически прекращали делиться.

Исследования содержания пигментов показали, что в молодых клетках накапливается почти в 1.5 раза меньше пигментов, чем в клетках стационарной фазы роста (табл. 2). При этом соотношение хлорофиллов *alb* у мутанта C-41 было выше, чем у клеток дикого типа K(+), также как и соотношения суммы хлорофиллов к сумме каротиноидов.

Таблица 2 - Содержание пигментов в клетках K(+) и C-41 *Ch. reinhardtii* (мкг/10⁷ клеток)
 Table 2 - Pigment content in the cells K(+) and C-41 mutant *Ch. reinhardtii*

Штаммы	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Сумма хлорофиллов	Сумма каротиноидов
Дикий тип K(+)	28.9 ± 0.8	11.6 ± 0.6	40.5 ± 0.9	10.9 ± 0.7
Мутант C-41	14.8 ± 0.6	5.5 ± 0.3	20.3 ± 0.7	4.7 ± 0.5

Таблица 3 - Накопление биомассы клетками дикого типа К(+) и мутанта С-41 *Ch. reinhardtii*
 Table 3 - Productivity of the cells wild type К(+) and С-41 mutant *Ch. reinhardtii*

Штаммы	Сухая масса, мг/10 ⁹ клеток	
	логарифмическая фаза роста	стационарная фаза роста
Дикий тип К(+)	61.2 ± 0.3	70.1 ± 0.4
Мутант С-41	45.1 ± 0.4	57.3 ± 0.5

Продуктивность клеток дикого типа К(+) и мутанта С-41 оценивали по накоплению биомассы. Анализ сухой массы клеток логарифмической и стационарной фаз роста показал, что они различаются на 15–20%. Причем, более высокое накопление биомассы у клеток стационарной фазы роста характерно как для клеток дикого типа К(+), так и для мутанта С-41 (табл. 3). Полученные результаты позволили оценить не только динамику накопления биомассы, но и установить, что оба штамма накапливают достаточно значительное ее количество, что позволяет широко использовать оба штамма для целей биотехнологии. Кроме того, ранее было установлено что значительное накопление ζ-каротина у мутанта С-41 повышает в 1.5 раза устойчивость клеток к действию γ-излучения и значительно в большей степени в 5–8 раз к действию коротковолнового ультрафиолета (УФ-С) [10]. Особый интерес представляет способность мутанта С-41 накапливать необычно высокое содержание ζ-каротина, который может найти широкое практическое применение в медицине, фармакологии и фотобиотехнологии [11].

Литература

1. Pogson B. et al. // Plant Cell. 1996. V. 8. № 9. P. 1627-1639.
2. Cunnigham F.-X. Jr., Gantt E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 5. P. 2905-2910.
3. Ладыгин В.Г. // Журнал общей биологии. 2002. Т.63. №. 4. С. 299-325.
4. Ladygin V.G. // Membrane and Cell Biology. 2008. V. 2. №. 2. P.110-118.
5. Ладыгин В.Г. // Журнал общей биологии. 2006. Т.67. №. 3. С. 163-189.
6. Matsubara S. et al. // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. №. 411. P.461-468.
7. Ладыгин В.Г., Гордеева С.В., // Вестник Башкирского университета. 2001. № 2. С. 53-56.
8. Ладыгин В.Г. // Физиол. растений. 1998. Т. 45. № 5. С. 741-762.
9. Ладыгин В.Г. // Авторское свидетельство на изобретение № 1289064 от 08.10.1986 г.
10. Ладыгин В.Г. // Физиол. растений. 1993. Т. 40. № 4. С. 644-649.
11. Niculina K., Chunaev A.S., Boschetti A. // Plant Cell Reports. 1999. V. 19. № 1. P. 37-42.

PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF C-41 MUTANT THE SUPERPRODUCER OF ζ-CAROTENE OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* Ladygin V.G.

Ch. reinhardtii, mutant C-41, carotenoids, productivity

It has been studied carotenoid composition and it has been shown that unlike the cells of the wild type К(+), accumulating 95% of β-carotene and 5% α-carotene, the cells of C-41 mutant contained up to 38% of ζ-carotene, 19% of β-zeacarotene and 43% of β-carotene. Alternatively, high level of biomass supply in C-41 mutant up to 60% from the level of the cells of the wild type К(+) allowed us to use it as a superproducer of ζ-carotene in photobiotechnology.

УТОЧНЕНИЕ ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНИНОВ ПО ДАННЫМ, ПОЛУЧЕННЫМ В НОВОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЕ С МЕМБРАНАМИ РАСТЕНИЙ

Ломин С.Н.¹, Кривошеев Д.М.¹, Стеклов М.Ю.¹, Архипов Д.В.¹, Шмюллинг Т.², Романов Г.А.¹

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, г. Москва, 127276, Россия, E-mail: losn1@yandex.ru

²Свободный университет Берлина, Институт биологии/прикладной генетики, Альбрехт-Тэр-Вэг 6, г. Берлин, D-14195, Германия

цитокинины, рецепторы, гомологичная тест-система, транзистентная экспрессия, связывание гормонов рецепторами

Введение

Рецепторы цитокининов представляют собой трансмембранные сенсорные гистидинкиназы, которые являются ключевыми элементами системы передачи сигнала в многоступенчатом фосфатном каскаде [1]. После открытия рецепторов активно изучались их функциональные свойства. В частности, связывание с лигандами изучалось в гетерологичных тест-системах, в основном на основе *E. coli*. Такого рода системы обладают рядом достоинств. Однако в гетерологичных тест-системах рецепторы пребывают в мембранах другого состава, отличается их белковое окружение и другие важные параметры. Тем самым свойства рецепторов в гетерологичных тест-системах могут существенно отличаться от существующих в клетках растений. Мы изучили лиганд-связывающие свойства рецепторов в разработанной нами гомологичной тест-системе мембран из листьев табака *Nicotiana benthamiana*. Многие параметры оказались сходными в обеих тест-системах. Однако имеются и существенные различия. Новые результаты и их обсуждение приведены ниже.

Материалы и методы

Для экспериментов по связыванию в системе *E. coli* использовали конструкции pSTV28-АНК3 [2] и pIN3A3(ΔЕН)-ZmHK1 [3] с генами рецепторов АНК3 и ZmHK1, соответственно. Для работы в системе *N. benthamiana* использовали конструкции с рецепторами pB7FWG2-АНК3, pSPYCE-gАНК2, pSPYNE-gАНК2 [4]. При получении pB7FWG2-ZmHK1 фрагмент АНК3 был удален из pB7FWG2-АНК3 рестрикцией по сайтам *VcuI* и *EcoRI*, и вместо него вставлен соответствующий участок ZmHK1. Конструкциями был трансформирован штамм агробактерий GV3101. Сферопласты бактерий получали согласно ранее описанному методу [5, 6]. Получение мембран из сферопластов *E. coli* описано ранее в работе [5]. Трансформацию растений табака проводили общепринятым методом. Микросомальные мембраны растений изолировали, как описано в работе [4]. Связывание с гормонами изучалось согласно [4, 6].

Результаты и обсуждение

Мембраны, изолированные из нетрансформированных листьев *N. benthamiana*, специфически связывали цитокинин, но на низком уровне. В то же время в мембранах листьев, трансформированных геном рецептора цитокининов, связывание возрастало до 20 раз. Таким образом, практически все наблюдаемое связывание гормона в экспериментах с трансформантами принадлежало экспрессируемому рецептору. При pH 5 связывание с цитокинином было близко к нулю. В случае рецептора АНК3 связывание возрастало до pH 6.5 и в диапазоне pH 6.5-9.5 существенно не изменялось. А в случае ZmHK1 – возрастало по мере увеличения pH вплоть до 9.5 без выхода на плато. При этом в случае АНК3 уменьшение связывания при pH 5.5 было полностью обратимым, а при pH 5 – уже нет. Профиль связывания различных цитокининов оказался в целом сходным в обеих тест-системах. Однако, согласно предварительным оценкам, численные значения кажущихся констант диссоциации (K_d) могут различаться. В частности, в тест-системе мембран *Nicotiana benthamiana* по сравнению с тест-системой *E. coli* сродство

рецептора АНК3 уменьшилось, а рецепторов АНК2 и ZmHK1, наоборот, возросло. Кроме того, в тест-системе *E. coli транс*-зеатинрибозид (tZR) и изопентениладенинрибозид (iPR) связывались с рецепторами на близком к основаниям уровне, тогда как в тест-системе мембран *N. benthamiana* рецептор АНК3 практически не связывал цитокинин-рибозиды, а ZmHK1 – был способен связывать iPR (хотя и с низким сродством), но не tZR.

Согласно полученным данным, рецептор ZmHK1 можно назвать iP-специфичным, т.к. он связывал iP с наивысшим сродством. Среди рецепторов арабидопсиса АНК2 связывал *транс*-зеатин существенно сильнее рецептора АНК3. При этом цитокинин-связывающая способность мембран [4] и способность отвечать на цитокинины экспрессией генов первичного ответа [7] у двойного мутанта арабидопсиса *cre1/ahk3* существенно ниже, чем у мутанта *cre1/ahk2*. В этих мутантах присутствуют только рецепторы АНК2 или АНК3, соответственно. Не исключено, что причиной подобных различий является более высокое сродство АНК2 к *транс*-зеатину. Рецепторы, в большинстве случаев, способны связывать только цитокинины-основания. Тем не менее ZmHK1 способен связывать iPR, что может инициировать исследования в новом направлении. Связывающая способность ZmHK1 возрастала по мере увеличения значения pH. Не исключено, что этот рецептор может работать в клетке как pH-сенсор. Недавно была расшифрована структура pH-сенсора *Helicobacter pylori* гистидинкиназы TlpB [8]. Оказалось, что организация сенсорного домена этого белка в целом имеет много общего с гормон-связывающим модулем рецептора цитокинина [9]. Этот pH-сенсор связывает в качестве лиганда мочевины, а ряд производных (фенил)мочевины обладает высокой цитокининовой активностью и способен связываться с рецепторами цитокинина [9, 10]. Тем самым, новые данные существенно уточняют информацию о свойствах рецепторов и могут послужить основой для новых исследований.

Литература

1. Lomin S.N., Krivosheev D.M., Steklov M.Yu., Osolodkin D.I., Romanov G.A. Receptor properties and features of cytokinin signaling // *Acta Naturae*. 2012. V. 4(3). P. 31-45.
2. Spíchal L., Rakova N.Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G.A., Strnad M., Schmölling T. Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay // *Plant Cell Physiol*. 2004. V. 45. P. 1299-1305.
3. Yonekura-Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., Sakakibara H. Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin // *Plant Physiol*. 2004. V. 134. P. 1654-1661.
4. Wulfetange K., Lomin S.N., Romanov G.A., Stolz A., Heyl A., Schmölling T. (2011) The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum // *Plant Physiol*. 2011. V. 156. P. 1808-1818.
5. Romanov G.A., Spíchal L., Lomin S., Strnad M., Schmölling T. A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein // *Anal. Biochem*. 2005. V. 347. P. 129-134.
6. Lomin S.N., Yonekura-Sakakibara K., Romanov G.A., Sakakibara H. Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors // *J. Exp. Bot*. 2011. V. 62. P. 5149-5159.
7. Stolz A., Riefler M., Lomin S.N., Achazi K., Romanov G.A., Schmölling T. The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors // *Plant J*. 2011. V. 67. P. 157-168.
8. Sweeney E.G., Henderson J.N., Goers J., Wreden C., Hicks K.G., Foster J.K., Parthasarathy R., Remington S.J., Guillemin K. Structure and proposed mechanism for the pH sensing *Helicobacter pylori* chemoreceptor TlpB // *Structure*. 2012. V. 20. P. 1177-1188.
9. Hothorn M., Dabi T., Chory J. Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4 // *Nature Chem. Biol*. 2011. V. 7. P. 766-768.

10. Romanov G.A., Lomin S.N., Schmülling T. Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay // J. Exp. Bot. 2006. V.57. P. 4051-4058.

THE REFINEMENT OF LIGAND BINDING PROPERTIES OF CYTOKININ RECEPTORS ACCORDING TO DATA OBTAINED IN THE NEW TEST-SYSTEM WITH PLANT MEMBRANES

Lomin S.N., Krivosheev D.M., Steklov M.Yu., Arkhipov D.V., Schmulling T., Romanov G.A.

cytokinins, receptors, homologous test-system, transient expression, hormone-receptor binding

A new homologous test-system was developed to study the ligand binding properties of individual cytokinin receptors located in plant membranes. A transient expression of receptor under study in tobacco leaves resulted in up to 20-fold higher cytokinin specific binding to isolated membranes over background value. The obtained results refined previous data on receptor properties and indicated new prospects for receptor studies.

ВЛИЯНИЕ КОФЕЙНОЙ КИСЛОТЫ НА РОСТОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОБЕГОВ ВОЗОБНОВЛЕНИЯ *SOLANUM TUBEROSUM*

Макеева И.Ю., Анисеева А.Э.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет», ул. Комсомольская, 95,
г. Орел, 302026, Россия, E-mail: Makmus57@yandex.ru

картофель, кофейная кислота, ростовая активность

Изучение физиологической роли фенольных соединений в растительном организме является важным направлением в современной физиологии растений [1]. Данные литературы свидетельствуют о разной степени изученности физиолого-биохимической роли отдельных групп фенольных соединений [2]. Остается открытым вопрос об участии фенилпропаноидов в регуляции ростовых процессов и, в первую очередь, это касается гидроксикоричных кислот. Большинство исследований проводится с использованием препарата «Циркон» («Нэст-М», Россия), который представляет смесь гидроксикоричных кислот. Вместе с тем, вызывает интерес изучить влияние кофейной кислоты – одной из гидроксикоричных кислот, которая в отличие от других представителей в растениях находится в свободном виде.

Целью работы было изучение действия разных концентраций кофейной кислоты на рост побегов возобновления и их придаточных корней у *Solanum tuberosum*.

Объектом исследования являлись растения картофеля сорта Жуковский ранний селекции ВНИИ картофельного хозяйства (Коренево, Россия). Опыты проводили в лабораторных условиях. Для этого клубни, находящиеся в состоянии вынужденного покоя, высаживали в ящики с увлажненными опилками. Первоначально клубни находились в темноте, а после появления побегов – в условиях оптимального освещения. Варианты опыта включали опрыскивание растений растворами кофейной кислоты в концентрациях 10^{-7} М и 10^{-4} М, контрольные растения опрыскивали водой. Обработку растений проводили через 10 сут. после появления всходов. Анализировали побеги и придаточные корни через 7, 14 и 21 сутки. Длину побегов растений картофеля измеряли при помощи линейки, сухую массу растений определяли путем взвешивания на электронных весах (ВСТ 600/10-0) после высушивания при 105°C . Объем корневой системы измеряли методом Сабинина и Колосова [3]. На рисунках и в таблицах представлены средние арифметические из пяти биологических и 5 аналитических повторностей, и их стандартные ошибки.

Результаты проведенного исследования показали, что кофейная кислота вне зависимости от концентрации не оказала влияния на высоту побегов возобновления как в первую неделю после обработки, так и в последующий период (табл.1).

Таблица 1 - Влияние кофейной кислоты на высоту побегов возобновления
Table 1 - Effect of caffeic acid on shoot renewal height

Вариант	Время после обработки, сут		
	7	14	21
Контроль	4.5 ± 0.4	5.4 ± 0.5	20.0 ± 1.6
Кофейная кислота, 10^{-7} М	3.6 ± 0.4	5.7 ± 0.6	20.6 ± 1.6
Кофейная кислота, 10^{-4} М	4.5 ± 0.5	4.8 ± 0.6	22.1 ± 1.4

Аналогичные данные получены в опытах с отрезками coleoptилей пшеницы [4]. В наших предыдущих исследованиях [5] с применением препарата «Циркон» показано отсутствие эффекта гидроксикоричных кислот на высоту растений картофеля.

Отсутствие реакции высоты растений на действие кофейной кислоты, возможно связано с неизменным количеством ярусов (рис. 1). Не исключено, что полученные результаты зависят от гормонального статуса растений, а именно, от содержания гиббереллинов, кото-

рые отвечают за рост стебля в высоту. В исследованиях [6] показано, что гидроксикоричные кислоты (препарат «Циркон») не изменяют эндогенный уровень гибберелловой кислоты.

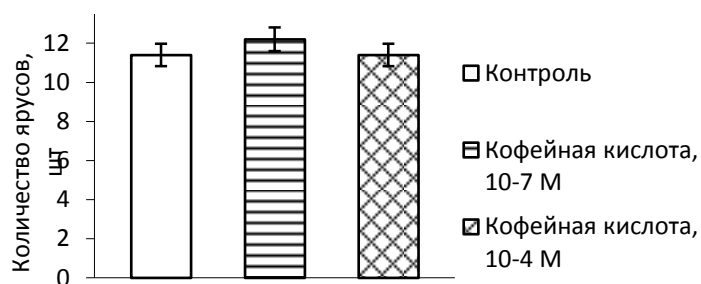


Рисунок 1 - Действие кофейной кислоты на количество ярусов листьев в побегах возобновления.

Figure 1 - Effect of caffeic acid on the number of tiers of leaves on shoots renewal.

Из табл. 2 следует, что малая доза кофейной кислоты (10^{-7} М) существенно увеличивает сухую массу побегов возобновления (на 52% против контроля). Некоторое повышение массы побегов (на 16%) в варианте с концентрацией кофейной кислоты 10^{-4} М было недостоверно. Такая же закономерность характерна и для сухой массы побегов возобновления с их придаточными корнями.

Таблица 2 - Влияние кофейной кислоты на сухую массу побегов возобновления и их придаточных корней

Table 2 - Effect of caffeic acid on the dry weight of shoot regeneration and adventitious roots

Вариант	Масса побегов, г	Масса побегов с придаточными корнями, г
Контроль	1.75 ± 0.3	2.39 ± 01
Кофейная кислота, 10^{-7} М	2.67 ± 0.2	3.20 ± 02
Кофейная кислота, 10^{-4} М	2.04 ± 02	2.31 ± 03

Данные рис. 2 свидетельствуют об иной зависимости объема корневой системы от концентрации кофейной кислоты по сравнению с побегами. А именно, наибольший стимулирующий эффект оказала концентрация кофейной кислоты 10^{-4} М (на 58%), тогда как объем корневой системы растений, обработанных 10^{-7} М раствором оставался на уровне контроля. В исследованиях, проведенных на проростках фасоли, показано отсутствие влияния разных доз кофейной кислоты (10^{-8} – 10^{-4} М) на число корней, однако отмечена стимуляция длины корня [4].

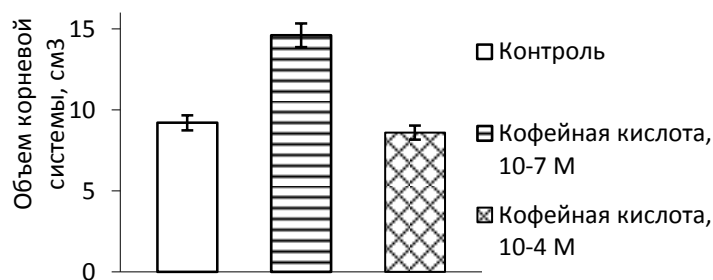


Рисунок 2 - Действие кофейной кислоты на объем корневой системы побегов возобновления.

Figure 2 - Action of caffeic acid on the volume of the root system of shoots renewal.

Итак, приведенное исследование показывает, что кофейная кислота оказывает специфическое воздействие на ростовые показатели побегов возобновления и их придаточных корней у *Solanum tuberosum*: не влияет на высоту побегов и количество узлов; низкая концентрация (10^{-7} М) стимулирует накопление сухой массы побегов; концентрация 10^{-4} М уве-

личивает объем корневой системы придаточных корней. Делается предположение об участии фитогормонов в ростовых реакциях растений на обработку кофейной кислотой.

Литература

1. Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты / Под ред. Н.В. Загоскиной, Е.Б. Бурлаковой. М.: Научный мир, 2010. 400 с.
2. Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты // Материалы докладов VIII международного симпозиума. Москва, 2-5 октября 2012. М.: ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ РАН, РУДН, 2012. 721 с.
3. Практикум по физиологии растений / Под ред. Третьякова Н.Н. М.: Агропромиздат, 1990. С. 160.
4. Волынец А.П., Башко Н.П. Росторегулирующая активность фенольных конъюгатов // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты / Под ред. Н.В. Загоскиной, Е.Б. Бурлаковой. М.: Научный мир, 2010. С. 265-271.
5. Пузина Т.И., Ланцев В.Л., Макеева И.Ю., Помазенкова С.С. Влияние салициловой и гидроксикоричных кислот на ростовые реакции *Solanum tuberosum* // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы докладов VIII международного симпозиума. Москва, 2-5 октября 2012. М.: ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ РАН, РУДН, 2012. С. 430-434.
6. Пузина Т.И., Помазенкова С.С., Серова Н.Е. Участие оксикоричных кислот в регуляции процесса клубнеобразования у *Solanum tuberosum* // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты / Под ред. Н.В. Загоскиной, Е.Б. Бурлаковой. М.: Научный мир, 2010. С.272-277.

EFFECT OF CAFFEIC ACID ON GROWTH PARAMETERS OF SHOOTS RENEWAL OF *SOLANUM TUBEROSUM*

Makeeva I.Yu., Anikeeva A.E.

caffeic acid, growth activity, potatoes

The effect of phenolic compound – caffeic acid on the growth reactions renewal shoots at *Solanum tuberosum*. Revealed the absence the effect of various concentrations of caffeic acid to a height of shoots and the number of nodes. A stimulating effect of caffeic acid noted in a concentration 10^{-7} M by dry weight of shoots. Increase of volume of adventitious roots noted in the variant with caffeic acid 10^{-4} M.

Институт биологии и биотехнологии растений, ул. Тимирязева, 45, г. Алматы,
Казахстан, E-mail: ipbb_kz@yahoo.com

гипераккумуляция, биополимеры, биогенные макро- и микроэлементы, биологически активные добавки и их компоненты

В программах комплексного оздоровления населения использование биологически активных добавок, специализированных продуктов питания и других растительных компонентов становится важными дополнительными средствами при лечении многих заболеваний и их профилактике, что является действенным фактором укрепления здоровья. Особенно это важно для регионов распространения эндемичных заболеваний, обусловленных особенностями их экологии [1,2].

В Казахстане чрезвычайно многие территории характеризуются дефицитом ряда макро- и микроэлементов (йод, селен, цинк, железо, кальций и др.), а также наличием техногенных загрязнений окружающей среды, неудовлетворительным качеством питьевой воды и целым рядом других отрицательных факторов. Все это нарушает оптимальный баланс макро- и микроэлементов в организме. Поэтому необходимо искусственное пополнение организмов людей жизненно важными макро- и микроэлементами. Одним из путей решения указанной проблемы является создание и использование БАДов, специализированные продукты питания, а также другие продукты, в которых наряду с растительными компонентами присутствовали бы биологически связанные минеральные вещества [3-5]. Неорганические соединения многих необходимых организму человека химических элементов, либо плохо усваиваются, либо являются раздражающими и даже токсическими для организма. Поэтому разработка методов включения этих химических элементов в состав органических природных соединений и, в частности биополимеров (таннины, пектины, полисахариды, и т.д.) и составление на их основе БАД и продуктов питания является весьма актуальной для Казахстана проблемой, которая обладает большой значимостью для практики.

В связи с этим целью проводимых исследований явились разработка новых подходов к созданию БАД, профилактических препаратов, специализированных продуктов питания и других биологически активных фитоматериалов на основе растительного сырья.

Объектами исследования явились растительные биополимеры (пектины, целлюлоза, танины и др.), нативные и обогащенные макро- и микроэлементами, а также растения способные к гипераккумуляции этих элементов и обогащенные макро- и микроэлементами растительные биополимеры и фитосырье.

Проведена работа по выявлению особенностей включения ценных макро- и микроэлементов в различные биополимеры. Для исследования поглощения солей I и Fe биополимерами использованы растворы биополимеров: крахмала растворимого, хитина, декстрина, карбоксиметилцеллюлозы и 0,01% растворы солей KI и FeCl₃. Для получения раствора биополимеров 1 г биополимера растворялся в 50 мл дистиллированной воды. Исследование процесса поглощения биополимерами проводилось на UV спектрометре. Для получения возможности количественной оценки веществ и выявления их взаимодействия растворы KI и FeCl₃ и отобранные растворы других солей разбавлялись с водой в соотношении 1:3. Окончательная смесь имела состав: 2 части раствора одного из биополимеров, 1 часть раствора KI (0,01%) или FeCl₃ (0,01%) и 1 часть дистиллированной воды. Были сняты UV-спектры: водных растворов хитина, декстрина, карбоксиметилцеллюлозы, крахмала и хитина в водном растворе KI и FeCl₃ (0,01%). Анализ полученных UV спектров не обнаружил явного взаимодействия выбранных биополимеров: крахмала растворимого, хитина, декстрина и карбоксил целлюлозы с растворами солей KI (0,01% или FeCl₃ (0,01%).

Нами была разработана методика определения поглощения семенами различных культур макро- и микроэлементов при их набухании, для их дальнейшего использования в качестве компонентов БАД и продуктов питания. Для этого семена брались в количестве 5 г и замачивались в чистой дистиллированной воде и в растворах солей. Через заданный промежуток времени раствор из исследуемых объектов отбирался и переносился в 1-сантиметровые кварцевые кюветы. УФ – спектры снимались на спектрофотометре Termospektronik Helios AQUAMATE. Условия подготовки проб и проведение эксперимента выдерживались постоянными. Оценка результатов поглощения семенами из растворов солей осуществлялось путем сравнения УФ спектров объектов исследования с УФ спектрами исходных растворов солей после замачивания в них семян. Для исключения влияния чистой воды на исследуемые семена в каждой серии опытов производилось замачивание семян в чистой дистиллированной воде. Полученные при этом спектры могли наблюдаться непосредственно или вводиться в память спектрофотометра и затем, вычитаться автоматически (фон в воде) из спектра соответствующего объекта в растворе солей.

Исследован механизм взаимодействия риса (*Oryza sativa*), пшеницы (вид *Triticum*), проса обыкновенного (*Panicum miliaceum*), сои культурной (*Glycine max*) и маш или фасоли лучистой (*Phaseolus radiatus*) с растворами солей: KI (0,01%), KI (0,0033%), FeCl₃ (0,01%) и MgO₂ (1,0%). Исследования проводились в двух режимах замачивания и отбора проб: а) в режиме накопления – при котором растворы солей и дистиллированная вода, в процессе экспериментов только отбирались для УФ-исследования, но не заменялись и не добавлялись; б) в режиме смены растворов, когда через указанные промежутки времени производился отбор жидкой фракции и семян для эксперимента, оставшаяся жидкая фракция сливалась, семена промывались чистой дистиллированной водой и замачивались свежим раствором. Из анализа спектров следует, что спектры различных семян очень схожи. Максимумы спектров веществ в растворах приходятся на 190 нм и продолжаются до 350 нм. Интенсивность пиков зависит от исходной навески, времени выдержки в воде и вида семян. Образующийся комплекс веществ нами пока не определен и мы его условно назвали «Лавит». Исследованы процессы поглощения семенами растворов солей и образование комплекса «Лавит» от начала экспонирования через 20,40,60,120,180,240 минут, через 24 ч и через 48 часов. Установлено, что выделение «Лавита» при замачивании в дистиллированной воде семена зернобобовых культур более активное, чем при замачивании семян злаковых. Поглощение соли из растворов злаковых культур происходит циклично – в первые 20 мин. после замачивания семян, через 4 ч и через 24 – 48 часов; для бобовых максимум поглощения: в первые 20 мин. после замачивания семян и затем через 4-6 ч после замачивания.

Для обеспечения необходимой чувствительности спектрофотометра (работе в линейной области) все пробы разбавлялись в три раза. После получения спектров чистых солей по описанным схемам проведен анализ выделения в дистиллированную воду комплекса «Лавит», а затем было произведено исследование изменение интенсивности пиков) KI во времени за счет поглощения солей замоченными в них культурами. Исследования показали, что поглощение KI происходит циклично и синхронно с образованием семенами комплекса «Лавит». Наибольшее поглощение KI пшеницей и рисом происходит через 24 ч после замачивания семян. Выделение «Лавита» при замачивании в дистиллированной воде семенами зернобобовых культур более активное, чем при замачивании семян злаковых. В растворах солей семенами сои и маша поглощение происходит более активно и через меньший интервал времени после замачивания, чем зернами риса и пшеницы.

Определение поглощения, распределения и содержания макро- и микроэлементов в зерне злаковых культур производился на атомно адсорбционном спектрофотометре AAS-7000 Shimadzu, при замачивании в 0,5 и 1% растворах KI, FeCl₃, и MgO₂, показали следующие результаты (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что поглощение К в растворах KI и MgO₂ с увеличением концентрации уменьшается, в растворе FeCl₃ увеличивается, а поглощение Fe наоборот, в растворах KI и MgO₂ с увеличением концентрации увеличивается, в растворе FeCl₃ уменьшается.

Таблица 1 – Распределение и содержание макро- и микроэлементов в зерне злаковых культур, мг/кг

Table 1 – The distribution and content of macro- and micronutrients in grain, mg/kg

Макро- и микроэлементы	H ₂ O	KI		MgO ₂		FeCl ₃	
		0,5%	1%	0,5%	1%	0,5%	1%
К	0,0576	5,6475	4,5	9,4464	3,5362	6,5483	10,3284
Fe	0,0909	0,2578	0,6452	0,1499	0,2886	3,4741	0,4127

Таким образом, установлено, что для злаковых культур поглощение соли из растворов происходит циклично – в первые 20 мин. после замачивания семян, через 4 ч и через 24 – 48 ч; для бобовых максимум поглощения: в первые 20 мин. после замачивания семян и затем через 4-6 ч после замачивания; предпринята попытка установления связи ионов металлов с веществами зерен с помощью ИК-спектроскопии, однако появление новых полос поглощения в ИК-спектрах зерен замоченных в солях металлов по сравнению с ИК-спектрами зерен замоченных в чистой воде не обнаружено.

Литература

1. Биологически активные вещества растительного происхождения. М.,: Наука, 2001-2002 гг. - Т. 1-3.
2. Введение в фитохимическое исследование и выявление биологической активности веществ растений. Коллективная монография под ред. Л.К.Мамонова и Р.А. Музычкиной. Алматы: «Школа XXI века», 2008. - 216 с.
3. Сарсенбаев Б.А., Мурсалиева В.К., Мамонов Л.К., Синявский Ю.А., Еркебаева С.У. Перспектива использования растительного сырья для создания БАД с гипогликемическим действием // Материалы международной научно-практической конференции «Биоразнообразие и устойчивое развитие природы и общества», Алматы, : Издательство «Қазақ университеті». 2009. - С. 285-288.
4. Сарсенбаев Б.А., Мамонов Л.К., Синявский Ю.А., Витавская А.В., Мурсалиева В.К., Усенбеков Б.Н., Сулейменова Ж.А. Разработка биотехнологии получения новых специализированных продуктов питания для больных диабетом // Здоровье и болезнь. 2010. - №6 (91). - С. 142-143.
5. Сарсенбаев Б.А., Мурсалиева В.К., Султанова Н.А., Мамонов Л.К., Усенбеков Б.Н. Фитохимический анализ стевии и стахиса на содержание биологически активных веществ // Вестник КазНУ серия химическая. 2012. - №1 (65). - С. 370-374.

DEVELOPMENT OF NEW BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES FOR CREATING SUPPLEMENTS

Mamonov L.K., Zavadskiy V.A., Yessenbayeva G.L.

hyperaccumulation, biopolymers, biogenic macro - and micronutrients, dietary supplements and their components

It was developed a new approach for creating dietary supplements, preventive medications, specialized food products and other biologically active substances based on vegetable raw materials. The mechanism of interactions of rice (*Oryza sativa*), wheat (*Triticum*), millet (*Panicum miliaceum*), soybean (*Glycine max*) and beans (*Phaseolus radiatus*) with solutions of salts: KI (0,01%), KI (0,0033%), FeCl₃ (0,01%) and MgO₂ (1,0%) were studied.

**НЕКОТОРЫЕ ФИТОХИМИЧЕСКИЕ И ФИТОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА *CHAMAENERION ANGUSTIFOLIUM* (L.) SCOP.
И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**

Мамонов Л.К., Сарсенбаев Б.А., Карпенюк Т.А., Ахметова Д.Ш., Кустова Т.А., Мурсалиева В.К., Есенбаева Г.Л.

Институт биологии и биотехнологии растений, ул. Тимирязева, 45, г. Алматы, Казахстан,
E-mail: ipbb_kz@yahoo.com

иван-чай, Chamaenerion angustifolium, копорский чай, лекарственные сборы, биологически активные добавки, фиточай

Расширение ассортимента видов растений, используемых для создания биологически активных добавок, фиточаев и лекарственных сборов и изучение их лекарственных свойств является одним из важнейших направлений работ по фотохимии и современной фармацевтике [1-3]. Одним из перспективных объектов для этих целей является широко распространенное растение иван-чай - *Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop., в некоторых источниках обозначают как *Epilobium angustifolium* (L.). Иван-чай в прошлом под названием «копорский чай» широко использовался в России, для производства которого применялась технология подобная производству натурального чая. Практика его потребления показала практическое отсутствие противопоказаний и побочных эффектов, но большинство его фармацевтических свойств оставались неизвестными. К настоящему же времени накопилась значительная этноботаническая и научная информация о свойствах этого вида растений и об его химическом составе [5-11, 14, 15 и др.]. Проведенные нами исследования подтвердили его высокую ценность.

Иван-чай относится к семейству Кипрейных (*Onagraceae*), насчитывающему около 650 видов 20 родов по всему земному шару, преимущественно в умеренных и субтропических зонах. Кипрейные большей частью многолетние травы, редко полукустарники, кустарники или небольшие деревья [4, 5]. В Казахстане насчитывается 19 видов 3 родов этих растений [7]. Нужно отметить, что в жизни человека Кипрейные особой роли не играют, поскольку их полезные качества недостаточно изучены [3]. Исключением является иван-чай, который считается одним из лучших медоносов, и, кроме того, согласно этноботаническим сведениям, широко применяется в народной медицине, и, как уже упоминалось выше, может служить заменителем китайского чая. Молодые листья и соцветия иван-чая могут использоваться как приправа к мясным блюдам, и в салатах. Иван-чай имеет также определенное значение как кормовое растение для крупного рогатого скота и оленей [3, 8 – 10 и др.].

Согласно исследованиям, проведенным в разных регионах России и других стран СНГ, в траве и соцветиях иван-чая содержится от 10 до 20% дубильных веществ, различные флавоноиды, недостаточно изученные алкалоиды - до 0,1%, слизи - до 15%, аскорбиновая кислота - до 388 мг %, каротин, полисахариды, сахара, пектиновые вещества, кумарины, органические кислоты, ценные микро- и макроэлементы [2,5,6,8,9 и др.].

В народной медицине различных стран иван-чай используется при очень широком спектре заболеваний [6,8-11 и др.]. Многие свойства этого растения нашли подтверждение в экспериментальных исследованиях. Так, выявлена противоопухолевая активность экстрактов из цветков *Ch. angustifolium*, а гидролизуемые танины обладают гемагглютинирующими свойствами, тормозят рост перевиваемых опухолей (кроме лейкозов), подземные части и листья обладают антигипоксическими свойствами, снижают ломкость капилляров, проявляют антибактериальную активность [9,11-15]. Растения семейства *Onagraceae* часто используются в традиционной, вспомогательной терапии гиперплазии простаты, однако до сих пор трудно провести фармакологическую и клиническую стандартизацию коммерчески

доступных препаратов. Продукты иван-чая обычно состоят из смеси различных видов с различным фенольным составом, обычно только частично идентифицированным. В настоящее время выявлен компонентный состав, характерных для этих растений, насчитывающий около 20 веществ, 18 из которых идентифицированы.

Группа венгерских ученых из Университета Семмелвейс изучали химический состав экстрактов из 5 наиболее распространенных видов этого семейства и 2 коммерческих препаратов иван-чая. С использованием LC–MS/MS метода было обнаружено во всех образцах высокое содержание макроциклических танинов, главным образом, оэнотина (oenothein B), относящегося к эллаготанниновой подгруппе гидролизуемых дубильных веществ. Мирицитин, кверцитин, кемпферол и их различные гликозиды были доминирующими в исследуемых образцах, но их комбинация и соотношения были различными во всех случаях. Самые значительные различия в составе флавоноидных экстрактов, выделенных из изучаемых образцов, наблюдались между *Ch. angustifolium* и другими видами. Только для этого вида было характерно присутствие флавонол-глюкоуронидных компонентов (кверцетин-глюкоуронид, кемпферол-глюкоуронид), которые не были обнаружены в остальных 6 исследованных разновидностях. Кроме того кверцетин-глюкоуронид, как было обнаружено, был главным компонентом *Epilobium angustifolium*, в то время как в других разновидностях основным флавоноидом был мирицитин [16].

Анализ этноботанической и научной информации об иван-чае и содержащихся в нем веществах свидетельствует о том, что это растения совершенно недостаточно используется для лечебных и профилактических целей. В связи с этим нами предпринято изучение его свойств, химического состава для решения его использования в фармацевтике, медицине и для оздоровления населения.

На первом этапе этих исследований проведены работы по созданию фиточаев с использованием сырья растений иван-чая. Были разработаны рецептуры фиточая «Есентайский» и фиточая «Алматинский».

Фиточай «Есентайский» создан с целью повышения эффективности иммуностимулирующих и общеукрепляющих свойств рекомендуемого фармакологического сбора из натурального сырья и исключения его побочных действий. Указанный результат достигается тем, что фиточай, содержащий плоды шиповника, включает листья иван-чая узколистного, листья крапивы двудомной и плоды смородины черной, при соотношении компонентов в масс %: листья – иван-чая узколистного 35-45; листья крапивы двудомной 10-15; плоды смородины черной 15-20; плоды шиповника 25-35. Заявленное соотношение обеспечивает наиболее полное воздействие на организм в качестве общеукрепляющего средства при простудных заболеваниях, а также иммуностимулирующего при умственном и физиологическом переутомлении [17].

Фиточай «Алматинский» создан с целью повышения эффективности успокаивающих, легких снотворных и общеукрепляющих свойств рекомендуемого фармакологического средства, состоящего из сбора натурального сырья и исключения побочных эффектов. Указанный результат достигается тем, что фиточай содержащий боярышник, листья Melissa лекарственной и соцветия ромашки, включает листья иван-чая узколистного, при следующем соотношении компонентов в масс. %: листья Melissa лекарственной 10-20; соцветия ромашки 10-20; плоды боярышника 15-25; листья иван-чая узколистного - остальное. Заявленное соотношение компонентов является оптимальным, при приеме данного фиточая улучшается сон, успокаивается нервная система без какого-либо побочного действия. Рекомендуется фиточай также при повышенной возбудимости, раздражительности, длительных головных болях, нарушении сна [18].

При желании настои фиточаев «Есентайский» и «Алматинский» можно подсластить сахарозой, медом или сахарозаменителями (аспартам, экстракты или листья стевии и др.).

Полученные в наших исследованиях результаты позволяют сделать заключение о больших перспективах работы с *Chamaenerion angustifolium* (L.).

Литература

1. Байтулин И.О. Интродукция растений в Казахстане // В кн.: Наука советского Казахстана Алма-Ата. 1981.- с.209-216
2. Кукунов М.К. Ботаническое ресурсосведение Казахстана, Алматы, 1999. – 160 с.
3. Жизнь растений // Цветковые растения / Под ред. акад. АН СССР А.Л. Тахтаджяна – т. 5, ч. 2. М. 1981. – 511 с.
4. Хржановский В.Г. Курс общей ботаники (систематика растений). часть 2 – М., 1982. – 544 с.
5. Биологический энциклопедический словарь. Гл. ред. М.С. Гиляров. М. 1986- 256 с.
6. Универсальная энциклопедия лекарственных растений / сост. И. Путырский, В. Прохоров, М., 200. – 656 с.
7. Абдулина С.А. Список сосудистых растений Казахстана. – Алматы. 1999. -187 с.
8. Кьосев П.А. Полный справочник лекарственных растений Мю 2000. – 992 с.
9. Лекарственные растения Казахстана и их использование. Алматы, 1996. -344 с.
10. Дикорастущие полезные растения России. Отв. ред. А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесковская. – СПб. 2001. – 663 с.
11. Сафонов Н.Н. Полный атлас лекарственных растений. М. 2009. – 312 с.
12. Головкин Б.Н., Руденская Р.Н., Трофимова И.А., Шретер А.И. Биологически активные вещества растительного происхождения. В трех томах. Т1. М. 2001. 350 с. / Т.2. М. 2001. 764 с. / Т.3 М. 2002. -216 с.
13. Химический энциклопедический словарь. Гл. ред. И.Л. Кнунянц – М. 1983. - 791 с.
14. Duke J.A., Ayensu E.S. Medical plants of China. Reference publ. Vol 1, 2/ 1985/ -705 p.
15. Duke J.A. CRC Handbook of medical herbs: CRCpress, 1986. – 677 p.
16. Barbara Hevesi Toth, Balazs Blazics, Agnes Kery Polyphenol composition and antioxidant capacity of *Epilobium* species // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. - 2009. Vol. 49. – P. 26–31
17. Инновационный патент на изобретение № 23840 «Фиточай Есентайский». Зарегистрирован в Гос. реестре РК. 22.02.2011. Авторы: Мамонов Л.К., Пономарев Б.Н., Сарсенбаев Б.А., Мурсалиева В.К., Васильев Ю.И.
18. Инновационный патент на изобретение № 23839 «Фиточай Алматинский». Зарегистрирован в Гос. реестре РК. 22.02.2011. Авторы: Мамонов Л.К., Пономарев Б.Н., Мурсалиева В.К.

SOME PHYTOCHEMICALS AND PHYTO PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF *CHAMAENERION ANGUSTIFOLIUM* (L.) SCOP. AND THEIR PRACTICAL APPLICATION

Mamonov L.K., Sarsenbayev B.A., Karpeniyk T.A., Ahmetova D.Sh.,
Kustova T.S., Mursaliyeva V.K., Yessenbayeva G.L.

dietary supplements, herbal tea, willow-herb, drug charges, Chamaenerion angustifolium, Korporskaya tea

Outlines the rationale for in-depth phytochemical and pharmacological study *Chamaenerion angustifolium* (L.) and some of the results of research. Phyto teas were created by using raw plant fireweed. It was developed the recipes phytoteas "Esentaysky" and "Almaty".

**ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РАСТЕНИЙ
HORDEUM VULGARE ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕПАРАТА
НА ОСНОВЕ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ**

Мацай Н.Ю.

Луганский национальный университет имени Тараса Шевченко, ул. Оборонная, 2, г. Луганск,
91011, Украина, E-mail: 19050829@mail.ru

препараты ассоциативных азотфиксирующих бактерий, энергия прорастания, суммарная активность амилазы, прохождение межфазных периодов, рост и развитие растений, содержание хлорофилла, чистая продуктивность фотосинтеза

Для обеспечения растений достаточным количеством азота, в последние годы, все чаще используют азотфиксирующие бактерии, которые способны усваивать атмосферный азот и трансформировать его в доступную для растений форму, а также выделять в почву витамины и ростостимулирующие вещества [1, 2]. Особая роль при этом принадлежит ассоциативным diaзотрофным микроорганизмам, которые имеют сродство к корневым системам растений и обеспечивают азотфиксацию в ризосферной области [1, 2]. Однако вопрос экзогенной регуляции роста и развития растений ячменя при использовании новых препаратов содержащих diaзотрофные азотфиксирующие бактерии остается еще недостаточно изученным.

Поэтому нами, в течение 2010–2014 гг., было проведено изучение изменения физиологических параметров растений ячменя ярового при использовании нового препарата ассоциативных diaзотрофных азотфиксирующих бактерий Диазофит.

Полевые опыты проводили в степной зоне Украины на территории Луганской области, на черноземах обыкновенных, среднесуглинистых лессовидных с толщиной гумусового слоя 50–60 см, содержанием гумуса в 0–30 см слое почвы по Тюрину – 4,8–5,2%, гидролизованного азота по Корнфилду – 12,3–15,1 мг, подвижного фосфора по Мачигину – 12,9–13,3 мг, обменного калия по Чирикову – 23,7–28,8 мг на 100 г почвы. Реакция почвенного раствора была нейтральной или слабощелочной (рН 7,0–7,2). В опытах высевали районированный сорт ячменя (*Hordeum vulgare* L.) ярового – Партнер [8]. Агротехника в опытах общепринятая для региона [5]. Препарат Диазофит вносили путем предпосевной инокуляции семян или путем почвенного внесения в соответствии с рекомендациями производителя. Определение ростовых параметров проводили до окончания фазы трех листьев, т. к. именно этот этап является одним из важнейших для формирования продуктивности растений ячменя и развития их ризосферной микрофлоры [5, 6].

Для характеристики физиологических параметров отбирали проросшие семена, растения, которые характеризовались за ростом и развитием, как типичные для данного варианта опыта [5, 6]. На этих растениях определяли стадии онтогенеза, определяли параметры роста и развития [3, 5, 6]. Определение амилазной активности проводили в сухих и проросших семенах на микрофенологической стадии ростка [4, 5, 6, 7]. Энергию прорастания семян определяли по стандартной методике (ГОСТ 12038-84) [7]. Определение особенностей роста, развития растений проводили, используя общепринятые методики [4, 5, 6, 7].

Было установлено, что инокуляция семян биопрепаратом «Диазофит» обеспечивала увеличение суммарной активности амилазы семян. В сухих семенах, в начале опыта, амилаза практически отсутствовала, ее количество не превышало 1%. На стадии ростка, на варианте без биопрепарата, суммарная активность амилазы в семенах повышалась на 15 %. Внесение биопрепарата увеличивало активность амилазы до 22 %, что на 6 % больше по сравнению с вариантом без биопрепарата. Следовательно, применение биопрепарата приводит к интенсификации физиологических процессов, начиная с ранних микрофенологических стадий прорастания семян. Активация процессов, происходящих в семенах на ранних этапах их

прорастания, обеспечивала улучшение показателей энергии прорастания семян без влияния на их всхожесть. Применение препарата путем инокуляции семян увеличивало энергию прорастания на 14 %, внесением в почву – только на 5 %. Повышение нормы использования биопрепарата значительного эффекта на биологические качества семян не оказывало.

Действие биопрепарата приводило к ускорению прохождения межфазных периодов растений ячменя. Появление всходов, на варианте с препаратом, отмечалось в среднем на 2 сут. раньше. Период от всходов до формирования трех листьев сокращался на 4 суток. Следовательно, применение биопрепарата приводит к ускорению прохождения межфазных периодов растений ячменя. Способ и норма внесения биопрепарата на продолжительность периодов онтогенеза не влияли.

Улучшение условий питания, благодаря применению биопрепарата, приводило к увеличению параметров роста растений. На варианте с биопрепаратом высота растений повышалась в среднем на 6–8 см. Почвенное внесение биопрепарата по сравнению с инокуляцией семян было менее эффективным и обеспечивало высоту растений на 2–4 см меньше. Уменьшение прироста высоты растений при внесении двойной нормы препарата объясняется, видимо, конкуренцией бактериальных клеток за питательный субстрат.

Условия среды значительно влияют на физиологические показатели роста и развития растений, которые определяют элементы продуктивности. В формировании этих элементов наибольший вклад вносит листовая масса, а именно линейные параметры листьев, их площадь. Линейные приросты листьев одного растения на варианте с биопрепаратом были независимо от стадии онтогенеза в среднем на 10–11% больше, чем на варианте без биопрепарата. Применение биопрепарата путем инокуляции семян одной нормой было на 6–9 % эффективнее, чем на других вариантах с препаратом. Сырая масса одного растения при выращивании с препаратом повышалась на 0,08–0,10 г, сухая на 0,04–0,05 г. Инокуляция семян приводила к формированию сырой и сухой массы на 1–2 % больше, чем при почвенном внесении. Площадь листьев при инокуляции увеличивалась на 0,11–0,13 см², при внесении в почву – на 0,07–0,08 см². Норма внесения препарата значительного влияния на содержание сырой и сухой массы, площадь листовой поверхности не оказывала.

Продуктивность фотосинтетического аппарата определяется содержанием пигментов во всех фотосинтетических органах и является одной из основных характеристик адаптации растения к условиям окружающей среды. Внесение биопрепарата приводило к увеличению содержания хлорофилла в фотосинтезирующих тканях на 0,36–0,46 мг/г сырой массы. Чистая продуктивность фотосинтеза при обработке семян повышалась на 12–14 %, при внесении в почву только на 6–7 %. Повышение нормы внесения препарата на содержание хлорофилла и чистую продуктивность фотосинтеза растений ячменя значительного влияния не оказывала.

Таким образом, при выращивании ячменя ярового применение препарата «Диазофит» на основе ассоциативных diaзотрофных азотфиксирующих бактерий путем инокуляции семян одной нормой обеспечивало значительное улучшение условий прорастания семян и роста растений.

Литература

1. Аристовская Т. В. Микробиология почвы, М.: Наука, 1995, с. 236–267.
2. Патица В. П. Біологічний азот: Монографія, К.: Світ, 2003, 424 с.
3. Казаков А. С. Шкала микрофенологических фаз прорастания семян ярового ячменя // Сельскохозяйственная биология (серия Биология растений), 2009. №3, с. 88–92.
4. Методические рекомендации по оценке полевых опытов и производственной проверке новых сортов, агротехнических приемов и технологий в условиях орошения УССР. - Днепропетровск: УНИИОЗ, 1985, 42 с.
5. Методы полевых и лабораторных исследований, К.: УААН, 1999, 325 с.
6. Третьяков Н. Н., Паничкин Л. А., Кондратьев М. Н. Практикум по физиологии растений, – М.: «Колос», 2003, 215 с.

7. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести: ГОСТ12038–84; 01.07.86 М: ИПК Изд-во стандартов, 2004, с. 34–38.
8. Реєстр сортів рослин України, Ч. 1 (2), К., 2012, 104 (19) с.

THE *HORDEUM VULGARE* PLANTS PHYSIOLOGICAL PARAMETERS CHANGE WHEN USING THE PREPARATION ON NITROGEN-FIXING BACTERIA BASIS

Mashay N.

association nitrogen-fixing bacteria preparation, germinative energy, net activity, whole activity of amylase, interstage periods, growth and development of plants, chlorophyll content, net productivity of photosynthesis

The article includes results of studying the *Hordeum vulgare* plants physiological parameters when using Diazofit – the new associative diazotrophic nitrogen-fixing bacteria preparation. Next points were determined: the influence of various norms and ways of preparation introduction on energy of intergrowth, amylase activity, interstage periods, linear parameters, chlorophyll content and net productivity of photosynthesis.

ВЛИЯНИЕ ОСМОЛЯЛЬНОСТИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СИНТЕЗ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ДРОЖЖАМИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Меледина Т.В., Борисова Е.В., Ибрагимов Р.С.

ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики», ул. Ломоносова, 9, г. С.-Петербург,
191002, Россия, E-mail: meledina07@mail.ru, boricov74@mail.ru

побочные продукты брожения (ППБ), сенсорный профиль пива, осмоляльность, ацетальдегид, изоамилацетат, этилацетат

В настоящее время проводится огромная работа по изучению токсичности продуктов брожения пива, которая определяется этанолом и побочными продуктами брожения (ППБ). Разрабатываются новые сорта пива, имеющие различные сенсорные профили, имеющие фруктовые ароматы, появление которых связано с образованием ППБ. Кроме того, применение технологии плотного пивоварения приводит к изменению биосинтеза ароматических компонентов, вследствие повышения осмоляльности среды, которая, главным образом, зависит от концентрации мальтозы [1]. Вкусоароматические соединения пива, которые являются ППБ, относятся к различным группам химических соединений. Все эти соединения при определенных концентрациях оказывают токсичное действие на организм человека.

Таблица 1 - Токсичность компонентов пива [2] по данным Третьяк, 2012]

Table 1 - Toxicity components beer [2] according to Tretyak 2012]

Соединение	Среднестатистическая концентрация ПБ, мг/л	LD ₅₀ , мг/кг массы тела	Доля в общей токсичности 1 л пива, %
Этанол	32000.00	4580	81
Амиловый спирт	70,00	400	3,05
Ацетальдегид	7,50	256	0,41
Пропиловый спирт	12,00	1870	0,03
Этилацетат	30,00	35	10
Изоамилацетат	3,00	250	0,14
Диацетил	0,25	3200	0,0009
Диметилсульфид	0,05	3509	0,0002

Цель работы заключалась в изучении влияния осмоляльности питательной среды на синтез вторичных метаболитов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Особое внимание было уделено этилацетату, изоамилацетату и ацетальдегиду, которые имеют низкие значения величины LD₅₀.

Объектами исследования являлись хлебопекарные дрожжи – штамм ЛВ7, пивные – штамм РН и спиртовые дрожжи – штамм 166. В качестве питательной среды использовали сусло, приготовленное из солодового экстракта «Аромаколор МFF».

Осмоляльность определяли с помощью осмометра Vapro Pressure Osmometer Wescor. Концентрация мальтозы в исследуемых растворах составляла 13,5 и 18%, что соответствует показанию осмоляльности по осмометру 670 и 1116 ммоль/кг. Во всех экспериментах начальная концентрация клеток составляла 1,5 млн/мл. Длительность культивирования 24 ч при 20°C.

В культуральной жидкости определяли высшие спирты (изобутиловый, изоамиловый, пропиловый), эфиры (этилацетат, изоамилацетат) и ацетальдегид. Для этого использовали газожидкостной хроматограф.

Как видно на рис.1 увеличение осмоляльности среды не зависимо от штамма приводит к увеличению содержания этилацетата в культуральной жидкости. Количество эфира возрастает при использовании пивных дрожжей на 40%, хлебопекарных дрожжей - на 58% и спиртовых - на 20%. Отмечено, что максимальная концентрация этилацетат достигается при сбраживании суслу спиртовыми дрожжами штамма 166. Причем, в плотном сусле концентрация этилацетата приближается к порогу ощущения (25-30 мг/л). Что касается изоамилацетата, то во всех вариантах был превышен порог ощущения этого соединения.

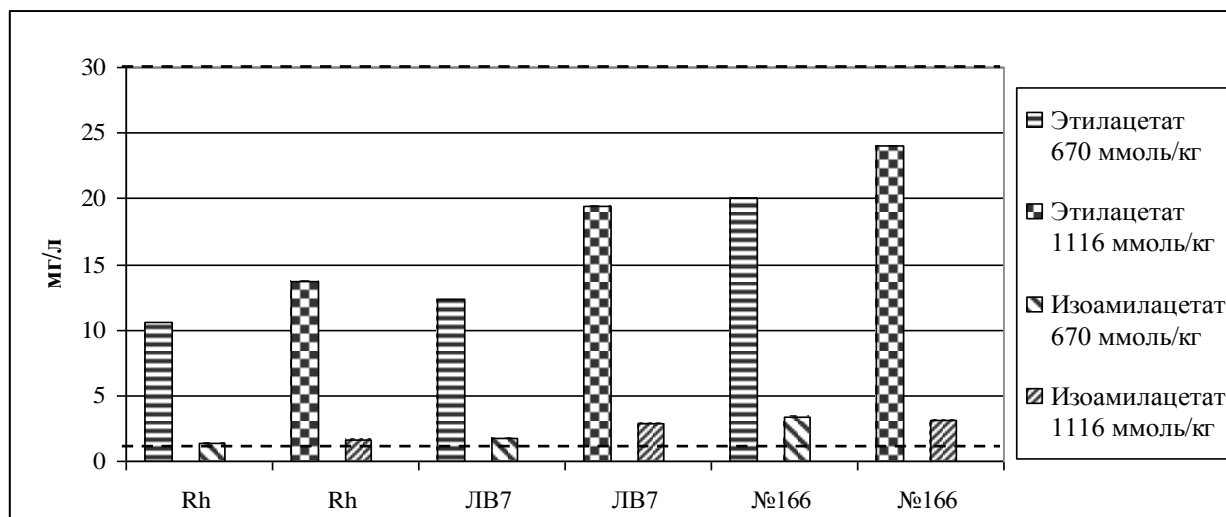


Рисунок 1 - Влияние осмоляльности на синтез сенсорно-важных эфиров в суточной культуре различных штаммов дрожжей

Figure 1 - Influence of osmolality on the synthesis of esters in the daily culture of the different strains of yeast

На качество пива и его безопасность оказывает влияние ацетальдегид, который является промежуточным продуктом при спиртовом брожении. На рисунке 2 видно, что с повышением осмоляльности питательной среды в 2 раза (с 670 до 1167 ммоль/кг) уровень ацетальдегида возрастает при использовании пивных дрожжей в 2 раза, хлебопекарных – 1,7 раза и спиртовых дрожжей - в 1,5 раза. При этом концентрация ацетальдегида значительно превышает порог ощущения при использовании штаммов пивных и спиртовых дрожжей.

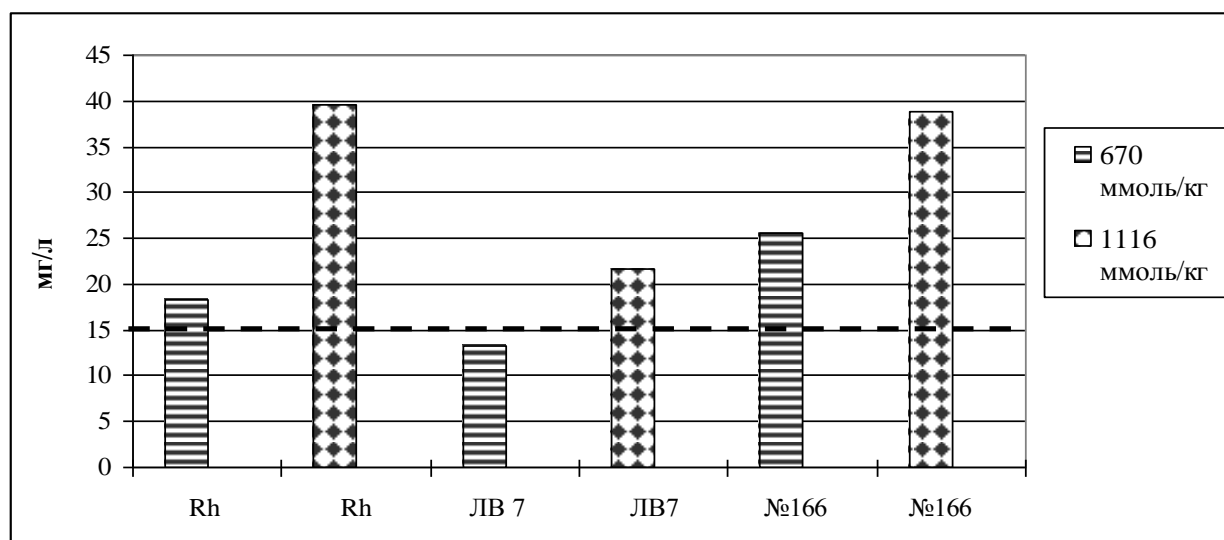


Рисунок 2 - Влияние осмоляльности на синтез ацетальдегида дрожжами сахаромецетами

Figure 2 - Influence of osmolality on the synthesis of acetaldehyde yeast *Saccharomyces*

Высшие спирты, хотя и имеют достаточно низкую токсичность, но играют большую роль в формировании сенсорного профиля пива. Установлено, что концентрация высших спиртов в суточной культуре как при осмоляльности среды 670, так и 1116 ммоль/кг у хлебопекарных дрожжей выше, чем у спиртовых и пивных, что можно объяснить только штаммовыми особенностями, т.к. все другие факторы были одинаковыми. Причём, концентрация амилового спирта находится выше порога ощущения в среде, сброженной хлебопекарными и спиртовыми дрожжами, а концентрация пропилового спирта у всех образцов находится в пределах ощущения.

Полученные сведения будут использованы для разработки технологии чистой культуры дрожжей, применяемых в бродильных производствах.

Литература

1. Устинова А.С., Меледина Т.В., Баракова Н.В., Борисова Е.В., Кузнецова К.А. Исследование влияния углеводного состава высококонцентрированного ячменного сусла на бродильную активность спиртовых дрожжей // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2013. - №3. – с. 37-40
2. Технология производства пива с заданными свойствами Третьяк Л.Н.–СПб.: ИД «Профессия», 2012. – 463 с.

INFLUENCE OSMOLALITY SUBSTRATUM ON SYNTHESIS OF SECONDARY METABOLITES YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Meledina T.V., Borisova E.V., Ibragimova R.S.

secondary metabolites, flavor profile, osmolality, acetaldehyde, isoamyl acetate, ethyl acetate.

Flavoring and aromatics beer belong to different groups of chemical compounds: higher alcohols, ethers and carbonyl compounds. These substances give beer smell of alcohol, esters, fruits and flowers. At certain concentrations of these compounds have toxic effects on the human organism.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОЖАЙНОСТИ *CUCUMIS SATIVUS* В ЗАЩИЩЕННОМ ГРУНТЕ ПОД ТЕРМИЧЕСКИМИ ПОЛИЭТИЛЕНОВЫМИ ПЛЕНКАМИ

Минич А.С., Минич И.Б., Пермякова Н.Л., Иваницкий А.Е., Буценко Е.С.

ФГБОУ ВПО «Томский государственный педагогический университет», ул. Киевская, 60А,
г. Томск, 634061, Россия, E-mail: minich@tspu.edu.ru

Cucumis sativus L., продуктивность, защищенный грунт, термические пленки

Введение

В настоящее время в качестве укрытий сооружений защищенного грунта для получения повышенных урожаев применяют модифицированные полиэтиленовые пленки [1-4]. Одной из модификаций является термическая полиэтиленовая пленка, которая способна регулировать поступление солнечного ИК излучения, что приводит к изменениям в урожайности многих сельскохозяйственных культур [1-3,5]. Сотрудниками Института сильноточной электроники СО РАН (г. Томск) были разработаны две новые по составу термические пленки, но влияние их применения на практике на изменение урожайности растений в защищенном грунте не изучено.

Цель работы – изучить изменение ростовых реакций и урожайности гибридов огурца посевного под термическими полиэтиленовыми пленками.

Материалы и методы

Объектами исследований служили растения огурца посевного (*Cucumis sativus L.*) двух партенокарпических гибридов Кураж и Маринда. Испытания проведены на агробиологической станции Томского государственного педагогического университета путем определения урожайности гибридов огурца, выращенных в контрольных и опытных теплицах. Контролем служила теплица, укрытая стабилизированной полиэтиленовой пленкой. В качестве опытных использовали теплицы, укрытые стабилизированными термическими полиэтиленовыми пленками, на поверхность которых напылением нанесены наночастицы смеси металлов на основе меди (МП) и на основе серебра (СП). Состав и некоторые свойства пленок представлены в табл. 1.

Таблица 1 - Состав и интегральное светопропускание полиэтиленовых пленок (120 мкм)

Table 1 - Composition and integral light transmission of polyethylene films (120 microns)

Наименование пленки	Тип модификатора / содержание, %	Интегральное светопропускание в области ФАР, %
Контроль	Светостабилизатор Тинувин 622 / 0,2	90,4 ± 0,2
МП	Светостабилизатор Тинувин 622 / 0,2 + напыление частиц на основе меди	78,5 ± 5,5
СП	Светостабилизатор Тинувин 622 / 0,2 + напыление частиц на основе серебра	80,5 ± 4,6

Для статистической обработки экспериментальных результатов использовали программу «Excel». Оценку достоверности результатов исследований проводили при 95 %-ом уровне надежности. В таблицах приведены данные средних арифметических значений с двухсторонним доверительным интервалом двухгодичных исследований.

Результаты и обсуждение

В опытной теплице под пленкой МП наблюдали более интенсивный рост, развитие и плодоношение растений по сравнению с контролем. Так у 35-суточных у растений огурца обоих гибридов отметили достоверно большую длину главного побега и количества листьев. Это способствовало значительному увеличению площади ассимилирующей поверхности растений, особенно на начальных стадиях развития. Эту закономерность наблюдали 8 недель, на более поздних стадиях отметили выравнивание данных показателей.

Ускоренное развитие зеленой массы растений в опытной теплице под пленкой МП способствовало более быстрому переходу растений в репродуктивную фазу развития и более ранним срокам начала плодоношения. Появление первых плодов у обоих гибридов в опытной теплице отметили на 50-е сут. вегетации. Плодоношение гибридов огурца Маринда и Кураж в контрольной теплице отметили на 3 и 5 сут. позже, т.е. у 53-суточных и 55-суточных растений соответственно.

Более ранние сроки начала плодоношения гибридов в опытной теплице под пленкой МП привело к увеличению их продуктивности по сравнению с контролем. Так за первые 10 сут. продуктивность гибридов Кураж и Маринда составила $3,9 \text{ кг/м}^2$ и $3,0 \text{ кг/м}^2$ относительно контрольной теплицы – $1,6 \text{ кг/м}^2$ и $2,0 \text{ кг/м}^2$ соответственно.

На конец эксперимента (133 сут.) установили увеличение урожайности гибридов огурца Маринда и Кураж в опытной теплице под пленкой МП по сравнению с контрольными растениями на 13 и 35 % соответственно (табл. 2). При этом отметили, что увеличение урожайности в опытной теплице происходит за счет увеличения количества плодов, а не их массы.

Хотя для опытных растений под пленкой СП первые 7 недель наблюдали ускоренный рост и развитие, сроки начала плодоношения обоих гибридов достоверно не изменились по сравнению с контрольными растениями. Однако отметили понижение интенсивности их плодоношения относительно контроля. С начала сбора первых плодов и до конца вегетации эта закономерность практически не менялась. Это привело к уменьшению урожайности гибридов Маринда и Кураж под пленкой СП относительно контроля на 26 и 8 % соответственно (табл. 2).

Таблица 2 - Урожайность гибридов огурца в 2012-2013 годах, культивируемых в защищенном грунте под полиэтиленовыми пленками (120 мкм) на агробиостанции ТГПУ (г. Томск, посадка семян в грунт – 23 мая, ликвидация культуры – 03 октября)

Table 2 - Cucumber yield hybrids in 2012-2013, cultivated in greenhouses under polyethylene films (120 microns) on agrobiostation TSPU (Tomsk, planting seeds in the ground - 23 May, the elimination of Culture - 03 October)

Показатели		Вариант теплицы	Гибрид огурца	
			Кураж	Маринда
Урожайность, кг/м^2		Контроль	$22,41 \pm 0,81$	$25,50 \pm 0,71$
		Мп	$30,40 \pm 2,10$	$28,97 \pm 0,83$
		СП	$20,60 \pm 0,71$	$18,81 \pm 0,92$
Количество плодов, шт/ м^2		Контроль	$282,00 \pm 0,79$	$366,00 \pm 0,69$
		Мп	$372,90 \pm 2,12$	$364,09 \pm 0,81$
		СП	$240,69 \pm 0,76$	$237,00 \pm 0,89$
Средняя масса плода, г		Контроль	$79,46 \pm 0,92$	$69,66 \pm 0,74$
		Мп	$81,53 \pm 1,96$	$79,56 \pm 0,76$
		СП	$85,93 \pm 0,68$	$79,38 \pm 0,94$
Изменение урожайности по отношению к контролю	кг/м^2	МП	$7,99 \pm 1,30$	$3,47 \pm 0,53$
		СП	$-1,73 \pm 0,41$	$-6,69 \pm 1,59$
	%	МП	$135,69 \pm 4,34$	$113,62 \pm 0,39$
		СП	$92,31 \pm 0,81$	$73,79 \pm 0,56$

Заключение

Эффективность применения термических полиэтиленовых пленок для выращивания гибридов огурца Кураж и Маринда в защищенном грунте определяется как типом используемого нанесения на поверхность пленок, так и гибридной принадлежностью огурца. Использование полиэтиленовой пленки, поверхность которой модифицирована нанесением наночастиц металлов на основе меди приводит к увеличению урожайности обоих гибридов. По сравнению с немодифицированной пленкой применение пленки, модифицированной нанесением наночастиц металлов на основе серебра, ухудшает интенсивность плодоношения исследуемых гибридов, значительно уменьшая их урожайность.

Литература

1. Max, J.F.J. Greenhouse cover technology / J.F.J. Max, U. Schurr, H.-J. Tantau, U.N. Mutwiwa, T. Hofmann, A. Ulbrich // Horticultural Reviews. – 2012. – Vol. 40. – № 1. – P. 259–396.
2. Brown, R.P. Polymers in agriculture and horticulture / R.P. Brown // Rapra Review Reports. – 2004. – Vol. 15. – № 2. – P. 1–92.
3. Минич, А.С. Экологические и морфо-физиологические особенности продуктивности растений под флуоресцентными пленками: дис. докт. биол. наук / А.С. Минич. – Томск, 2011. – 325 с.
4. Минич, А.С. Особенности роста и продуктивности у гибридов огурца при выращивании под фотолюминесцентной и гидрофильной пленками / А.С. Минич, И.Б. Минич, Н.С., В.С. Райда // Сельскохозяйственная биология. – 2010. – № 1. – С. 81–85.
5. Espí E. Thermic films: concepts, compounds and harvest / E. Espí, A. Salmerón, F. Catalina // Revista de Plasticos Modernos. – 2000. – Vol. 80. – № 531. – P. 305–316.

CHANGES IN PRODUCTIVITY *CUCUMIS SATIVUS* IN GREENHOUSES UNDER THE THERMIC POLYETHYLENE FILM

Minich A.S., Minich I.B., Permyakova N.L., Ivanitsky A.E., Butsenko E.S.

Cucumis sativus L., productivity, greenhouse, thermic controlled film

Studied the efficiency of *Cucumis sativus* L. two hybrids Courage and Marinda in greenhouses under thermic polyethylene films. Films developed by the Institute of High Current Electronics SB RAS (Tomsk). Both hybrids under the film-modified particles based on copper, reported an increase in productivity by 13% (Marinda) and 35% (Courage), and under the modified particles of the silver-based - the decrease of productivity.

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА И РАСЧЕТНЫХ ДОЗ УДОБРЕНИЙ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ КАРТОФЕЛЯ В ЛЕСОСТЕПИ СРЕДНЕГО ПОВОЛЖЬЯ

Мостякова А.А.¹, Владимиров К.В.², Владимиров В.П.³

¹ФГОАУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», ул. Кремлевская, 18, г. Казань, 420008, Россия, E-mail: mostyakovaa@mail.ru

²ФГБУ «Центр агрохимической службы Татарский», ул. Оренбургский тракт, 120, г. Казань, 420059, Россия

³ФГБОУ ВПО «Казанский государственный аграрный университет», ул. К. Маркса, 65, г. Казань, 420015, Россия

сорт, расчетные дозы удобрений, доза препарата, урожайность, регуляторы роста

Введение

Одной из важнейших особенностей инновационных технологий в картофелеводстве является применение регуляторов роста, влияющих на продукционный процесс и обеспечивающих защитные функции картофеля.

Исследованиями А.Н. Постникова, О.Б. Осетровой [4] установлено, что самая высокая величина этого показателя в среднем за два года исследований (40,8 т/га) была в варианте с двукратным использованием Циркона (прибавка к контролю составила 46,2 %).

Одним из основных условий является обеспечение растений элементами питания. Величина урожая закономерно лимитируется элементом, который находится в минимуме. Максимальная продуктивность достигается при обеспечении всеми элементами и в нужных пропорциях, т.е. при сбалансированном питании [1-3].

В связи с тем, что данных по изучению влияния регуляторов роста на растения картофеля мы решили изучить препараты Альбит и Силк на раннем сорте Ред Скарлетт.

Материалы и методы

Почва серая лесная, среднесуглинистого гранулометрического состава. Рельеф опытного участка ровный. Мощность пахотного слоя 26-28 см, рН солевой вытяжки – 5,6, содержание гумуса по Тюрину – 3,79, легкогидролизуемого азота – 148, подвижного фосфора – 135 и обменного калия – 185 мг/кг почвы.

Общая площадь делянки – 72,0, учетная – 60,0 м². Повторность опыта трехкратная. Предшественник озимая пшеница. Глубина посадки 8-10 см. Посадку проводили клубнями средней фракции (60-65 г). Для посадки использовались клубни первой репродукции. Густота посадки 53,2 тыс. клубней на 1 га.

Гребни с междурядьем 75 см нарезали четырехрядной гребнеобразующей фрезой. Протравливание клубней препаратом Престиж КС (1,0 л/т, с расходом рабочей жидкости 10 л/т) проводили при посадке. Органические удобрения (20 т/га) вносили под осеннюю вспашку, минеральные удобрения, рассчитанные на урожайность 30 т/га клубней (N₅₈P₄₅K₉₉) во время посадки. Уход за посадкой состоял из фрезерования почвы, при котором сорняки уничтожались и заделывались в почву. После усадки почвы вносили гербицид Зенкор Техно ВДГ в дозе 1,2 кг/га. Против фитофтороза использовали Ридомил голд МЦ (2,5 кг/га) и медьсодержащие препараты. Альбит ТПС для обработки клубней перед посадкой использовали в расчете 100 г/т, расходом рабочей жидкости 10 л/т. Для некорневого внесения 50 г/га с расходом рабочей жидкости 400 л/га. Препарат Силк использовали в расчете 100 мл/т клубней (10 мл д.в./т), опрыскивание листовой поверхности (двукратная обработка) - 100 мл/га (10 мл д.в./т) в фазе бутонизации и через 10 дней. Опыты закладывали на двух фонах питания: 1. Без удобрений. 2. Удобрения рассчитанные на урожайность 30 т/га клубней.

Схема опыта: 1. Контроль (вода). 2. Обработка клубней. 3. Обработка растений. 4. Обработка комплексная (клубни + растений двукратно).

Результаты и обсуждение

Установлено, что применение регулятора роста Силк для обработки клубней перед посадкой в зависимости от фона питания увеличило урожайность клубней на 2,10-3,27 т/га, препарата Альбит на 1,75-2,35 т/га. Некорневая обработка Силком во время вегетации повысила урожайность на 3,32-4,10 т/га, Альбитом на 2,80-3,45 т/га. При комплексной обработке (клубни + листья) соответственно на 5,56-7,35 и 4,87-5,91 т/га.

В контроле без применения регуляторов роста урожайность составила 25,6 т/га (табл. 1).

Тыблица 1 - Урожайность клубней картофеля сорта Ред Скарлетт в зависимости от фона питания и применения регуляторов роста, 2013 г.

Table 1 - Productivity of potatoes sorts Ed Scarlett depending on the background of the supply and application of growth regulators, 2013

Фон питания	Способ применения препаратов	Урожайность, т/га			
		2013 г	± от фона питания	± от регулятора роста	биологическая, т/га
Без удобрений	Контроль (вода).	15,57	-	-	16,92
	Обработка регулятором роста Силк				
	Обработка клубней	17,67	-	+ 2,10	18,90
	Обработка листьев	18,89	-	+ 3,32	20,25
	Обработка комплексная	21,13	-	+ 5,56	23,46
	Обработка регулятором роста Альбит				
	Обработка клубней	17,32	-	+ 1,75	18,66
	Обработка листьев	18,37	-	+ 2,80	19,75
	Обработка комплексная	20,46	-	+ 4,87	21,87
	Расчет на 30 т/га	Контроль (вода).	25,60	+10,03	-
Обработка регулятором роста Силк					
Обработка клубней		28,87	+ 11,20	+ 3,27	30,10
Обработка листьев		29,70	+ 10,81	+ 4,10	31,26
Обработка комплексная		33,95	+ 12,82	+ 7,35	34,52
Обработка регулятором роста Альбит					
Обработка клубней		27,95	+ 10,63	+ 2,35	29,45
Обработка листьев		29,05	+ 10,68	+ 3,45	30,51
Обработка комплексная		31,51	+ 11,05	+ 5,91	32,95

При использовании препарата Альбит эти показатели составили от 10,63 до 11,05 т/га. Наиболее эффективным оказался вариант с обработкой клубней + двукратно листьев регулятором роста Силк и внесение расчетных доз удобрений на урожайность 30 т/га клубней, при котором прибавка урожая составила 7,35 т/га.

Накопление крахмала под действием регуляторов роста, применяемых на клубнях и по растениям, более интенсивно идет при замачивании, по сравнению с вариантом некорневого внесения в пределах одного варианта фона основного внесения удобрений.

Обратная закономерность наблюдалась по витамину С на обоих фонах питания. Максимальное накопление витамина С на фоне без применения удобрений отмечено при некорневом опрыскивании регуляторами роста (19,2-19,6 мг%) против 18,5 % на контроле) и при комплексном применении (20,3-21,2 мг % соответственно).

Обработка регуляторами роста способствовала снижению нитратов в клубнях, что объясняется развитием корневой системы под действием регуляторов роста, более легким усвоением питательных веществ, особенно азотистых, из почвы и активизацией каталитических реакций питания растений, что позволило получить наиболее экологически чистый продукт.

Заключение

Некорневые подкормки регуляторами роста привели к росту урожайности на 2,80-4,10 т/га. Комплексное применение регуляторов роста увеличило урожайность на 4,87-7,75 т/га. Внесенные удобрения в расчете на урожайность 30 т/а в зависимости от варианта применения регуляторов роста обеспечили прирост урожая на 10,63-12,82 т/га. Применение регуляторов роста способствовало большему накоплению крахмала в клубнях, наиболее интенсивно оно происходило при замачивании клубней перед посадкой, Обратная закономерность наблюдалась по витамину С на обоих фонах питания. Наибольшее накопление витамина С отмечено при комплексном применении регуляторов роста (обработка клубней + двукратное некорневое внесение препаратов).

Литература

1. Бурмистров Т.И. Исследование эффективности применения органоминеральных удобрений при выращивании картофеля / Т.И. Бурмистров, Л.Н. Сысоева, Т.П. Алексеева и др. // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – № 5. – С. 32-33.
2. Владимиров С.В. Эффективность применения возрастающих доз минеральных и органических удобрений при выращивании картофеля в условиях лесостепи Среднего Поволжья. / С.В. Владимиров. – Достижения науки и техники АПК. – 2013. – № 3 (29). – С. –92-95.
3. Ельников И.И. Совершенствование методов комплексной диагностики питания растений / И.И. Ельников // Современные проблемы почвоведения. – Науч.-тр. / Почвенный ин-т им. В.В. Докучаева. – М., 2000. – С. 3 17-326.
4. Постников А.Н. Управление продуктивностью посадок картофеля и качеством урожая с помощью регуляторов роста / А.Н. Постников, О.Б.Осетрова // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – №8. – С.28-29.

THE INFLUENCE OF GROWTH REGULATORS AND ESTIMATED DOSES OF FERTILIZERS ON POTATO PRODUCTION IN THE FOREST-STEPPE OF THE MIDDLE VOLGA REGION

Mostyakova A.A., Vladimirov C.V., Vladimirov V.P.

variety, estimated fertilizer dose, dose, productivity, growth regulators

It is established that the application of growth regulators, silk for treatment of tubers before landing, depending on the background supply increased tuber yield on 2.10-3.27 t/ha, drug Albite 1.75-2.35 t/ha.

ВЛИЯНИЕ ГУМАТОВ Na, K, Fe НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ γ -ОБЛУЧЕННЫХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

Муслимова З.Г., Фараджов М.Ф., Мамедли С.А.

Институт радиационных Проблем НАН Азербайджана, Б.Вагабзаде 9, г. Баку, AZ1143, Азербайджанская республика, E-mail: zohre-huseynova@rambler.ru

пшеница, γ - облучение, перекисное окисление липидов, антиоксидантная активность, малоновый диальдегид.

Известно, что радиоактивное излучение оказывает повреждающее действие на биологические системы. Повреждение инициируемый свободными радикалами, усиливается за счет активных форм кислорода (АФК), которые вызывают нарушение целостности клеточных структур [4]. Организмы способны защитить себя от разрушающего действия свободных радикалов за счет высокоактивной антиоксидантной системы [2]. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) является индикаторной реакцией повреждения клеточных мембран в результате действия стресс факторов, в том числе радиации. В результате ПОЛ образуются конечные метаболиты (малоновый диальдегид, этан, пентан и др.), реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК - реагирующих продуктов) [5].

Установлено стимулирующее действие гуминовых соединений на рост и развитие растений, повышение их устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды [1, 3]. Однако их радиопротекторная функция не достаточно изучена.

К концу двадцатого века, одной из актуальных проблем является химическое загрязнение окружающей среды и разработка новых радиопротекторных веществ. Под протекторным действием гумусовых кислот подразумевают их способность связывать в прочные комплексы как ионы радионуклидов, так и органические экотоксиканты в загрязненных водных и почвенных средах [5,8].

Таким образом, получение и исследование биологической активности и радиопротекторных свойств гуминовых комплексов металлов (гумат натрия, гумат калия и гумат железа) представляется весьма актуальным направлением.

Материалы и методы

Объектом исследования служили семена пшеницы. Для изучения радиопротекторных свойств гуматов семена обрабатывали в течение 15 ч в 0,001 %- ных растворах гуматов K, Na и Fe. После этого семена подвергали общему равномерному γ - облучению от источника ^{60}Co на установке «Рхунд» в дозе 200 Гр. Семена проращивали в чашках Петри. Изменение интенсивности ПОЛ измерили по содержанию вторичного продукта ПОЛ - МДА с помощью метода Costa с соавторами [7]. Метод основан на том, что при высокой температуре в кислой среде МДА реагирует с ТБК, образуя розовый триметилловый комплекс. Для анализа продуктов ТБК 1 г сырой массы проростков гомогенизировали в фарфоровой ступке с небольшим количеством реакционной смеси, состоящей из 0,25 % раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Гомогенат переносили в стеклянную пробирку небольшими порциями реакционной смеси. Пробы перемешивали и помещали в нагретую до 95⁰ С водяную баню на 30 мин. Затем содержимое проб переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали 10 мин при 10000 g. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Multiscan Go фирмы Thermo Scientific Финляндия при $D=532$ нм и $D=600$ нм. Содержание ТБК- реагирующих продуктов выражали в мМ/г сырого веса.

Результаты и обсуждение

Как видно из рисунка 1, изменения в динамике накопления вторичных продуктов перекисного окисления липидов в культуре ткани пшеницы после действия гамма излучения являются достаточно четко. Содержание ТБК-реактивных продуктов в ткани непосредствен-

но после облучения существенно возросло. Через две и три недели эта разница носила менее выраженный характер.

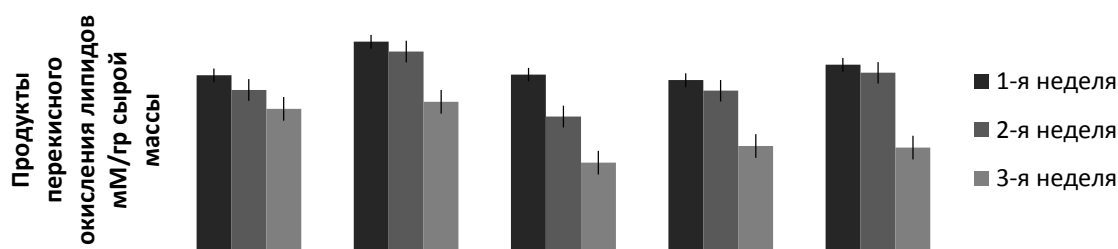


Рисунок 1 - Перекисное окисление липидов, мМ\гр.с.м: 1 – контроль; 2 – облученный контроль; 3 – гумат натрия; 4 – гумат калия; 5 – гумат железа

Figure 1 - Lipid peroxidation , mM/g wet weight: 1 – control; 2 – irradiated control; 3 – Na - humat 4 – K - humat; Fe - humat

Литературные данные дают основание предположить, что γ -облучение может являться индуктором перекисного окисления липидов в листьях пшеницы. Было обнаружено что, одним из первичных ответов растительной ткани на облучение выражался в повышении содержания вторичных продуктов перекисного окисления.

Кроме этого, для полного представления о действии радиации на растительной ткани мы также изучали динамику роста растений и всхожесть семян.

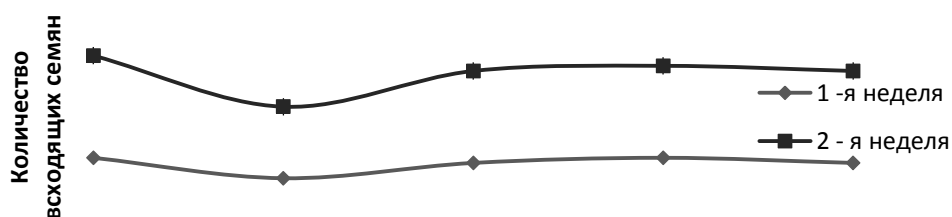


Рисунок 2 - Всхожесть семян, %: 1 – контроль; 2 – облученный контроль; 3 – гумат натрия; 4 – гумат калия; 5 – гумат железа

Figure 2 - Seed germination, %: 1 – control; 2 – irradiated control; 3 – Na - humat 4 – K - humat; Fe - humat

Как видно из рис. 2, облучение семян высокими дозами понижает всхожесть семян, обработка семян гуминовыми комплексами, по сравнению с облученным контролем повышает всхожесть семян. Самый лучший результат наблюдается у семян обработанными К-гуматом.

Облучение не оказывало сильно выраженное влияние на рост проростков, но подавляющее действие наблюдается. Обработка семян Fe-гуматом по сравнению другими гуматами дает наилучший результат.

Мы показали, что облучение семян в высоких дозах повышает содержание в них перекиси водорода, супероксидного и гидроксильного радикала и таким образом активирует ПОЛ и вызывает активацию антиоксидантной системы растений. Кроме того снижается всхожесть семян. Также показали, что предварительная обработка семян пшеницы гуминовыми комплексами разных металлов снижает действие радиации на всхожесть семян и на рост растений. Обработка семян этими комплексами, также подавляет активацию ПОЛ и таким образом защищает растения от разрушительного действия ионизирующей радиации.

Литература

1. Варшал Г.М., Кашеева И.Я., Сироткина И.С. Изучение органических веществ поверхностных вод и их взаимодействия с ионами металлов // Геохимия.- 1979.- № 4.- С.598-607.
2. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Успехи современной биологии.- 1993.-113, №3.- С.286-290.
3. Кононова М.М. Органическое вещество почвы. Его природа, свойства и методы изучения. М., Изд.АН СССР, 1963.- 314 с.
4. Рогожин В.В., Курилюк Т.Т., Филиппова Н.П. Изменение реакции антиоксидантной системы проростков пшеницы после УФ-облучения семян// Биофизика.- 2000.-45,№4.-С.730-736.
5. Соркина Т.А., Куликова Н.А., Филиппова О.И., Лебедева Г.Ф., Перминова И.В. Биологическая активность гумата железа по отношению к проросткам пшеницы. Хим. Фак. МГУ им. М.В. Ломоносова 2007
6. УМКД «Экологическая Физиология Растений». Руководство к лабораторным и практическим занятиям. Екатеринбург 2008. 157 с
7. Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. (2002) Effect of radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons// Plant Science,2002, v. 162, N6, p 939-945
8. Stevenson F.J. Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions. New York: John Wiley&Son, 1982.- 443P.

INFLUENCE OF NA, K, FE HUMATES ON ACTIVITY OF ANTIOXIDANT SYSTEM OF γ -IRRADIATED WHEAT GERMS

Muslimova Z.H., Farajov M.F., Mamedli S.A

wheat, γ -irradiation, lipid peroxidation, antioxidant activity, malon dialdehyde

The activity of the antioxidant system of seedlings obtained from γ - irradiated seeds of wheat were investigated. High doses of ionizing radiation reduced seed germination and stimulated lipid peroxidation in a one-week seedlings. In the further development of seedlings, differences in the growth and activity of the antioxidant system leveled. Obtained metal humic complexes (Na humate, K humate and Fe humate) reduced the damaging effects of ionizing radiation on plants.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАБОТЫ ВАРОЧНОГО
ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ МИНИПИВОВАРЕН**

Оганнисян В.Г.¹, Меледина Т.В.², Прохорчик И.П.³

¹ООО «Ситик», ул. Маршала Казакова, 1, пом.3-Н, г. С.-Петербург, 198302, Россия,
E-mail: vaclav-bar@yandex.ru

²ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики», ул. Ломоносова, 9, г. С.-Петербург, 191000, Россия, E-mail: meledina@mail.ru

³ФГБОУ ДПО «Санкт-Петербургский институт управления и пищевых технологий», наб. канала Грибоедова, 7, г. С.-Петербург, 191186, Россия, E-mail: bio@hlebspb.ru

оборудование для варки сусла, минипивоварни

В предыдущей работе [1] было отмечено, что для минипивоварен чрезвычайно важно, чтобы варочное оборудование занимало минимальную площадь и обладало при этом низкой металло- и энергоёмкостью. Сравнительная оценка варочного оборудования различных конструкций выявила в нём следующие недостатки:

- оснащение технологических аппаратов паровыми рубашками в значительной степени увеличивает их металлоёмкость;
- использование механических перемешивающих устройств в заторно-сусловарочных агрегатах требует наличия сложного дорогостоящего и энергоёмкого привода;
- использование внутренних электронагревателей в основных технологических аппаратах приводит к образованию пригара на их рабочей поверхности и, как следствие, к снижению эффективности их работы.

На рис.1. представлена установка для приготовления сусла, включающая в себя варочное оборудование, конструкция которого исключает вышеперечисленные недостатки.

Установка работает следующим образом: заторно-сусловарочный аппарат 1 заполняют водой до определенного уровня, затем включают насос 3. Вода циркулирует через выносной теплообменник 2, в межтрубное пространство которого подают пар. По достижении заданной температуры воды, в аппарат 1 засыпают солод. Термическую обработку заторной массы производят при различных температурах в циркуляционном режиме по заданной программе. Во время процесса затирания открывают клапаны P1, P2, P3 и P10, а также паровой клапан M4.

Перед окончанием процесса затирания в подситовое пространство фильтрационного аппарата 4, с помощью электромагнитных клапанов M1, M3, подают горячую воду до определенного уровня. После этого затор из аппарата 1 перекачивают в фильтрационный аппарат 4 с помощью насоса 3 и открытых клапанов P1 и P5.

После выдержки определённой паузы, в фильтрационном аппарате 4 начинают процесс фильтрации сусла, для этого открывают клапаны P6, P4, P10 и включают насос 3. По окончании процесса фильтрации сусла осуществляют промывку дробины, открыв клапаны M1 и P12. Затем проводят кипячение сусла с хмелем. Для этого открывают клапаны P1, P2, P3, P10, M4 и включают насос 3, который обеспечивает подачу сусла из фильтрационного аппарата 4 в заторно-сусловарочный аппарат 1 через теплообменник 2.

Подачей пара в межтрубное пространство теплообменника 2 обеспечивают нагрев сусла до температуры кипения и поддержание этой температуры в течение всего процесса охмеления сусла. За 15 мин. до окончания кипячения закрывают клапан P10, за счёт чего сусло поступает в заторно-сусловарочный аппарат 1 только через нижний патрубок, распо-

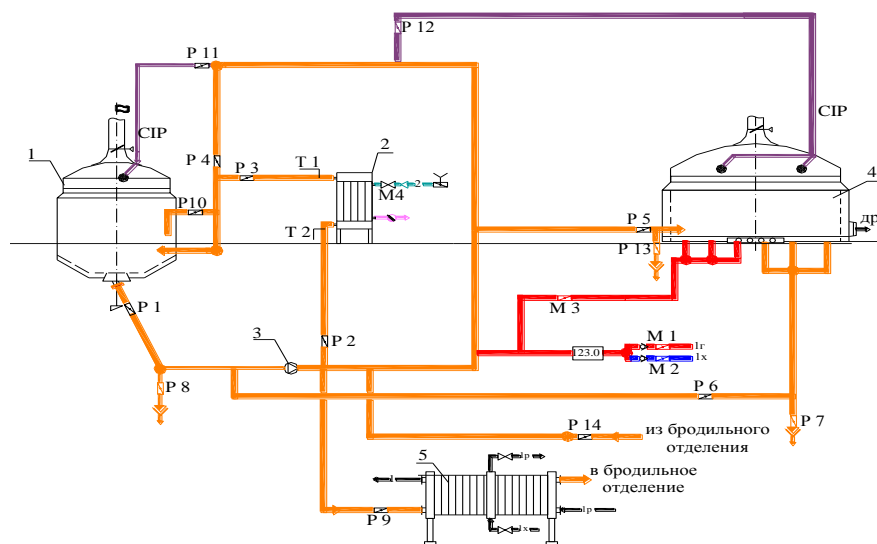


Рисунок 1 - Двухаппаратная установка для приготовления сусла
Figure 1 - Two-apparate installation for malt extract preparation

ложенный тангенциально к поверхности аппарата, вследствие чего происходит закручивание потока и отделение взвешенных частиц от сусла.

По окончании процесса осветления сусла, все клапаны закрывают и выдерживают паузу в течение 15-ти минут. Затем, открыв клапаны P1, P9 и включив насос 3, горячее сусло направляют в двухконтурный пластинчатый теплообменник 5 для охлаждения до требуемой температуры. Затем сусло аэрируют и направляют в броидильное отделение.

Для сравнительной оценки эффективности работы варочного оборудования установок различных конструкций с предлагаемой установкой, были проведены опытно-промышленные испытания, результаты которых представлены в табл. 1.

Типы установок для варки сусла: 1 – 3-х аппаратная установка фирмы «Destila»; 2 – 2-х аппаратная установка фирмы «DBT»; 3 – 2-х аппаратная установка фирмы «ИСМ»; 4 – 2-х аппаратная установка фирмы «Destila»; 5 – 2-х аппаратная экспериментальная установка.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что варочное оборудование предложенной конструкции, по сравнению с оборудованием других конструкций, позволяет получить сусло, отличающееся от сравниваемых образцов при прочих равных условиях:

- наибольшими значениями действительного и видимого экстрактов;
- наибольшими значениями действительной и видимой степеней сбраживания;
- высоким уровнем сбраживаемых сахаров.

Опытный образец пива отличался наибольшим содержанием спирта и низким уровнем, не превышающим допустимых значений, таких соединений, как диметилсульфит (ДМС), ди-ацетил и пентандион, в наибольшей степени отрицательно влияющих на сенсорный профиль пива. При этом энергозатраты для опытного образца сусла оказались не выше, чем для сравниваемых образцов.

Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют о том, что предложенная установка, включающая в себя в себя заторно-суловарочный аппарат с выносным кожухотрубным теплообменником и фильтрационный аппарат, является оптимальной с точки зрения занимаемых производственных площадей и с учётом возможности получения сусла и пива высокого качества при низких энергетических затратах, что в современных условиях особенно актуально для минипивоварен.

Таблица 1 - Характеристики образцов сусле и пива, полученных с использованием варочных установок различных конструкций

Table 1 - Characteristics of samples a wort and beer, the cooking installations of various designs received with use

Характеристики образцов сусле и пива	Тип установки для варки сусле				
	1	2	3	4	5
Спирт, об %	4,8	4,65	5,2	5,25	5,28
Спирт, мас. %	3,8	3,64	4,05	4,11	4,13
Экстрактивность сусле, %	12,0	11,55	12,3	12,45	12,42
Плотность, г/см ³	1,00975	1,00901	1,0083	1,00843	1,00796
Действительный экстракт, %	4,71	4,45	4,48	4,52	4,41
Видимый экстракт, %	2,96	2,76	2,59	2,63	2,5
Действительная степень сбраживания, %	62,36	62,81	65,18	65,29	65,95
Видимая степень сбраживания, %	75,38	61,37	63,71	78,93	79,81
Энергозатраты, ккал/кг	438	419	450	454	451
Энергозатраты, кДж/100 мл	182	174	186	188	187
Фруктоза, г/л	0,09	0,12	0,1	0,469	0,477
Глюкоза, г/л	0,03	0,04	0,08	0,489	0,502
Сахароза, г/л	1,1	4,1	2,0	2,308	2,253
Мальтотриоза, г/л	3,4	3,5	2,0	4,708	4,217
Декстрины, г/л	34,5	27,8	32,4	33,564	33,600
ДМС, мкг/л	33	27	44	28	29
Диацетил, мкг/л	98	236	1267	114	118
Пентандион, мкг/л	49	96	1670	76	77

EXPERIMENT OF VALUATION EFFICIENCY OF WORK EQUIPMENT FOR PREPARATION OF MALT EXTRACT FOR SMALL BREWERIES

Hovhannisyan V.G., Meledina T.V., Prohorthik I.P.

equipment for preparation of malt extract, small breweries

The present experiments data for valuation efficiency of work the equipment diferent constructions for preparation of malt extract for small breweries. Proved by experiment economical efficiency used of the technological schem for preparation of malt extract high quality.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕГУЛЯТОРА РОСТА РЕТАЦЕЛ НА ОЗИМОМ РАПСЕ

Панасин В.И., Долинина В.В., Рымаренко Д.А.

ФГБУ «Центр агрохимической службы «Калининградский», ул. Молодой Гвардии 2/4,
г. Калининград, 236038, Россия, E-mail agrohimp_39@mail.ru

озимый рапс, регулятор роста растений Ретацел, краткосрочный мелкоделяночный опыт

Введение

Природно-климатические условия Калининградской области как по термическому режиму, так и по влагообеспеченности благоприятны для возделывания озимого рапса. Однако в последние годы из-за резких колебаний температур зимой часть посевов этой культуры погибала. При этом наименьшие потери от вымерзания установлены в тех хозяйствах, где с осени применялись комплексные удобрения и росторегуляторы. Поэтому испытание новых регуляторов роста, позволяющих повысить устойчивость растений к неблагоприятным условиям в зимний период и устойчивость к полеганию, является в настоящее время весьма актуальным.

Согласно договору № 6-и, заключенному с Автономной некоммерческой организацией «Инновационный центр новых технологий и регистрационных испытаний при ВНИИА им. Д.Н. Прянишникова», центром агрохимической службы «Калининградский» проведены испытания нового регулятора роста растений Ретацел на озимом рапсе. Цель исследований – установление биологической эффективности препарата Ретацел на озимом рапсе.

Материалы и методы

Препарат Ретацел представляет собой концентрат эмульсии хлормепикватхлорида с содержанием действующего вещества 750 г/л (ISO: Мепикват хлорид, 1,1-диметилпиперидин хлорид). Расход рабочего раствора – 250-300 л/га. По данным изготовителя, препарат после опрыскивания поглощается листьями и передвигается в точки роста, где ингибирует синтез гиббереллинов. При этом рост побегов замедляется, увеличивается их диаметр, что способствует повышению устойчивости растений к полеганию.

Испытания препарата Ретацел проводились в условиях краткосрочного мелкоделяночного опыта с озимым рапсом сорта Валеска. Сорт Валеска – линейный сорт нулевого типа немецкой селекции (оригинатор – Петерсен, Германия). Включен в Госреестр по Северо-Западному региону, в области районирован с 2000 года. Vegetационный период 334 дня. Сорт отличается высокой зимостойкостью, устойчивостью к полеганию и высокой урожайностью.

Почва – дерново-слабоподзолистая глееватая окультуренная легкосуглинистая на моренной супеси. Пахотный горизонт характеризуется близкой к нейтральной реакцией, средним содержанием органического вещества, высоким содержанием подвижных соединений фосфора и калия. Предшественник – залежь. Технология возделывания – общепринятая для данной культуры в области.

Схема опыта: 1. Контроль, без обработки; 2. Ретацел (2 л/га осенью, в фазу 3-4 листьев + 2 л/га весной); 3. Ретацел (3 л/га осенью, в фазу 5-7 листьев + 1,5 л/га весной); 4. (3 л/га осенью, в фазу 5-7 листьев + 2 л/га весной). Опыт заложен в четырехкратной повторности, общая площадь делянки 50 м², учетная – 25 м². Масличность в семенах рапса определяли по ГОСТ 10857-64. Статистическая обработка экспериментальных данных проведена методом дисперсионного анализа.

Результаты и обсуждение

Величина урожая озимого рапса во многом определяется условиями его перезимовки. В фазу возобновления весенней вегетации была проведена визуальная диагностика растений. На контрольном варианте гибель составила 24%, на варианте 2 с применением препарата Ретацел в ранний срок – 19%, на вариантах 3 и 4 – 14%. Таким образом, исследованный

препарат значительно увеличил зимостойкость растений озимого рапса, при этом наибольший эффект достигался обработкой Ретацелом в фазу 5-7 листьев.

Исследуемый препарат способствовал существенному повышению продуктивности агроэкосистемы. Так, к моменту прекращения осенней вегетации на контроле общая биомасса составила 3,3 т/га, на вариантах с применением Ретацела - 3,7; 4,4 и 4,5 т/га соответственно. Весной на обработанных регуляторах роста вариантах наблюдался ускоренный прирост биомассы по сравнению с контролем. В фазу начала бутонизации общая биомасса составляла по вариантам 13,8; 18,4; 24,1 и 24,4 т/га соответственно. Аналогичная закономерность прослеживалась и для массы корней. В фазу начала бутонизации она составляла по вариантам 2,9; 4,2; 5,0 и 5,3 т/га. В фазы цветения и зеленого стручка биомасса на втором варианте была на 50-60% выше по сравнению с контролем, на третьем и четвертом вариантах – в 2 – 2,3 раза выше. Перед уборкой урожая биомасса корней составила на контроле 1,82 т/га; на обработанных препаратом вариантах 2,51; 4,34 и 4,40 т/га соответственно. Таким образом, применение препарата Ретацел увеличивает общую биомассу и биомассу пожнивно-корневых остатков, что снижает потребность в органических удобрениях в севообороте.

Препарат оказал статистически достоверное влияние на урожайность зерна озимого рапса (табл. 1).

Таблица 1 - Влияние регулятора роста Ретацел на урожай семян озимого рапса, ц/га
Table 1 – The effect of plant growth regulator Retacel on seed crop of winter rape

Варианты	Повторения				Среднее	Прибавка урожая
	1	2	3	4		
1	22,5	23,5	23,1	23,6	23,2	-
2	24,2	27,4	24,8	28,1	26,1	2,9
3	24,7	29,5	31,0	32,9	29,5	6,3
4	28,5	32,5	28,6	29,6	29,8	6,6

$P = 3,21\%$; $HCP_{05} = 2,79$ ц/га

Варианты 3 и 4 достоверно не различаются, второй вариант дал существенную прибавку по сравнению с контролем, но она была значительно ниже, чем на третьем и четвертом вариантах.

Одним из наиболее важных качественных показателей семян озимого рапса является содержание в них масла. Обработка растений высокими суммарными дозами препарата «Ретацел» (варианты 3 и 4) заметно снизила масличность семян, соответственно на 7,1 и 10,2% по сравнению с контролем (50,2%), в то время как на варианте 2 статистически достоверного снижения масличности отмечено не было.

Следует отметить, что, несмотря на некоторое снижение масличности семян, варианты 2 и 3 дали статистически достоверную прибавку выхода масла с 1 гектара. На втором варианте выход масла с гектара был на 12% выше по сравнению с контролем, на варианте 3 – на 9,0%. Вследствие значительного снижения масличности семян на четвертом варианте прибавка выхода масла оказалась недостоверной.

Выводы

Осенняя обработка растений озимого рапса регулятором роста «Ретацел» оказывала положительное влияние на развитие корневой системы, способствовала повышению морозоустойчивости растений. Оптимальный срок осенней обработки – фаза 5-7 листьев. Двукратная – осенняя и весенняя – обработка исследуемым препаратом существенно повысила урожай семян и выход масла с одного гектара. Оптимальным способом применения регулятора роста Ретацел на озимом рапсе является сочетание осенней обработки в фазу 5-7 листьев дозой 3 л/га и весенней при возобновлении вегетации дозой 1,5 л/га.

EFFECT OF THE GROWTH REGULATOR RETATSEL ON WINTER RAPE

Panasin V.I., Dolinina V.V., Rymarenko D.A.

winter rape, growth regulator Retatsel, short-term small plot experience

Experience on winter rape by use of a growth regulator Retatsel showed a significant increase in grain yield. The optimal way to use a growth regulator is sprayings plants at autumn with dose of 3 liters per hectare and at spring - 1.5 liters per hectare.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕГУЛЯТОРА РОСТА МЕССИДОР НА ОЗИМОМ ЯЧМЕНЕ

Панасин В.И., Долинина В.В., Рымаренко Д.А.

ФГБУ «Центр агрохимической службы «Калининградский», ул. Молодой Гвардии 2/4,
г. Калининград, 236038, Россия, E-mail agrohim_39@mail.ru

озимый ячмень, регулятор роста Мессидор, краткосрочный мелкоделяночный опыт

Введение

Озимый ячмень имеет важное народнохозяйственное значение как зернофуражная и крупяная культура. Его зерно характеризуется относительно низким содержанием белка, что делает его ценным продуктом для пивоваренной промышленности. Ранняя уборка позволяет равномерно использовать технику и хорошо подготовить почву для последующей культуры. Озимый ячмень значительно превосходит яровой по урожайности, поэтому изучение различных методов повышения урожайности и качества зерна озимого ячменя в условиях Калининградской области весьма актуально.

Согласно договору № 11-и, заключенному с Автономной некоммерческой организацией «Инновационный центр новых технологий и регистрационных испытаний при ВНИИА им. Д.Н. Прянишникова», центром агрохимической службы «Калининградский» проведены испытания нового регулятора роста растений Мессидор на озимом ячмене. Цель исследований – установление биологической эффективности препарата Мессидор на озимом ячмене.

Материалы и методы

Препарат Мессидор представляет собой концентрат суспензии мепикват-хлорида с прогексадионом кальция (ISO: Мепикват хлорид – 300г/л; прогексадион кальция – 50 г/л). Расход рабочего раствора – 300 л/га. По данным изготовителя (БАСФ. Германия), препарат ингибирует синтез гиббереллинов, что препятствует растяжению клеток в длину. Это обеспечивает укорачивание и укрепление стебля, повышает устойчивость растений к полеганию.

Исследования препарата Мессидор проводились в условиях краткосрочного мелкоделяночного опыта с озимым ячменем сорта Уши на дерново-слабоподзолистой легкосуглинистой окультуренной почве, характеризующейся близкой к нейтральной реакцией, средним содержанием органического вещества, очень высоким содержанием подвижных фосфора и калия. Схема опыта: 1. Контроль, без обработки; 2. ЦеЦеЦе-750 – 1,5 л/га (эталон); 3. Мессидор – 0,6 л/га; 4. Мессидор – 1,0 л/га; 5. Мессидор – 1,5 л/га. Повторность – четырехкратная. Обработку росторегуляторами проводили весной в начале фазы выхода в трубку.

Белок в зерне озимого ячменя определяли фотометрическим методом согласно ГОСТ 10846-91. Статистическая обработка экспериментальных данных проведена методом дисперсионного анализа.

Результаты и обсуждение

В период вегетации на опытных делянках проводился осмотр растений на предмет поражения их болезнями. При осмотре растений в конце фазы выхода в трубку на нижних листьях было отмечено проявление гельминтоспориоза. Количество пораженных инфекцией растений было различным: 60% на контрольных вариантах, 35% на вариантах 2, 4 и 5, 40% на варианте 3. Различия между контрольным вариантом и обработанными росторегуляторами статистически достоверны на 5% уровне значимости. Таким образом, исследованные регуляторы роста обладают протекторным эффектом.

Нами исследовалась динамика изменения высоты растений по фазам их развития. В фазы конца выхода в трубку, конца цветения и конца налива зерна обработка высокими

дозами регуляторов роста (варианты 2 и 5) вызывала несколько большее сокращение высоты растений по сравнению с дозами Мессидора 0,5 и 1,0 л/га, однако к моменту наступления фазы полной спелости зерна различия сгладились и оказались статистически недостоверными. По сравнению с контролем на обработанных регуляторами роста вариантах уменьшение высоты растений составило 10 – 14%.

Перед уборкой урожая нами производилась оценка полегания растений по десятибалльной шкале. На контрольном варианте устойчивость к полеганию составила 4,5 балла, на вариантах 2 и 3 – 7 баллов, на вариантах 4 и 5 – 7,5 баллов. Таким образом, препарат Мессидор давал несколько больший эффект по сравнению с контрольным препаратом ЦеЦеЦе.

Уборка урожая проводилась в фазу полной спелости зерна. Учет крожайности проводился в пересчете на стандартную влажность зерна (14%). Невысокие дозы препарата Мессидор оказали статистически достоверное влияние на урожайность культуры (табл. 1).

Таблица 1 - Влияние регулятора роста Мессидор на урожайность зерна озимого ячменя, ц/га

Table 1 – The effect of plant growth regulator Messidor on seed crop of winter barley

Варианты	Повторения				Среднее	Прибавка урожая
	I	II	III	IV		
1	34,2	33,2	40,8	30,6	34,7	-
2	33,0	37,0	39,5	34,1	35,9	1,2
3	35,2	42,2	40,0	37,4	38,7	4,0
4	34,0	40,7	39,3	37,2	37,8	3,1
5	32,1	36,4	38,2	32,3	34,9	0,2

$P = 2,63\%$; $НСР_{05} = 2,95$ ц/га.

Аналогичная закономерность проявилась при учете урожая побочной продукции. Повышенные дозы регуляторов роста (варианты 2 и 5) не оказали статистически достоверного воздействия на урожайность основной и побочной продукции. Вероятно, применение относительно высоких доз регуляторов роста наряду с увеличением площади листа привело к уменьшению количества листьев на одном растении, в результате чего общая площадь фотосинтетически активной поверхности осталась приблизительно на уровне контроля.

Одним из наиболее важных показателей качества зерна озимого ячменя является содержание в нем белка. Повышение содержания белка – это положительное явление при заготовке зерна на корм, но при этом пивоваренные качества зерна ухудшаются. Обработка препаратом Мессидор привела к некоторому снижению содержания белка в зерне (табл. 2).

Анализ структуры урожая не выявил статистически достоверных результатов действия обоих регуляторов роста. Отмечалась тенденция некоторого увеличения массы зерен на одном растении и массы тысячи зерен.

Выводы

Обработка растений озимого ячменя в начале фазы выхода в трубку препаратом Мессидор способствовало уменьшению количества пораженных гельминтоспориозом растений на 20-25%. Регулятор роста Мессидор оказал положительное действие на урожайность зерна. Достоверные прибавки были получены на вариантах 3 и 4 (0,6 и 1,0 л/га). При этом содержание белка в зерне несколько снизилось. Таким образом, регулятор роста Мессидор улучшает пивоваренные качества зерна ячменя. Применение исследованного препарата в дозах 0,6 – 1,0 л/га является, на наш взгляд, обоснованным.

Таблица 2 - Влияние регулятора роста Мессидор на содержание белка в зерне озимого ячменя

Table 1 – The effect of plant growth regulator Messidor on seed crop of winter barley

Варианты	Урожайность, ц/га		Содержание белка, %	Выход белка, кг/га	Прибавка белка, кг/га
	на стандартную влагу	на абсолютно сухое вещество			
1	34,7	31,4	12,1	379,9	-
2	35,9	32,8	11,9	390,3	10,4
3	38,7	35,0	11,7	409,5	29,6
4	37,8	34,3	11,7	401,3	21,4
5	34,9	31,7	11,8	374,1	- 5,8
НСР ₀₅	2,95	2,55	0,4	-	

**THE EFFECT OF THE PLANT GROWTH REGULATOR MESSIDOR
ON WINTER BARLEY**

Panasin V.I., Dolinina V.V., Rymarenko D.A.

winter barley, growth regulator Messidor, short-term small plot experience

Experiments on winter barley using growth regulator Messidor showed a significant increase in grain yield. At the same time, grain protein content decreased slightly, brewing grain quality improved.

**ИЗМЕНЕНИЯ В ОБРАЗОВАНИИ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ
PHYTOPHORA INFESTANS НА РАСТЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ,
ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ ГЕНОМ Δ 12АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ**
Прядехина Е.В.¹, Юрьева Н.О.¹, Деревягина М.Н.², Голденкова-Павлова И.Н.¹, Загоскина Н.В.¹

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35,
г. Москва, 127276, Россия, E-mail: phenolic@ippras.ru

²ГНУ ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г.Лорха РАСХН, ул. Лорха, 23,
п. Красково Люберецкого района Московской обл., 140051, Россия

картофель, десатураза, фитофтора, полифенолы

Введение

Одной из важных проблем является выяснение механизмов действия биотических и абиотических факторов, в том числе и с использованием трансгенных растений [1]. И в этом плане большой интерес вызывают гены десатураз – ферментов, отвечающих за образование двойных связей в цепях ЖК и, следовательно, за изменение физических свойств биологических мембран [2]. При их введении в геном растений отмечены изменения в функционировании антиоксидантной системы, что способствует повышению их устойчивости как к низкой температуре, так и к действию патогенов [3, 4].

Известно, что к числу низкомолекулярных антиоксидантов относятся фенольные соединения (ФС), в том числе флавоноиды (ФЛ) – вещества, проявляющие высокую биологическую активность и синтезирующиеся во всех зеленых клетках растений [5,6]. Предполагают, что они способны инактивировать свободные радикалы, тем самым защищая клетки растений от активных форм кислорода, возникающих при действии стрессовых факторов [7].

Целью исследования было изучение влияния фитофтороза на образование ФС в растениях картофеля сорта Скороплодный, в том числе трансформированных геном Δ 12-десатуразы.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись растения картофеля (*Solanum tuberosum* L., раннеспелый сорт Скороплодный) и полученные из них трансгенные линии с геном Δ 12-ацил-липидной десатуразы (*desA*). Для получения трансгенных линий использовали конструкции, несущие ген *desA* из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 под контролем сильного конститутивного промотора 35S РНК CaMV [8]. Последовательность гена *desA* была транскрипционно слита с последовательностью репортерного гена *luc*VM3, кодирующего термостабильную лихеназу. Экспрессия целевого гена была подтверждена результатами полимеразной цепной реакции, а уровень экспрессии был оценен по активности лихеназы, входящей в состав гибридного белка [4]. Контролем служили нетрансформированные растения.

Для проведения опытов использовали растения, которые росли в горшках в течение 2 месяцев при +23-25°C, 16-час. фотопериоде, освещенности 6000-10000 люкс, влажности 75% (по 3-5 растений на генотип).

Сложную расу патогена *Phytophthora infestans* 1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11хуз выращивали на агаризированной среде из отвара овсяных хлопьев при 19°C в течение 14 дней. Суспензию для инокуляции получали посредством смыва зооспорангиев стерильной водой (концентрация составляла 20-25 конидий в поле зрения микроскопа при увеличении x120. Заражение и оценку растений проводили в соответствии с методами ВНИИКХ [9].

ФС извлекали из листьев растений экстракцией 96%-ным этанолом. Содержания суммы ФС и ФЛ проводили спектрофотометрическим методом с реактивом Фолина–Дениса и с 1%-ным водным раствором хлористого алюминия, соответственно [10]. Калибровочные кривые в обоих случаях строили по рутину.

Результаты и обсуждение

ФС представляют собой одни из наиболее распространенных в клетках высших растений представителей вторичного метаболизма [5]. Достаточно часто уровень их накопления связывают с функционированием хлоропластов, являющихся одним из основных мест их синтеза [11]. Кроме того, именно эти клеточные органеллы ответственны за синтез ФЛ – наиболее распространенных в надземных частях высших растений соединений фенольной природы. В связи с этим мы проанализировали суммарное содержание ФС и содержание ФЛ в листьях растений картофеля как контрольных, так и опытных вариантов (рис. 1)

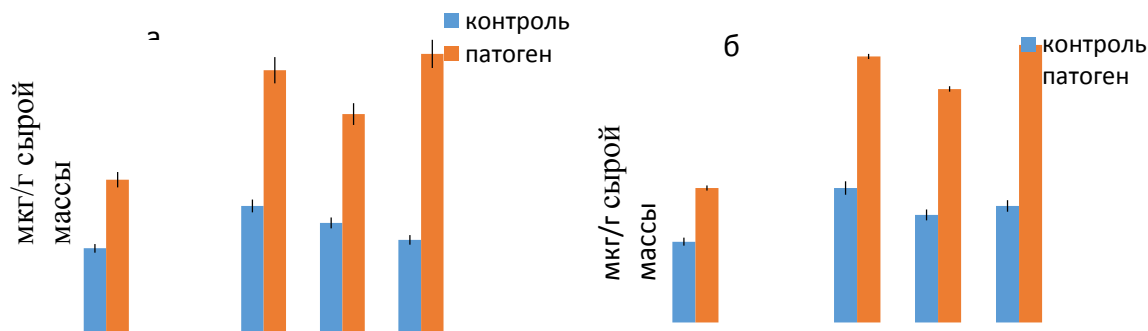


Рисунок 1 - Содержание фенольных соединений (а) и флавоноидов (б) в листьях контрольных и трансформированных геном *desA* растений картофеля, в том числе после действия *P. infestans* (К-контроль, 1-3 – трансгенные линии)

Figure 1 - The content of phenolic compounds (a) and flavonoids (b) in the leaves of control and transformed potato plants of *desA*, including after exposure to *P. infestans* (K control, 1-3 - transgenic lines)

Для трансгенных растений картофеля характерна более высокая способность к образованию ФС, по сравнению с контрольным вариантом. Исключением являлась лишь линия 3, у которой уровень этих веществ был равен контрольному варианту.

Как уже отмечалось нами ранее, основными компонентами фенольного комплекса листьев картофеля являются ФЛ [12]. Их содержание также было выше в трансгенных растениях, особенно у линии 1. Следовательно, при введении гена *desA* отмечалось повышение уровня ФС в листьях картофеля, особенно флавоноидной природы.

После заражения листьев фитофторой содержание ФС и ФЛ в них значительно увеличилось (в среднем в 2,5 и 2 раза, соответственно). Такой эффект достаточно часто отмечался и другими авторами [5]. Интересен тот факт, что в большей степени повышается суммарное содержание ФС, а флавоноидов – меньше, что предполагает активацию накопления ФС фенолпропаноидной природы.

Следовательно, растения картофеля, трансформированные геном *desA* из цианобактерии *Synechocystis sp.*, характеризуются повышенным содержанием АС, по сравнению с контрольными растениями, и более выраженной реакцией на действие патогенов, по сравнению с контролем.

Литература

1. Лутова Л.А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды // Сорос. образоват. журн. 2000. Т. 6. № 10. С. 10–17.
2. Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions // Photosynth. Res. DOI 10.1007/s11120-013-9823-4.
3. Демин И.Н., Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И. Введение гена *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерии повышает устойчивость растений картофеля к окислительному стрессу, вызванному гипотермией // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 5. С. 710–720.

4. Шимшилашвили Х.Р. Изучение экспрессии генов, вовлеченных в модификацию жирных кислот, на экспериментальных моделях: Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: Ин-т общ. генетики РАН. 2010. 25 с.
5. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
6. Bidel L.P.R., Coumans M., Baissac Y. Boological activity of phenolics in plant cells // Recent advances in polyphenol research / Eds Cantos-Buelga C., Escribano-Bailon M.T., Lattanzio V. Iowa, USA: Wiley-Blackwell, 2010. V. 2. P. 163–205.
7. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И. А., Круговых Н. Ф., Труфякин В. А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово. 2006. 556 с.
8. Герасименко И.М., Сахно Л.А., Головач И.С., Кищенко Е.М., Синдаровская Я.Р., Шимшилашвили Х.Р., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Получение растений, несущих гены ацил-липидных десатураз цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803. Информационный Вестник ВОГиС. 2010. Т. 14(1). С.127-133.
9. Шнейдер Ю.И., Яшина И.М., Ерохина С.А., Филина Н.И., Воловик А.С., Захарова-Кукушкина Л.Н. Методические указания по оценке селекционного материала картофеля на устойчивость к фитофторозу, ризоктониозу, бактериальным болезням и механическим повреждениям. М. 1980. 56 с.
10. Загоскина Н.В., Олениченко Н.А., Чжоу Юньвэй, Живухина Е.А. Способность различных сортов пшеницы к образованию фенольных соединений // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. С. 113-116.
11. Запрометов М.Н., Загоскина Н.В. Еще об одном доказательстве участия хлоропластов в биосинтезе фенольных соединений // Физиология растений. 1987. Т. 34. С. 165–172.
12. Загоскина Н.В., Прядехина Е.В., Лапшин П. В., Юрьева Н.О., Голденкова-Павлова И.В. Морфофизиологические и биохимические характеристики растений картофеля с различными уровнями экспрессии гена $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы // Известия РАН. Серия биологическая, 2014, 2: 142-149.

**CHANGE OF PHENOLIC COMPOUND PRODUCTION UNDER
PHYTOPHTHORA INFESTANS INFLUENCE ON POTATO PLANTS
TRANSFORMED BY $\Delta 12$ ACYL-LIPID DESATURASE GENE**

Pryadekhina E.V., Yuorieva N.O., Derevyagina M.N., Goldenkova-Pavlova I.V., Zagoskina N.V.

potatoes, desaturase, Phytophthora, polyphenols, flavonols

Studied the formation of phenolic compounds in potato plants and derived transgenic lines with the gene *desA*. Established that transgenic plants have a higher capacity for the formation flavonoids and phenolic compounds than the control. After infection with *Phytophthora* polyphenol content in leaves increased significantly, especially in the transgenic lines.

РЕТАРДАНТЫ В СИСТЕМЕ ЗАЩИТЫ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM L.*)

Рейтер А.Е., Роньжина Е.С., Берников Л.Р.

ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет»,
Советский пр., 1, г. Калининград, 236022, Россия, E-mail: agronomia@mail.ru

Triticum aestivum, ретарданты, рост, полегание

Введение

Полегание растений – одна из наиболее серьезных проблем в технологии выращивания озимой пшеницы в почвенно-климатических условиях Калининградской области [1].

Для борьбы с полеганием этой важнейшей сельскохозяйственной культуры наряду с агротехническими мероприятиями эффективным приемом является применение химических препаратов – ретардантов [2-4]. В результате длина соломины уменьшается [4].

Традиционно в технологии возделывания озимой пшеницы применяют ретардант ЦеЦеЦе 750 (д.в. хлормекватхлорид). Однако эффективность его действия неабсолютна, особенно для высокорослых и высокопродуктивных сортов, а его применение ограничивается сроками ожидания и возможно не позднее 37 стадии [2; 5; 6].

Швейцарская фирма Sygenta разработала для применения на озимой пшенице новый препарат Моддус (д.в. тринексапак-этил), который, по утверждению разработчиков, не только эффективно предотвращает полегание озимой пшеницы и может применяться в более поздние сроки - до появления колоса (стадии 39) [7]. Однако эффективность действия этого препарата в условиях Калининградской области не изучена. Поэтому целью данной работы явилось сравнительное изучение эффективности применения ретардантов ЦеЦеЦе750 и Моддуса для борьбы с полеганием озимой пшеницы в агроценозах.

Материалы и методы

Объектом исследования явилась озимая пшеница (*Triticum aestivum L. emend. Fiori et Paol.*) интенсивного сорта Зентос (Zentos) немецкой селекции (оригинатор - фирма «SW Seed Nadmersleben» GmbH). Пшеницу выращивали по интенсивной технологии с учетом почвенно-климатических условий. Почвы опытных полей являлись дерновоскрито-подзолистыми, среднесуглинистыми, рН_{сол.} 6,0-6,5, содержание гумуса 2,6-3%, доступных форм фосфора 13,1-15,0, обменного калия 29,0-32, мг/100 г, магния 2,1-2,5, кальция 10,5-11,3 ммоль/100 г, бора 0,53-0,6, меди 3,2-3,7, серы 5,9-6,7 мг/кг абсолютно сухой почвы.

Работа выполнена на базе сельскохозяйственного предприятия ООО «Агро-Новая», расположенном в Черняховском районе Калининградской области. Проводили полевые опыты. Количество делянок для каждого варианта опыта – 4, их расположение - систематическое шахматным методом [8]. Схема опыта представлена в табл. 1.

Таблица 1 - Схема опыта

Table 1 - Scheme of the experiment

Обработка	Опыт				Контроль
	1 вариант	2 вариант	3 вариант	4 вариант	
1 обработка	ЦеЦеЦе 750	ЦеЦеЦе 750	Моддус	ЦеЦеЦе 750	Без ретардантов
2 обработка	ЦеЦеЦе750 + Моддус	ЦеЦеЦе 750	Моддус	Моддус	Без ретардантов
Полегание,%	1	2	4	4	80

Результаты и обсуждение

Начало весеннего кушения было зарегистрировано 03 апреля. После этого растения переходили к интенсивному росту и развитию.

Рост растений продолжался в течение всего изученного временного интервала – с начала апреля, когда регистрировали начало весеннего кушения, до уборки растений. Увеличение длины стебля происходило в течение всего вегетационного периода, наиболее интенсивный рост отмечен в период от начала мая и до середины июля (рис. 1).

Оба ретарданта тормозили этот процесс, однако эффективность их действия была различной. Наиболее эффективным был первый вариант обработки. На необработанных, контрольных растениях длина стебля была наибольшей (рис. 1).

При этом толщина основания стебля у необработанных растений была значительно меньше, чем у обработанных, и эти различия увеличивались в онтогенезе (рис. 2).

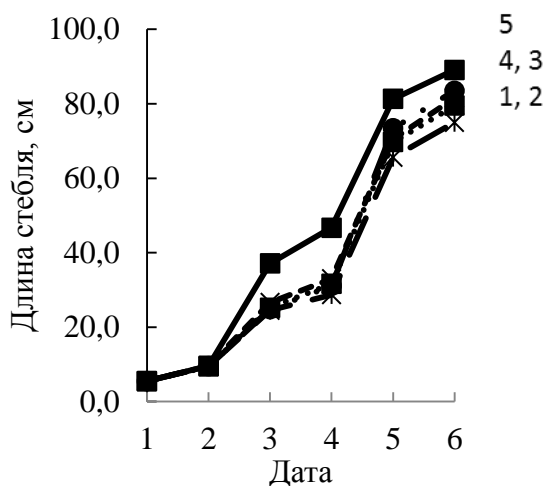


Рисунок 1 – Действие ретардантов Моддус и ЦеЦеЦе 750 на длину стебля растений озимой пшеницы в онтогенезе. ЦИИститут физиологии растений на рисунке обозначен вариант опыта в соответствии с табл. 1. На оси абсцисс: 1 – 03 апреля, 2 – 5 мая, 3 – 25 мая, 4 – 15 июня, 5 – 15 июля, 6 – 25 июля.

Figure 1 - The effect of retardants CCC and Moddus on the stem length of winter wheat plants. Figures mean type of treatment according to Table 1. Abscissa axis: 1 – 03rd of April, 2nd – 5th of May, 3rd – 25th of May, 4th – 15th of June, 5 – 15th of July, 6 – 25th of July.

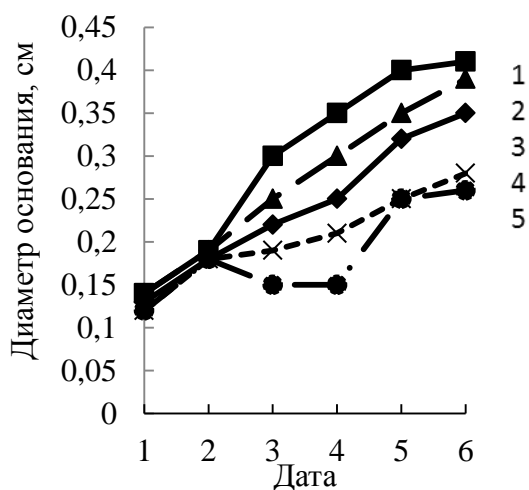


Рисунок 2 – Действие ретардантов Моддус и ЦеЦеЦе 750 на толщину стебля растений озимой пшеницы в онтогенезе. ЦИИститут физиологии растений на рисунке обозначен вариант опыта в соответствии с табл. 1. На оси абсцисс: 1 – 03 апреля, 2 – 5 мая, 3 – 25 мая, 4 – 15 июня, 5 – 15 июля, 6 – 25 июля.

Figure 2 - The effect of retardants CCC and Moddus on the stem diameter of winter wheat plants. Figures mean type of treatment according to Table 1. Abscissa axis: 1 – 03rd of April, 2nd – 5th of May, 3rd – 25th of May, 4th – 15th of June, 5 – 15th of July, 6th – 25th of July.

Аналогичную закономерность наблюдали и в отношении содержания в стеблях растений структурных полисахаридов - гемицеллюлоз и клетчатки. У необработанных растений содержание этих веществ было гораздо ниже, чем у обработанных, особенно по сравнению с первым вариантом опыта (табл. 2).

Заключение

Проведенная работа позволяет заключить, что Моддус и ЦеЦеЦе 750 сокращая длину стебля растений озимой пшеницы и увеличивая толщину его основания, стимулируя накопление скелетных образований в стеблях, предотвращают полегание. Следовательно, изученные препараты могут быть рекомендованы в технологии возделывания озимой пшеницы для борьбы с полеганием. Наиболее эффективно применение ЦеЦеЦе 750 в первую обработку и совместное применение ЦеЦеЦе 750 и Моддуса во вторую.

Таблица 2 - Действие ретардантов Моддус и ЦеЦеЦе 750 на содержание гемицеллюлоз и клетчатки в стеблях растений озимой пшеницы

Table 2 - The effect of retardants CCC and Moddus on the polysaccharides content in stems of winter wheat plants

Дата	Фракции углеводов	Опыт				Контроль
		1 вариант	2 вариант	3 вариант	4 вариант	
5.07	Гемицеллюлозы	4,7	3,3	4,2	3,3	1,5
	Клетчатка	7,8	5,0	6,4	5,3	5,8
5.08	Гемицеллюлозы	0,8	0,7	0,7	0,8	4,3
	Клетчатка	7,3	6,9	5,1	6,4	4,6

Литература

1. <http://www.agronome.info/>.
2. Кефели, В.И. Химические регуляторы растений / В.И. Кефели, Л.Д. Прусакова. - М.: Знание, 1985. - 63 с.
3. <http://www.belagroliga.by/>.
4. Зинченко, В.А. Химическая защита растений: средства, технологии, экологическая безопасность / В.А. Зинченко. - М: КолосС, 2006. - 232 с.
5. Никелл, Л. Дж. Регуляторы роста растений. Применение в сельском хозяйстве / Л.Дж. Никелл / Пер. с англ. В.Г. Кочанкова. Под ред. В.И. Кефели. - М.: Колос, 1984. - 192 с.
6. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений / Г.С. Муромцев, Д.И. Чкаников, О.Н. Кулаева, К.З. Гамбург. - М.: Агропромиздат, 1987. - 384 с.
7. <http://www.syngenta.ru/>.
8. Рейтер, А.Е. Опыт использования ретардантов на посевах озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в СХП «АгроНова» (Калининградская область) / А.Е. Рейтер, Е.С. Роньжина, Л.М. Григорович // Инновации в науке, образовании и бизнесе – 2012: X Международная конференция: материалы в 2-х ч. / ФГБОУ ВПО «КГТУ». – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВПО «КГТУ», 2012. – Ч. I. – С. 164-166.

RETARDANTS IN THE PROTECTION SYSTEM OF WINTER WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) PLANTS

Reyter A.J., Ron'zhina E.S., Bernikov L.R.

The effect of retardants CCC and Moddus on stem growth and structural polysaccharides compound of winter wheat plants in soil and climatic conditions of the Kaliningrad region was studied. It is shown that both pesticides reduce growth and stimulate hemicellulose and cellulose formation, reducing drowning of plants. It is found out that the most effective treatment is CCC 750 in the first processing and combined treatment of CCC 750 and Moddus in the second. In this case drowning of plants reduces significantly. It was concluded that Moddus is high-effective new retardant, which may be used in combination with CCC in the technology of winter wheat growing.

**ВЛИЯНИЕ МЕЛАНГОЗИДА-О НА ПИГМЕНТНЫЙ КОМПЛЕКС И
БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЭНДОГЕННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА
В ЛИСТЯХ ЯБЛОНИ**

Русу М.М., Шишкану Г.В., Балмуш Г.Т. Мащенко И.Е.

Институт генетики, физиологии и защиты растений НАН Молдовы,
г. Кишинев, Молдова,
E-mail: black78@mail.ru

яблоня, лист, стероидные гликозиды, пигменты, стимуляторы, ингибиторы роста

Рост и фотосинтез – основа единого продукционного процесса, интеграция которых тесно связана с гормональной системой и транспортом ассимилятов, обеспечивающих сложную донорно-акцепторную организацию организма. Что имеет непосредственное отношение к листу – основному донору соединений, используемых растением на рост и поддержание жизнедеятельности.

Одним из важнейших аспектов современных исследований роста, фотосинтеза и продуктивности растений является экзогенная регуляция с целью их оптимизации, где значительная роль отводится стероидным гликозидам, работающих в малых дозах, способных модулировать активность эндогенных регуляторов роста, пигментов, обеспечивающих метаболизм растений на определенном для каждой фазы вегетации уровне.

Материалы и методы

В своей работе мы взяли за основу, что одним из механизмов регуляции стероидных гликозидов является их влияние на обмен эндогенных ауксинов и полифенолов.

В связи с этим нами изучалось действие одного из представителей данного класса: Мелангозида-О на некоторые ростовые параметры, пигментогенез и биологическую активность эндогенных регуляторов роста в листьях яблони, районированных в Молдове, сортов Флорина и Голден Делишес в условиях лизиметра.

Для изучения влияния Мелангозида-О был заложен опыт по схеме: 1 Контроль (обработка деревьев водой), 2 Опыт (обработка деревьев раствором Мелангозида-О). За растениями велись фенологические наблюдения. Одновременно проводили отбор проб для анализа содержания пигментов (3) и биологической активности свободных ауксинов и ингибиторов роста (1). Растворитель изопропанол-аммиак-вода (10:1:1). Оценку пятен на гормональную активность вели по приросту отрезков coleoptилей пшеницы сорта Одесская 51. За достоверный процент стимуляции принимали 115% и выше, за достоверное торможение – 85% и ниже.

Результаты и обсуждение

Известно, что у листьев в ходе вегетации происходит смена донорно-акцепторных отношений, регуляция которых тесно связана с фитогормонами – биохимическим «языком», на котором общаются органы растения и экзогенными регуляторами роста.

Проведенные исследования показали, что деревья яблони весьма отзывчивы на применение Мелангозида-О. Следует отметить, что реакция деревьев на действие препарата была неодинаковой, однако на обоих сортах был отмечен положительный эффект.

Показано, что регуляторная роль Мелангозида-О сохраняется в течение всего периода вегетации, что дает возможность направленно регулировать физиологические процессы в растении.

Отмечены коррелятивные взаимоотношения между сортом, функциональными особенностями препарата, интенсивностью роста, содержанием пигментов и активностью фитогормонов.

Так, обработка оказывала стимулирующее действие на процессы роста: усиливала рост побегов в длину, способствовала увеличению размеров листовой пластинки – основного источника ассимилятов, от величины которой и ее фотосинтетической активности зависит продуктивность растений. Мелангозид-О приводил к увеличению размеров листовой пластинки, где длина и ширина превышала контроль на 5-6%, а площадь на 10-12%, что способствовало активации работы фотосинтетического аппарата, интенсивность которого зависит от содержания фотосинтетических пигментов, являющихся одними из чувствительных индикаторов реакции фотосинтетического аппарата на экзогенное воздействие и играющих важную роль в реализации фотосинтетической функции и продуктивности растений.

Так, о физиологическом состоянии и фотосинтетической способности листьев можно судить по их пигментному уровню – показателю быстрого реагирования.

Показано, что обработка стимулирующе действовала на пигментогенез. Отмечено, что Мелангозид-О способствовал увеличению суммарного содержания зеленых пигментов, хлорофилла «а», «b», каротиноидов.

Особо четкое действие оказывал препарат на содержание хлорофилла «а», что имеет важное значение, ибо он определяет физиологическое состояние и потенциальную возможность растения в формировании урожая. Отмечены различия по сумме хлорофиллов и хлорофиллу «а» в зависимости от расположения на вегетативных или репродуктивных образованиях, где у последних все показания были выше. Показана разница в содержании хлорофилла «а» в зависимости от яруса кроны. Обработка способствовала увеличению данного показателя в большей степени в среднем ярусе. Отмечено, что соотношение хлорофилл «а»/хлорофилл «b» в опыте выше по сравнению с контролем, что свидетельствует о более активной фотосинтетической деятельности опытных растений. Мелангозид-О оказывал положительное влияние и на содержание хлорофилла «b» – дополнительного пигмента, участвующего в миграции энергии и связанного с мобилизацией защитных сил организма.

Препарат способствовал и увеличению каротиноидов, играющих важную роль в фотосинтезе, выполняющих защитную функцию, предотвращая разрушение хлорофилла.

Увеличение при обработке и хлорофилла «b» и каротиноидов, являющихся компонентами антиоксидантной защиты растений важно, что возможно, является усилением адаптивных возможностей данных сортов.

Анализируя динамику накопления пигментов в различные фазы вегетации, установлены отличия по фонду пигментов и соотношению различных форм хлорофиллов. При обработке сорта имели больше ассимиляционную поверхность и большее насыщение пигментами.

Система стимуляторов и ингибиторов – тот инструмент, которым геном управляет процессами роста и развития.

Мелангозид-О оказывал влияние на изменение биологической активности эндогенных регуляторов роста в зависимости от фазы вегетации, сорта.

Так в период интенсивного роста однолетних побегов он способствовал возрастанию стимуляторной активности, главным образом ИУК, увеличению соотношения стимулятор/ингибитор и некоторому накоплению ингибиторов фенольной природы, которые тесным образом связаны с ауксиновым обменом. Наличие фенолов в этот период, возможно, связано с тем, что последние участвуя в регуляции ауксинового обмена – блокируют его отток, что приводит к увеличению биологической активности ИУК и что, очевидно, связано с увеличением ростовых параметров листа. Совместное присутствие ИУК и фенолов, возможно связано одновременно с проявлением как рост регулирующих, так и антистрессовых свойств.

Наибольшие изменения в гормональном балансе под воздействием препарата отмечены в период закладки и дифференциации цветочных почек, который характеризовался снижением стимулирующей активности, в частности ИУК, уменьшением соотношения стимулятор/ингибитор и значительным накоплением ингибирующей активности по сравнению с предыдущим периодом. Под влиянием Мелангозида-О отмечено снижение соотношения

ИУК/флоридзин за счет усиления активности ИУК-оксидазы и флоридзина, являющегося активатором ИУК-оксидазы, а следовательно регуляторов этого соотношения, что указывает на значительную роль флоридзина в процессе закладки и дифференциации цветочных почек.

Заключение

Таким образом, Мелангозид-О активно воздействует на рост и развитие яблони. Воздействие его осуществляется через изменение пластидных пигментов, где основные изменения претерпевают хлорофилл «а», «b», каротиноиды и биологической активности эндогенных регуляторов роста, в частности ИУК и флоридзина, что возможно, является одним из механизмов воздействия Мелангозида-О на растение.

Мелангозид-О – перспективный препарат для яблони. Перспективность его определяется высокой эффективностью, обусловленной низкой концентрацией, обеспечивающей активное воздействие на рост, развитие и продуктивность яблони, создавая оптимальный уровень пигментов и стабилизацию гормонального баланса для определенной фазы вегетации.

Литература

1. Кефели В.И. и др. Методы определения фитогормонов, дефолиантов и гербицидов // М. «Наука», 1973.
2. Киризий Д.А. Фотосинтез и рост растений в аспекте ДАО // Логос. Киев, 2004. 189 с.
3. Шлык А.А. Биохимические методы в физиологии растений. М. «Наука», 1971.
4. Kintea P. Chemistry and biological activity of steroid saponins from moldavian plants. Plenum publishing corp. 1996, p. 309-334.

THE INFLUENCE OF THE MELANGOZID-O ON THE PIGMENT COMPLEX AND BIOLOGICAL ACTIVITY GROWTH REGULATORS IN LEAFS AN APPLE TREES

Rusu M., Shishcanu G., Balmush G., Mashcenco N.

apple tree, Malangozid-O, biological activity, hormonal balance, growth stimulators, growth inhibitors, pigments

The influence of the vegetal compounds with steroid glycoside structure – Melangozid-O on the pigments complex and on the level of the growth stimulators and inhibitors of an apple trees was studied. Melangozid-O changed the direction of metabolic processes and growth stimulators/growth inhibitor ratio increase of apple productivity. Melangozid-O can be used for increase productivity of apple trees.

**ВЛИЯНИЕ ФУНГИЦИДОВ-ПРОТРАВИТЕЛЕЙ НА РАЗВИТИЕ БОЛЕЗНЕЙ
ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)**

Рыбкина А.В., Григорович Л.М.

ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет»,
Советский пр., 1, г. Калининград, 236022, Россия, E-mail: agronomia@mail.ru*озимая пшеница, фунгицид- протравитель, эффективность*

Продолжительная осенняя вегетация озимой пшеницы в агроклиматических условиях Калининградской области благоприятна для инфицирования растений возбудителями болезней в фазу начала кущения. Решающую роль в стабилизации фитосанитарного состояния агроценозов озимой пшеницы на ранних этапах развития растений играет предпосевное протравливание семенного материала. В хозяйствах региона, где до 100% семян обрабатываются фунгицидами, рациональный выбор протравителя и определение его влияния на развитие болезней является актуальным и своевременным решением вопроса эффективности этого приема.

Материалы и методы

Опыты из пяти вариантов в четырех повторностях по определению эффективности протравливания проводились в ЗАО «Залесское молоко» Полесского района в течение трех вегетационных периодов. Испытывали фунгициды: Дивиденд Экстрим с нормой расхода 0,75 л/т (действующее вещество дифеноконазол+ципроконазол, производитель ООО «Сингента», Швейцария), Кинто Дуо - 2,5 л/т (действующее вещество тритиконазол+прохлораз, БАСФ, Германия), Ламадор - 0,2 л/т (действующее вещество протиоконазол+тебуконазол, Байер, Германия), Планриз - 0,5 л/т (*Pseudomonas fluorescens*, штамм AP-33) на фоне контроля без протравливания [1]. Объектом исследований явилась озимая пшеница сорта Цобель РС1 семенного назначения (страна происхождения Германия).

Общая площадь опытных полей от 21 га до 60 га, делянок – 0,9 га, предшественник – яровой рапс. Тип почвы - дерново-слабоподзолистая глееватая; гранулометрический состав – лёгкий суглинок. Агрохимические показатели: содержание гумуса в пахотном слое 2,2-2,5%; P^нсолевой 5,6-6,7; доступного фосфора 31,6-33,1 мг/100г; доступного калия 24,2-24,8 мг/100г; доступной серы 10,8-12,1 мг/кг. Срок сева - 25 сентября с нормой высева семян 180 кг/га (посевной агрегат: трактор JD8530 + сеялка Horsch). Протравливание проведено непосредственно перед посевом с помощью протравочной машины ПС-10. Контроль состояния растений озимой пшеницы и фитосанитарной ситуации в посевах осуществляли в течение осенне-весеннего периода вегетации культуры [2].

Результаты и обсуждение

Мониторинг фитопатологического состояния агроценозов озимой пшеницы в агроландшафтах Калининградской области указывает на наличие в осенний период следующих болезней листового аппарата: мучнистая роса (*Erysiphe graminis* D.C.), бурая ржавчина (*Puccinia recondita* Rob. et Desm.), септориоз листьев (*Septoria tritici* Rob.). Анализ динамики распространения болезней показал, что ежегодно в фазу начала кущения симптомы септориоза проявлялись на 2-10 % растений, мучнистой росы - на 2-6 % растений, бурой ржавчины – на 1-12% растений. В благоприятных погодных условиях для развития болезней годы число зараженных растений мучнистой росой достигало 20%, мучнистой росой 14-47%, бурой ржавчиной 45-53% (табл. 1).

Результаты наших наблюдений в рамках полевого опыта по применению фунгицидов-протравителей показали распространение листовых инфекций озимой пшеницы в условиях теплой и продолжительной, с достаточным увлажнением осени 2013 г., когда прекращение

Таблица 1 - Динамика распространенности болезней озимой пшеницы в осенний период вегетации в агроценозах озимой пшеницы Калининградской области, %

Table 1 - Dynamics of disease spread during autumn vegetation period in agroecosystems of winter wheat, Kaliningrad region, %

Название болезни	Годы									
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Септориоз листьев	2	20	3	2	1	6	10	5	10	19
Мучнистая роса	3	47	6	2	16	6	5	6	5	14
Бурая ржавчина	45	53	10	0	0	1	2	12	2	2

вегетации растений наблюдалось во второй половине ноября. В фазу кущения озимой пшеницы перед уходом в зиму активнее всего развивался септориоз листьев, который был отмечен на каждом растении всех вариантов с первым баллом развития. Мучнистая роса была обнаружена в варианте с применением Кинто Дуо на 11% растений, тогда как в контроле пораженных растений было в три раза больше (35%). Симптомы бурой ржавчины обнаружены в контроле на каждом десятом растении, а также в варианте с Дивиденд Экстрим. Слабое проявление корневых гнилей отмечено в варианте с Кинто Дуо у 15% растений, с Планризом – у 21% растений, тогда как в варианте с непотравленными семенами более половины растений (53%) было поражено болезнью.

Несмотря на то, что в предыдущие годы исследований осенью растения были свободны от болезней, в ранневесенний период фитопатогенная ситуация обострялась. В фазу кущения корневые гнили проявлялись повсеместно с разным числом пораженных растений и развитием, однако в вариантах с фунгицидами Кинто Дуо и Ламадор количество пораженных растений (4-10%) меньше, чем в контроле (65-70%) и в других вариантах. Признаки септориоза отмечены на каждом растении во всех вариантах, но интенсивность развития ниже в вариантах с химическими протравителями Дивиденд Экстрим (21-24%) и Ламадор (12-23%), тогда как в контроле она составила 31-34%. Мучнистая роса проявлялась на отдельных растениях.

Учитывая значительные потери урожая (до 25-30%) при активном развитии болезней озимой пшеницы во время вегетации протравливание семенного материала является важным профилактическим приемом в защите растений от вредных организмов при интенсивных технологиях возделывания [2].

Анализ биологической урожайности зерна озимой пшеницы показал положительную роль предпосевной обработки семян: прибавка урожайности по отношению к контрольному варианту варьировала от 7,5 до 31%. Наибольшие значения получены в вариантах, где семена были обработаны фунгицидами Ламадор (прибавка урожайности составила 22,1-31%) и Кинто Дуо (21-27%) [3].

Заключение

Таким образом, опытное применение фунгицидов при протравливании семян озимой пшеницы в агроэкологических условиях Калининградской области продемонстрировало положительные результаты: по сравнению с контрольным вариантом отмечено снижение развития болезней в агроценозе культуры и увеличение биологической урожайности.

Литература

1. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Справочное издание.- М., 2013.- 636 с.
2. Фитосанитарная экспертиза зерновых культур (Болезни растений): Рекомендации.- М., - 2002.- 140 с.

3. Якупова А.В. Эффективность фунгицидов при протравливании семян озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в условиях Калининградской области / А.В. Якупова. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет», 2013. – С. 223-229.

**IMPACT OF FUNGICIDES-PROTECTANTS DISEASE WINTER WHEAT
(*TRITICUM AESTIVUM* L.)**

Rybkina A.V., Grigorovich L.M.

winter wheat, fungicides-protectants, impact

Thus, the experimental use of fungicides in seed dressing shows the positive results for the agro ecological conditions of Kaliningrad region. In comparison with the control, reduce of disease spread in winter wheat agrocenosis and increase in biological productivity were experimentally proved.

ПРЕДОБРАБОТКА СЕМЯН ОЗИМОЙ РЖИ ЦИТОДЕФОМ СНИЖАЕТ В РАСТЕНИЯХ ТЯЖЕСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА, ИНДУЦИРОВАННОГО ПАРАКВАТОМ

Семенова А.С., Лукаткин А.С.

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева»;
ул. Большевистская, 68, г. Саранск, 430005, Россия, E-mail: alinabio@mail.ru*озимая рожь, цитодеф, паракват, перекисное окисление липидов, каталаза, аскорбатпероксидаза***Введение**

Современные технологии выращивания сельскохозяйственных культур включают использование богатого арсенала средств защиты растений от сорной растительности и фитопатогенов. При этом высока вероятность негативного воздействия пестицидов на культурные растения. Одно из интенсивно развивающихся направлений защиты культур от неблагоприятных воздействий – использование регуляторов роста (РР) различной природы [1]. В то же время эффективность РР на фоне действия пестицидов (в т.ч. гербицидов) изучена очень слабо [2]. Одной из важнейших групп РР являются вещества с цитокининовой активностью; их преимуществом является низкая концентрация, в которой они оказывают специфическое действие, и высокая эффективность в плане повышения стрессоустойчивости растений [3–5]. Одним из новых препаратов этой группы является цитодеф [1-фенил-3-(1,2,4-триазол-4-ил)мочевина], разработанный во ВНИИ химических средств защиты растений [6] и обладающий выраженной цитокининовой активностью [7]. Несмотря на широкое применение РР с цитокининовой активностью для защиты растений от стрессов различной природы, механизмы их протекторного действия изучены недостаточно. Особый интерес представляет изучение механизмов защитного действия РР на возделываемые культуры при обработке гербицидами с целью повышения устойчивости растений к их действию. Целью данного исследования было выяснение концентрационных эффектов регулятора роста цитодефа и гербицида параквата (метилвиологена) на проявления окислительного стресса в молодых растениях озимой ржи, оцениваемого по интенсивности перекисного окисления липидов и активности антиоксидантных ферментов каталазы и аскорбатпероксидазы.

Материалы и методы

Объектами исследования служили семена и молодые растения озимой ржи (*Secale cereale* L., сорт Эстафета Татарстана). Семена замачивали 8 ч в растворах цитодефа (от 10^{-11} до 10^{-8} М/л), промывали водопроводной водой, проращивали на воде до возраста 3 сут. и затем выращивали в рулонной культуре на $\frac{1}{2}$ среде Кнопа при температуре 22–24 °С, 16-часовом световом дне и освещенности 2000 лк. В качестве водного контроля (ВК) использовали растения, выращенные из семян, замоченных 8 ч в воде. По достижении растениями возраста 7–10 сут. (второй лист) проводили обработку разными концентрациями параквата (10, 100 или 250 мкМ). Визуальные повреждения наблюдались только при самой высокой концентрации параквата. Спустя 1, 2 и 3 сут. после обработки гербицидом в листьях определяли интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) по накоплению малонового диальдегида (МДА) [8], активность аскорбатпероксидазы (АПО) и каталазы [9]. Все опыты повторяли 3 раза, в каждом опыте использовали не менее 10 растений для каждого варианта. Статистическую обработку проводили по общепринятым в биологии методикам.

Результаты и обсуждение

Интенсивность ПОЛ. Интенсивность процессов ПОЛ показывает степень нарушения клеточных мембран при стрессорных воздействиях [4, 8]. Обработка растений ржи паракватом (в ВК) приводила к увеличению интенсивности ПОЛ, практически линейному с возрастанием концентрации параквата. Такая тенденция наблюдалась в течение всех трех сут. после обработки гербицидом. Предобработка семян озимой ржи цитодефом в изучаемом диапазоне концентраций приводила к увеличению накопления МДА относительно ВК, особенно в концентрациях 10^{-8}

⁹ и 10^{-8} М/л. Очевидно, это косвенно указывает на то, что синтетические РР могут оказывать стрессорное воздействие на растения, особенно в относительно высоких концентрациях.

Обработка семян цитодефом с последующим опрыскиванием растений паракватом привела к неоднозначным результатам. Так, спустя 1 сут. после обработки гербицидом интенсивность ПОЛ была существенно снижена в последствии 10^{-11} и 10^{-10} М/л цитодефа; несколько уменьшена на фоне высоких доз гербицида – при 10^{-9} М/л цитодефа; и увеличена в последствии обработки 10^{-8} М/л цитодефом. Наибольшее снижение интенсивности ПОЛ относительно обработанного гербицидом варианта выявлено для самой малой концентрации цитодефа (10^{-11} М/л) на фоне самой высокой концентрации гербицида (250 мкМ). Сходная динамика сохранялась в последующие дни измерения, с некоторым повышением интенсивности ПОЛ для всех изучаемых групп спустя 2 сут. после обработки паракватом. Таким образом, предобработка семян озимой ржи цитодефом (особенно в дозах 10^{-11} и 10^{-10} М/л) приводила к снижению интенсивности ПОЛ при наибольшей концентрации параквата (250 мкМ), но оказалась менее эффективной при низкой концентрации гербицида (10 мкМ). Также малоэффективной была обработка цитодефом в концентрациях 10^{-8} и 10^{-9} М/л.

Активность каталазы. Каталаза представляет собой один из основных ферментов, участвующих в антиоксидантной защите растительных клеток; ее активность резко возрастает при увеличении субстрата (H_2O_2), поэтому фермент считается индуцибельным [9]. В наших опытах обработка растений ржи (ВК) паракватом вызывала значительное увеличение активности каталазы спустя 1 сут. после обработки, с последующим снижением до уровня контроля спустя 2 суток, и дальнейшее снижение (ниже контроля) спустя 3 сут. после обработки. Предобработка цитодефом привела к небольшому повышению (максимально на 37%) активности каталазы относительно ВК, наиболее выраженному при концентрациях РР 10^{-10} и 10^{-9} М/л.

Предобработанные цитодефом растения, подвергнутые действию параквата, показывали как увеличение, так и снижение активности каталазы спустя 1 сутки, с последующим уменьшением активности фермента с удлинением периода после обработки гербицидом. Полученные результаты по активности каталазы в динамике стрессорного воздействия можно трактовать двояко: с одной стороны, высокая активность фермента свидетельствует о большей интенсивности окислительного стресса, продуцирующего субстрат для ферментативной активности; с другой стороны, чем выше активность каталазы, тем выше антиоксидантная защита растительных клеток. Нужно отметить, что предобработка семян озимой ржи цитодефом во всех концентрациях способствовала поддержанию активности каталазы на уровне контроля или выше его. Спустя 1 и 2 сут. после обработки паракватом наибольшая активность каталазы отмечена в вариантах обработки 10^{-11} – 10^{-9} М/л цитодефом; а спустя 3 сут. после обработки паракватом активность каталазы была более стабильной в группах с концентрацией цитодефа 10^{-9} и 10^{-8} М/л. Таким образом, по мере удлинения периода после обработки гербицидом наблюдали смещение оптимальной защитной концентрации цитодефа от более низкой (10^{-11} М/л) к более высокой (10^{-8} М/л).

Активность АПО. Аскорбатпероксидаза является вторым ферментом, задействованным в утилизации H_2O_2 в растительных клетках, и ее активность также важна для антиоксидантной защиты [9]. Выявлено, что обработка паракватом растений озимой ржи вызывала снижение активности АПО, прогрессирующее с удлинением периода после обработки. Предобработка растений цитодефом (ВК) в большинстве вариантов приводила к уменьшению активности АПО. Таким образом, действие и гербицида, и РР чаще индуцировало понижение активности АПО, что свидетельствует о нарушениях антиоксидантной защиты в растительных клетках [9].

В опыте с обработкой растений паракватом на фоне замачивания семян в цитодефе выявлена неоднозначная реакция АПО, т.е. как повышение активности, так и снижение относительно гербицида. Более высокая активность АПО спустя 2 сут. после опрыскивания паракватом выявлена у вариантов с предобработкой цитодефом в концентрациях 10^{-11} и 10^{-9} М/л, а спустя 3 сут. – 10^{-11} М/л цитодефом (для всех концентраций гербицида) и 10^{-8} М/л цитодефом (при концентрациях параквата 10 и 100 мкМ).

Заключение

На растениях озимой ржи выявлено, что и предобработка семян цитодефом, и опрыскивание листьев паракватом приводили к появлению симптомов окислительного стресса. Эти эффекты в сильной степени зависели от использованных концентраций. В то же время регулятор роста цитодеф способствовал нормализации состояния растений озимой ржи на фоне обработки гербицидом, что проявлялось в снижении интенсивности ПОЛ, нормализации активности каталазы и АПО в листьях растений. Максимальному снижению параметров окислительного стресса при всех концентрациях параквата способствовала предобработка цитодефом в концентрациях 10^{-11} и 10^{-10} М/л. Наиболее выраженный защитный эффект цитодефа был в вариантах обработки паракватом в концентрациях 250 мкМ и 100 мкМ.

Литература

1. Ремпе Е.Х., Воронина Л.П., Батурина Л.К. Регуляторы роста растений как фактор снижения негативного действия пестицидов // *Агрохимия*. 1999. № 3. С. 64–69.
2. Смолин Н.В., Бочкарев Д.В., Девяткина Т.Ф., Никольский А.Н., Дворецкий С.А. Как повысить эффективность применения гербицидов на озимой пшенице // *Защита и карантин растений*. 2012. № 11. С. 29–30.
3. Лукаткин А.С., Старкина М.И. Влияние тидиазурона на устойчивость проростков огурца к стрессовым факторам // *Агрохимия*. 2011. № 10. С. 31–38.
4. Башмаков Д.И., Сазанова К.А., Пыненкова Н.А., Лукаткин А.С. Влияние синтетического регулятора роста цитодеф и тяжелых металлов на окислительный статус растений огурца // *Физиология растений*. 2012. Т.59. №1. С. 67–73.
5. Авальбаев А.М., Юлдашев Р.А., Сафутдинова Ю.В., Аллагулова Ч.Р., Фатхутдинова Р.А., Шакирова Ф.М. Влияние 6-бензиламинопурина на рост и гормональную систему проростков пшеницы в условиях солевого стресса // *Агрохимия*. 2010. № 9. С. 60–65.
6. Шаповалов А.А., Зубкова Н.Ф. Отечественные регуляторы роста растений // *Агрохимия*. 2003. № 11. С. 33–47.
7. Зубкова Н.Ф., Шаповалов А.А. Цитодеф – новый регулятор роста растений // *Защита и карантин растений*. 2003. № 3. С. 27–28.
8. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 1. Образование активированных форм кислорода при охлаждении растений // *Физиология растений*. 2002. Т. 49. С. 697–702.
9. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 2. Активность антиоксидантных ферментов в динамике охлаждения // *Физиология растений*. 2002. Т. 49. С. 878–885.

PRETREATMENT OF WINTER RYE SEEDS BY CYTODEF REDUCES THE SEVERITY OF OXIDATIVE STRESS CAUSED BY PARAQUAT IN PLANTS

Semenova A.S., Lukatkin A.S.

winter rye, cytodef, paraquat, lipid peroxidation, catalase, ascorbate peroxidase

The effect of pretreatment of winter rye seeds by synthetic growth regulator cytodef on the change the activity of antioxidative enzymes and lipid peroxidation (LPO) was considered in young plants of winter rye (*Secale cereale* L.) affected by paraquat. It was revealed reduction of LPO intensity and sustain the activity of catalase and ascorbat peroxidase after herbicide treatment in plants pretreated by cytodef at low concentrations (10^{-9} - 10^{-11} M / L).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АРОНИИ В ПРОИЗВОДСТВЕ ТВОРОГА

Серпунина Л.Т., Сечко Н.В.

ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет», Советский проспект, 1, г. Калининград, 236022, Россия, E-mail: serpunina@mail.ru

арония, творог, качество, кислотность, кислотный способ, кислотно-сычужный способ, хранение

Введение

В России потребление молока и молочных продуктов увеличилось до 248 кг, но не достигло еще рекомендуемого рационального уровня 340 кг. Основной оборот в группе молочных продуктов по-прежнему определяют традиционные продукты: молоко (31%), творог (15%), сметана и масло (19%) [1]. В этих условиях актуальной проблемой является необходимость экономии молочного сырья для выпуска объемов требуемого количества молочных продукта, т.к. например, для изготовления 1 кг творога требуется 5 литров молока. С учетом этого необходимо разрабатывать ресурсосберегающие технологии молочных продуктов путем комбинирования основного сырья с другими компонентами.

Самым быстрорастущим сектором молочного рынка является производство йогуртов, сыров, а также различных десертов, творожных изделий и продуктов с биологическими и фруктовыми добавками. Современная теория функционального питания требует новых подходов к созданию пищевых продуктов, сбалансированных по пищевой и биологической ценности. снабжение населения такими продуктами должно содействовать решению проблем, связанных с удовлетворением физиологических потребностей населения различных возрастных групп в белковых компонентах, а также в незаменимых факторах: витаминах и минеральных элементах. Эти разработки направлены на увеличение творческого долголетия и сохранения здоровья населения, профилактику заболеваний, сопутствующих старению. Одним из путей улучшения структуры питания является производство обогащенного ягодами компонентами творога при одновременном сохранении его качества и срока хранения.

Полезные свойства аронии (черноплодной рябины) обусловлены содержанием в ней комплекса водорастворимых витаминов (А, С, В₁, В₂, Е, Р, РР, каротина), минеральных веществ (марганца, меди, бора, йода, магния, молибдена, железа), а также антоцианатов. В плодах аронии содержатся сахара, фолиевая, никотиновая, яблочная и другие органические кислоты, дубильные и пектиновые вещества. В плодах рябины (как и в плодах фейхоа) содержится много йода, поэтому они полезны при диффузном токсическом зобе. В мякоти ягод найдены также амигдалин, кумарин и другие соединения. В листьях и цветках аронии обнаружены производные кверцетина, большие количества неохлорогеновой кислоты, рутин и гипрозид.

Сушеные ягоды черноплодной рябины являются также ценным лекарственным сырьем. Выявлено, что в 3 столовых ложках (50 г) сухих плодов заключено столько витамина Р, которое обеспечивает его суточную дозу при авитаминозе. Одними из самых полезных свойств этой ягоды являются нормализация артериального давления и понижение уровня холестерина в крови. Плоды аронии назначают при различных нарушениях в свертывающей системе крови, кровотечениях, ревматизме, атеросклерозе, сахарном диабете и аллергических заболеваниях. Исследования последних лет показали, что черноплодная рябина улучшает функционирование печени, а регулярное употребление этой ягоды повышает иммунитет и положительно влияет на работу эндокринной системы.

Анализ литературных источников не выявил работы, в которых изучались особенности сочетания черноплодной рябины с творогом. С учетом этого проведены экспериментальные работы по оценке возможности введения ягод аронии в состав творога, полученного традиционными способами.

Материалы и методы

Исследования по совершенствованию рецептуры творога с использованием аронии выполнены применительно к творогу с массовой долей жира 5%. В качестве исходного сырья применяли творог, изготовленный двумя способами: кислотным и кислотно-сычужным.

Ягоды аронии заготавливались в осенний период и хранились до эксперимента в морозильной камере при температуре минус 8°C. Перед проведением экспериментальных работ замороженную ягоду частично дефростировали и измельчали на блендере в течение 3 мин. В творог добавляли измельченную массу в количестве 5% и тщательно перемешивали. Экспериментальные образцы комбинированного творога фасовали по 100 г в пластиковые контейнеры и хранили в условиях бытового холодильника при температуре 5-6 °С.

Исходные и опытные образцы оценивали по комплексу стандартных органолептических, микробиологических, физико-химических показатели [2, 3].

Результаты и обсуждение

Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФА_nМ) в процессе хранения комбинированного творога позволило выявить наличие в продукте молочнокислых бактерии рода *Streptococcus*. Они не являются патогенными, т.к. используются при производстве творога, сметаны, кисломолочных напитков и других продуктов. Этот род объединяет виды: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus acetoinicus*, *Streptococcus thermophilus*. Все молочнокислые стрептококки грамположительные, имеют клетки шаровидной формы, располагаются в зависимости от вида попарно, короткими и длинными цепочками. Так же были обнаружены *Lactobacillaceae* (молочнокислые палочки), молочнокислые палочки, которые относятся к семейству *Lactobacterium*. По морфологии эти бактерии имеют форму палочек, расположенных по одиночке, попарно, цепочками.

Из патогенной микрофлоры на питательной среде сабуро были обнаружены плесени *P. Actinomyces*, *P. Penicillium*, *P. Alternaria*, *P. Oidium*. При проведении микробиологического анализа выявлено, что на черноплодной рябине присутствуют плесени *P. Actinomyces*, *P. Alternaria*. Указанные микроорганизмы потом появляются и в твороге с аронией, но при последующем хранении они погибают.

При исследовании комбинированного творога бактерии группы кишечных палочек (БККП), *Escherichia coli*, коагулазоположительные стафилококки, патогенные организмы и сальмонеллы обнаружены не были. По результатам микробиологических анализов можно заключить, что при хранении экспериментальных вариантов творога активного роста бактерий не наблюдалось. При этом установлено, что гигиенические требования безопасности пищевых продуктов для нового продукта не отличались от нормативных значений, регламентированных для творога, изготовленного традиционным способом (таб.).

Таблица - Показатели качества творога с аронией

Table - The quality indicators of cottage cheese with chokeberry addition

Показатели	Нормативные значения	Кислотный способ	Кислотно-сычужный способ
Массовая доля жира, %	4-5	4,3	4,8
Массовая доля влаги, %	75,0	72,0-73,0	74,0-75,0
Кислотность, ° Т	170-230	80,0-90,0	82,0-102,2
КМАФА _n М, КОЕ/г	1,0·10 ⁷	1,0·10 ⁶	1,0·10 ⁶

При введении 20% черноплодной рябины в состав творога жирностью 5% видоизменялись в наилучшую сторону органолептические свойства исходного продукта. При этом дополнительно зафиксирован приятный цвет и нежный вкус с легким запахом ягод аронии. В отсутствии других вкусовых компонентов не было отмечено негативных оттенков вкуса.

Физико-химические показатели комбинированных вариантов творога сохранились на уровне нормативных данных, характеризующих промышленные партии продукции (табл.).

В процессе хранения влажность контрольного и комбинированного творога достоверно не менялась. Влажность творога с ягодным наполнителем находилась после хранения в пределах от 73,0- 75,0%, что не превысило нормируемый уровень данного показателя.

Заключение

Подтверждена целесообразность введения в творог ягод черноплодной рябины в количестве 20%. Это позволяет получить творожную массу с хорошими вкусовыми, питательными свойствами. За счет комбинирования можно не только экономить белковый компонент – творог, но также и расширить ассортимент творожных изделий с низким диапазоном сахара для диабетического питания.

Предварительно зафиксирована хорошая хранимоспособность творога. Даже при отсутствии специальных тароупаковочных материалов срок реализации экспериментальных вариантов комбинированного творога составили 8 дней, вместо 5 дней для контрольных образцов.

Литература

1. Мусина О.Н., Щетинин М.П. Поликомпонентные продукты на основе комбинирования молочного и зернового сырья. Мусина О.Н. Поликомпонентные продукты на основе комбинирования молочного и зернового сырья. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2010. – С. 48-57.

2. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.1078 – 01.– М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 267 с.

3. Федеральный закон «Технический регламент на молоко и молочную продукцию» № 88-ФЗ с изменениями №163-ФЗ. - Введен 12.12.2008 –М, 2010. – 99 с.

ADDITION OF CHOKEBERRY IN PRODUCTION OF COTTAGE CHEESE

Serpunina L., Sechko N.

chokeberry, cottage cheese, quality, acidity, acid method, acid-rennet way storage

Adding of raw fragmented chokeberry to cottage cheese improves organoleptic qualities and prolongs the term of its storage up to 8 days.

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КЕДРОВОГО СТЛАНИКА
СЕВЕРО-ВОСТОКА ЯКУТИИ**

Сивцева С.В.

ФГОАУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова»,
ул. Кулаковского, 48, г. Якутск, 677000, Россия, E-mail: Lilya_Sivtseva@mail.ru

кедровый стланик, Pinus pumila, экстракты, антибактериальная активность, тест-культуры

Разработка новых высокоэффективных лекарственных средств для профилактики, контроля и лечения бактериальных инфекций на основе растительного сырья, является одной из важнейших задач современной фармацевтической науки. Большую ценность для медицины в качестве основы для создания новых высокоэффективных препаратов для лечения и профилактики бактериальных заболеваний представляют растительные экстракты.

Летучие вещества лесобразующих хвойных деревьев рода *Pinus* обладают антибактериальной и антифунгальной активностью [5,6] и широко используются как биологически активные вещества [7]. В настоящее время внимание исследователей привлекают лекарственные растения, экстракты из которых не только обладают бактерицидной активностью, но и подавляют персистентный потенциал патогенов [1], что затрудняет их паразитирование в организме хозяина и способствует быстрой элиминации из очага воспаления.

Несомненный интерес представляет изучение растительных экстрактов, полученных из хвойных растений, которые характеризуются высокой биологической активностью. Известно, что эфирные масла хвойных растений оказывают противовоспалительное и бактерицидное действие, используются при заживлении ран и при лечении гнойных поражений кожи [2,3]. В то же время не изучено влияние растительных экстрактов хвойных растений на персистентные свойства условно-патогенных микроорганизмов.

Связи с этим целью данной работы было исследование различных экстрактов кедрового стланика на антибактериальную активность. Фитомасса объекта исследования собрана во время стационарно-маршрутных работ (середина июля) с популяций Оймяконских хребтов (Северо-Восток Якутии).

Нами получены и апробированы водные, водно-спиртовые и спиртовые экстракты *Pinus pumila* по степени воздействия на рост и развитие тест культур – микроорганизмов методом Кирби-Бауэра [4] с модификациями. В качестве тест-культур использованы *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*. Для выращивания тест-культур в лабораторных условиях, исследования их многообразных свойств и длительного хранения использованы питательные среды, отвечающие стандартам (по составу, стерильности, прозрачности, легкой усвояемости), создающие оптимальные условия для роста, размножения и жизнедеятельности микроорганизмов.

По данным эксперимента изученные экстракты *Pinus pumila* обладают различной бактериальной активностью. Спиртовые экстракты обладают высокой ингибирующей активностью (75-80%) по отношению к росту и развитию всех использованных тест-культур, но в различной степени (с зоной подавления роста в 0,6-3 см). Водно-спиртовые экстракты проявили среднюю антибактериальную активность (45%) по отношению к росту микроорганизмов, и также - в различной степени (с зоной подавления роста в 0,3-0,6 см). Водные экстракты проявили низкую антибактериальную активность (10-25%) с зоной подавления роста тест-культур в 0,2-0,3 см (табл. 1).

Таблица 1 - Антибактериальная активность различных видов экстрактов кедрового стланика

Table 1 - Antibacterial activity of various extracts of *Pinus pumila*

Вид экстракта	Тест-культура	Степень подавления, %
Водный	<i>Staphylococcus aureus</i>	10±2
Водно-спиртовой	<i>Staphylococcus aureus</i>	45±3
Спиртовой	<i>Staphylococcus aureus</i>	75±2
Водный аппаратом Соксклета	<i>Staphylococcus aureus</i>	15±2
Водно-спиртовой аппаратом Соксклета	<i>Staphylococcus aureus</i>	45±3
Спиртовой аппаратом Соксклета	<i>Staphylococcus aureus</i>	75±3
Водный	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10±2
Водно-спиртовой	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45±1
Спиртовой	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	77±1
Водный аппаратом Соксклета	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20±2
Водно-спиртовой аппаратом Соксклета	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45±3
Спиртовой аппаратом Соксклета	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75±2
Водный	<i>Escherichia coli</i>	15±3
Водно-спиртовой	<i>Escherichia coli</i>	45±1
Спиртовой	<i>Escherichia coli</i>	75±1
Водный аппаратом Соксклета	<i>Escherichia coli</i>	25±3
Водно-спиртовой аппаратом Соксклета	<i>Escherichia coli</i>	45±1
Спиртовой аппаратом Соксклета	<i>Escherichia coli</i>	76±1
Водный	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20±1
Водно-спиртовой	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	45±2
Спиртовой	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	77±1
Водный аппаратом Соксклета	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25±1
Водно-спиртовой аппаратом Соксклета	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	45±2
Спиртовой аппаратом Соксклета	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	80±2
Водный	<i>Proteus vulgaris</i>	20±3
Водно-спиртовой	<i>Proteus vulgaris</i>	45±2
Спиртовой	<i>Proteus vulgaris</i>	75±1
Водный аппаратом Соксклета	<i>Proteus vulgaris</i>	20±1
Водно-спиртовой аппаратом Соксклета	<i>Proteus vulgaris</i>	45±1
Спиртовой аппаратом Соксклета	<i>Proteus vulgaris</i>	78±2
Водный	<i>Bacillus cereus</i>	15±2
Водно-спиртовой	<i>Bacillus cereus</i>	45±2
Спиртовой	<i>Bacillus cereus</i>	76±1
Водный аппаратом Соксклета	<i>Bacillus cereus</i>	20±1
Водно-спиртовой аппаратом Соксклета	<i>Bacillus cereus</i>	45±1
Спиртовой аппаратом Соксклета	<i>Bacillus cereus</i>	80±2

Спиртовой экстракт кедрового стланика и экстракт, выделенный через аппарат Соксклета, хорошо подавляют рост и развитие *Staphylococcus aureus*, степень подавления роста и развития составляет 75%. Спиртовой экстракт хорошо подавляет рост и развитие *Pseudomonas aeruginosa*, степень подавления роста составляет 77%. Спиртовой экстракт ап-

паратом Соксклета на 76% подавляет рост и развитие *Escherichia coli*. Спиртовой экстракт аппаратом Соксклета подавляет рост и развитие *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus* на 80%.

В целом водный экстракт кедрового стланика проявил низкую антибактериальную активность. Водный экстракт аппаратом Соксклета ингибирует рост *Staphylococcus aureus* на 15%. Водный экстракт аппаратом Соксклета подавляет рост *Pseudomonas aeruginosa* на 20%. Водный экстракт аппаратом Соксклета подавляет рост *Escherichia coli* на 25%. Водный экстракт аппаратом Соксклета подавляет рост *Klebsiella pneumoniae* на 25%. Водный экстракт и водный экстракт аппаратом Соксклета подавляет рост и развитие *Proteus vulgaris* на 20%. Водный экстракт аппаратом Соксклета *Pinus pumila* подавляет рост и развитие *Bacillus cereus* на 20%.

Таким образом, спиртовые экстракты *Pinus pumila* можно рекомендовать к использованию для профилактики острых и хронических заболеваний вызванных микроорганизмами, или использовать в качестве основы против *S. aureus*, *P. aeruginosa* - спиртовой экстракт и спиртовой экстракт, выделенный аппаратом Соксклета; против *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *B. cereus* - спиртовой экстракт, выделенный аппаратом Соксклета.

Литература

1. Бухарин О.В., Челпаченко О.Е., Усвяцов Б.Я. и др. Влияние лекарственных растений на антилизоцимную активность микроорганизмов // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т. 5. С. 11-14.
2. Ефремов Е.А., Ефремов А.А. Компонентный состав эфирного масла октябрьской лапки пихты сибирской красноярского края // Химия растительного сырья. 2010. Т. 3. С. 121-124.
3. Лоулесс Дж. Энциклопедия ароматических масел. М.: Крон-Пресс, 2000. 287 с.
4. Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.S., Turk M. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method // Am. J of Cl. Pathology. 1986. V. 45. P. 493-496.
5. Krauze-Baranowska M., Mardarowicz M., Wiwart M. Antifungal activity of the essential oils from some species of the genus *Pinus* // Zeitschrift für Naturforschung. 2002. V. 57. P. 478-482.
6. Essential oils from coniferous trees are antibacterial and antifungal // Immunotherapy Weekly. 2004. P. 52-53.
7. Kubeczka K.-H., Schultze W. Biology and chemistry of conifer oils // Flavour and Fragrance Journal. 1987. V. 2. N4. P. 137-148.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *PINUS PUMILA* NORT-EASTERN YAKUTIA

Sivtceva S.V.

Pinus pumila, extracts, antibacterial activity, test culture

Water, aqueous-alcoholic, alcoholic extracts and extracts with Soksklet's device of *Pinus pumila* (Pall.) Regel of the North-Eastern Yakutia (63°27'30.6" NL, 142°54'58.0" EL), on antibacterial activity are analyzed.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА ДИОФУР НА СОДЕРЖАНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ САЛАТА (*LACTUCA SATIVA L.*)

Силкина О. В., Винокурова Р.И.

ФГБОУ ВПО «Поволжский государственный технологический университет», пл. Ленина, 3,
г. Йошкар-Ола, 424000, Россия, E-mail: vinri@mail.ru

биологически активные вещества, биостимуляторы, Диофур, метаболизм растений, химические элементы

Введение

В настоящее время для эффективного ведения сельского хозяйства все более актуальным становится применение биостимуляторов роста растений. На смену химическим средствам повышения урожайности приходят биоорганические регуляторы роста, в основе разработки, которых лежит культура клеток вторичных метаболитов растительных организмов. В данном исследовании при выращивании растений салата предлагается использование уникального препарата Диофур [1, 2], полученного из мутантного штамма культивируемых *in vitro* клеток диоскореи, а также изучение его влияния на метаболические процессы и накопление биологически значимых химических элементов в листьях данной культуры.

Целью данного исследования явилось определение влияния препарата Диофур на содержание микро - и макроэлементов в листьях салата (*Lactuca sativa L.*). Основную часть химических элементов растения поглощают из почвы, поэтому для повышения качества их усвоения и обеспечения нормального фито-иммунологического функционирования организма предложена обработка растений салата биостимулятором Диофур, с последующим анализом содержания в листьях таких химических элементов как калий, медь, цинк, марганец, магний и свинец [3]. Также представляло интерес выявление наиболее эффективной методики обработки растений с последующими рекомендациями. Объектом исследования являются растения салата, однолетники, скороспелая культура, период вегетации, которой составляет 30-40 дней. Урожайность данной культуры составляет 20 – 40 т/га.

Материалы и методы

Исследования *in vitro* производили в динамике роста растений салата. Семена высевались на специально подготовленную почву с ранжированием эксперимента на 5 групп с учетом обработки экспериментальных групп препаратом Диофур. Первая (нулевая) группа являлась контрольной, в которой растения и семена не подвергались обработке препаратом. Вторая экспериментальная группа растений подвергалась предварительному замачиванию семян (1 час в растворе Диофура, 1 мг/л). Третья экспериментальная группа растений обрабатывалась препаратом в процессе роста с интервалом 5-7 дней путем опрыскивания вегетативной массы из расчета 1 мкг Диофура на 1 литр воды. Четвертая группа подвергалась и замачиванию семян, и опрыскиванию в процессе вызревания, растения пятой экспериментальной группы поливали раствором (1 мкг/л) также с интервалом в 5-7 дней.

Обработка экспериментального материала проводилась методами корреляционного и регрессионного анализов, описательной статистики с использованием программ Статистика, SPSS и Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Содержание химических элементов в листьях растений различных экспериментальных групп оценивали методом нормирования. В ходе данного исследования выявлены следующие закономерности (рис.1).

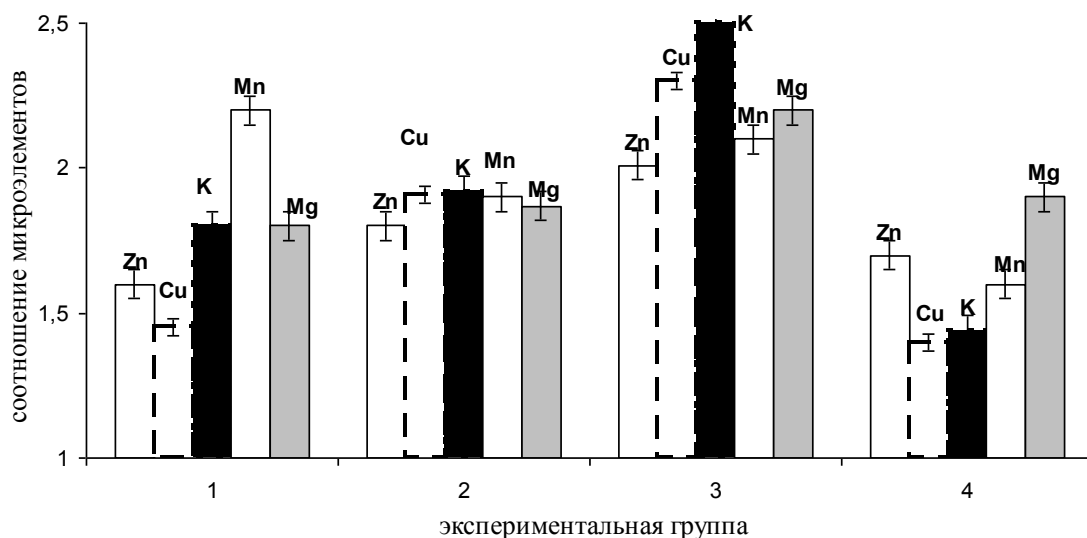


Рисунок 1 - Относительное содержание химических элементов в листьях салата в различных экспериментальных группах

Figure 1 - Relative content of chemical elements in *Lactuca sativa* L. in various experimental groups

Среднее содержание всех исследуемых элементов в биомассе салата в группах, обработанных биостимулятором, значительно выше значений в контрольной группе. При этом количественное соотношение среднего содержания таких важнейших химических элементов как калий, магний, медь и цинк значительно превышает в экспериментальных образцах группы № 3, подвергшихся опрыскиванию препаратом и предварительному замачиванию семян. Содержание марганца максимально для образцов из группы № 1 (семена растений предварительно замачивались в растворе препарата Диофур). В листьях растений, для которых применялось лишь опрыскивание, содержание данного элемента лишь в 1,5 раза превышало значения, наблюдаемые для контрольных образцов. По-видимому, это связано с физиологической ролью марганца, он участвует в ряде ферментативных реакций, в том числе, в процессе прорастания семян. Содержание всех химических элементов в листьях растений экспериментальных образцов с прикорневым внесением раствора биостимулятора (группа № 4, рис. 1), значительно уступало значениям для образцов групп № 2 и № 3 и практически не превышало контрольное значение.

В данном исследовании проведен мониторинг содержания свинца в листьях салата. Ионы свинца в небольших количествах (<200 мг/кг субстрата) способны оказывать положительное воздействие на содержание в листьях растений хлорофилла и на интенсивность фотосинтеза. Высокие значения могут оказывать губительное воздействие на ферментативную и фотосинтетическую активность растительного организма. Содержание данного микроэлемента в нашем исследовании не превышало порового уровня (70 мг/кг субстрата). В двух рассматриваемых вариантах содержание свинца практически не отличалось от контроля. В экспериментальных образцах, которые опрыскивались биостимулятором Диофур, содержание данного микроэлемента в 1,5 -1,7 раз превышало контрольные значения. Полученные результаты согласуются с данными [4], из которых следует, что отдельные элементы питания усваиваются листьями намного быстрее, чем корневой системой из почвы.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в случае применения препарата Диофур содержание основных химических элементов в листьях салата преимущественно выше по сравнению с контролем, при этом максимальные результаты отмечены при комплексной обработке данным препаратом, что позволяет рекомендовать препарат Диофур с целью повышения резистентной устойчивости при возделывании культуры *Lactuca sativa* L.

Литература

1. Зиновьева, С.В. Адаптогенное действие фураностаноловых гликозидов *Dioscorea deltoidea* Wall на окислительные процессы растений томатов в условиях биотического стресса / С. В. Зиновьева, Ж. В. Удалова, И. С. Васильева, С. А. Ванюшкин и др. // Прикл. биохимия и микробиол. – 2005. – Т. 41. – № 3. – С. 347-353.
2. Титова, М.В. Длительное аппаратное выращивание суспензионной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall в полупроточном режиме / М. В. Титова, Н. А. Шумило, И. Е. Куличенко, В. В. Коростелев и др. // Биотехнология. – 2006. – № 2. – С. 28-31.
3. Силкина, О.В. Сезонная динамика содержания хлорофиллов и микроэлементов в формирующейся хвое *Abies sibirica* L. и *Picea abies* L. / О. В. Силкина, Р.И. Винокурова // Физиология растений. – 2009. – Т. 56. – № 5. – С.1-7.
4. Лихочвор, В. Особенности листовой подкормки / В. Лихочвор // Зерно: Ежемесячный журнал современного агропромышленника. – 2008. – № 5. – С. 54-55. - ISSN 1990-5890.

RESEARCH OF INFLUENCE OF THE PREPARATION DIOFUR ON THE CONTENT OF MINERAL SUBSTANCES IN LEAVES OF *LACTUCA SATIVA* L.

Silkina O.V., Vinokurova R.I.

biostimulators, Diofur, mineral substances, studying of a metabolism of plants, effective methods of introduction of biologically active agents

In article results of researches on studying of influence of new biologically active preparation Diofur on the contents micro and macrocells are given in leaves *Lactuca sativa* L. And contents studying the basic biologically significant elements in leaves of this crop is studied.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ СЕМЕЙСТВА WAMP ЗЛАКОВ

Слезина М.П.¹, Коростылева Т.В.¹, Истомина Е.А.¹, Славохотова А.А.¹, Рогожин Е.А.²,
Пухальский В.А.¹, Одинцова Т.И.¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ул. Губкина, 3, г. Москва, 119991,
Россия, E-mail: iogen@vigg.ru

²ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, Россия, E-mail: office@ibch.ru

Triticum kiharae Dorof. et Migusch., пшеница, антимикробные пептиды, иммунитет растений, гевеиноподобные пептиды

Введение

Антимикробные пептиды (АМП) – важнейшие компоненты защитной системы всех живых существ [1]. Они подавляют рост и развитие патогенных микроорганизмов, действуя в микромолярных концентрациях. Считается, что основной мишенью действия АМП является мембрана патогенов, а механизм ингибирования связан с нарушением ее целостности. По сходству аминокислотных последовательностей и пространственной структуры выделяют несколько семейств АМП растений: дефензины, тионины, гевеино- и ноттиноподобные пептиды, липид-переносящие белки и харпинины. Исследования АМП необходимы для понимания функционирования сложной, многокомпонентной иммунной системы растений. Помимо фундаментального значения, эти работы важны с практической точки зрения: при поиске генов-кандидатов для трансформации растений и создания устойчивых к болезням форм сельскохозяйственных растений. Более того, изучение АМП представляет несомненный интерес для разработки на их основе лекарственных препаратов нового поколения. По сравнению с традиционными антибиотиками АМП обладают рядом преимуществ: они способны быстро убивать клетки-мишени, обладают широким спектром действия, активны в отношении штаммов, устойчивых к другим антибиотикам. Важнейшим достоинством АМП является трудность селекции устойчивых форм патогенов, что позволяет рассматривать эти соединения в качестве основы для разработки новых эффективных лекарств.

Ранее нами из семян высокоустойчивого вида пшеницы *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch. были выделены два новых АМП, WAMP-1a и WAMP-1b, относящиеся к ранее неизвестному подсемейству гевеиноподобных пептидов. Эти пептиды обладали высокой ингибирующей активностью в отношении широкого спектра фитопатогенов [2], и поэтому представляли несомненный интерес для дальнейших исследований. Нами было установлено, что помимо гексаплоидной пшеницы гены-гомологи WAMP есть у родственных видов *Triticum* и *Aegilops* [3]. Все они кодируют идентичные пептиды WAMP, различающиеся по единственному аминокислотному остатку в положении 34 полипептидной цепи.

Цель настоящей работы состояла в дальнейшем структурно-функциональном исследовании пептидов семейства WAMP и кодирующих их генов. Конкретными задачами исследования было (1) выяснение роли замены в положении 34 в биологической активности пептидов WAMP, (2) поиск генов-гомологов пептидов WAMP у представителей семейства Злаковые (родов *Oryza*, *Hordeum*, *Avena*, *Secale*, *Triticale*).

Материалы и методы

Поиск гомологов генов-гомологов пептидов WAMP у представителей семейства Злаковые

Геномную ДНК выделяли из 3-дневных проростков Злаковых (риса, ячменя, овса, ржи и тритикале) с помощью набора реактивов для выделения ДНК Genomic DNA Purification Kit. Полученную ДНК (10 нг) использовали в качестве матрицы для ПЦР. Для амплификации кодирующей части гена использовали пару специфичных праймеров, сконструированных на

основе известной последовательности кДНК. Полученные ПЦР-продукты выделяли из агарозного геля, клонировали в рAL-TA-вектор и секвенировали.

Экспрессия рекомбинантных пептидов в клетках Escherichia coli

Последовательность ДНК, кодирующую WAMP, получали методом амплификации с синтетическими олигонуклеотидами, а затем вставляли по соответствующим эндонуклеазам рестрикции в экспрессионный вектор рЕТ-32b(+). Рекомбинантный полипептид получали в составе гибридного белка с тиоредоксином. Клетки *E. coli* BL21 (DE3) трансформировали полученной конструкцией. Экспрессию белка индуцировали добавлением IPTG до концентрации 0,2 мМ. Выделение гибридного белка проводили методом аффинной хроматографии на металлоаффинной смоле TALON Superflow. Расщепление гибридного белка по остатку метионина проводили бромцианом. Рекомбинантный полипептид выделяли из реакционной смеси с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Luna C18 с использованием градиента ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте. Чистоту целевого полипептида подтверждали МАЛДИ-времяпролетной масс-спектрометрией и N-концевым секвенированием по Эдману.

Определение антимикробной активности пептидов

Антимикробные свойства рекомбинантных пептидов WAMP определяли по степени ингибирования прорастания спор, конидий или зооспорангиев грибов рода *Fusarium*. Для этого методом последовательного разведения готовили растворы пептида разных концентраций и добавляли к суспензии спор, содержащей ~4000 спор в 1 мл суспензии. Полученную смесь инкубировали при 22°C. Степень ингибирования прорастания спор оценивали как отношение числа проросших спор к общему числу спор в суспензии. Ингибирующую активность пептида выражали в виде IC₅₀, то есть такой концентрации пептида, которая необходима для 50%-ного ингибирования прорастания спор. Эксперимент выполнялся в трех повторностях.

Результаты и обсуждение

Ранее нами из семян пшеницы *Triticum kiharae* Dorof. et Migush. было выделено два новых антимикробных пептида WAMP-1a и WAMP-1b [2]. Хотя эти пептиды имели гомологию с гевеиноподобными АМП растений, они обладали уникальными структурными особенностями: в их молекулах было обнаружено 5 дисульфидных связей; причем расположение дисульфидов в них отличалось от того, что было ранее известно для гевеиноподобных пептидов [2,4]. Кроме того, в хитин-связывающем сайте этих пептидов, который, как полагают, непосредственно участвует во взаимодействии с хитином клеточных стенок патогенов, консервативный остаток серина заменен на глицин. Такой замены не было обнаружено ни в одном хитин-связывающем белке растений. Было неясно, каким образом все это сказывается на ингибирующей активности пептидов WAMP. Поиск генов-гомологов у близкородственных видов злаков (*Triticum* и *Aegilops*) показал, что они есть практически у всех исследованных видов и кодируют идентичные пептиды, различающиеся по единственному 34-ому положению полипептидной цепи, где встречаются несколько аминокислотных остатков – лизин, аланин, глутаминовая кислота и аспарагин [3]. Роль этой замены в биологической активности пептидов WAMP оставалась неизвестной. В настоящей работе был продолжен поиск генов-гомологов WAMP у других представителей семейства злаковые. У всех исследованных видов (ячмень, овес, рис, рожь, тритикале) были обнаружены гены семейства *wamp*, кодирующие предшественники этих пептидов. Все предшественники имеют одинаковую структуру и состоят из сигнального пептида, области зрелого пептида и С-концевого продомена. Наиболее вариабельными областями молекул предшественников оказался сигнальный пептид и С-концевой продомен. Последовательность зрелого пептида высоко консервативна, в положении 34 выявлены остатки лизина и аланина. Лишь у гомолога WAMP ячменя в этом положении обнаружен валин, кроме того, у этого пептида есть и ряд других отличий в аминокислотной последовательности. Высокий консерватизм пептидов семейства WAMP в эволюции свидетельствует о большой функциональной значимости этих пептидов.

Для выяснения возможной роли вариабельного аминокислотного остатка в эволюционно консервативных последовательностях пептидов WAMP были получены 2 рекомбинант-

ных пептида: WAMP-2, с остатком лизина в положении 34 и WAMP-3.1 – с остатком глутаминовой кислоты. Тестирование биологической активности рекомбинантных пептидов проводили в отношении трех видов грибов рода *Fusarium*, которые эффективно ингибировались пептидами WAMP-1a и WAMP-1b пшеницы. Следует отметить, что фузариумы способны поражать растения, принадлежащие различным семействам, вызывая гниль корней, плодов, семян, а также угнетение роста и преждевременное увядание. Некоторые грибы рода *Fusarium* являются патогенами человека, поражая людей с ослабленным иммунитетом. Исследование антифунгальной активности пептидов WAMP-2 и WAMP-3.1 в отношении фузариевых грибов в тестах *in vitro* показало, что WAMP-2 обладает примерно в 1.5 раз более высокой активностью, чем WAMP-3.1. Полученные данные свидетельствуют о том, что положение 34 в пептидах WAMP является функционально значимым и влияет на антифунгальную активность этих пептидов, по крайней мере, в отношении грибов рода *Fusarium*.

Заключение

Гены гевероноподобных пептидов WAMP обнаружены у всех исследованных видов злаков. Они кодируют идентичные пептиды, различающиеся по единственному аминокислотному остатку в положении 34 полипептидной, который влияет на антифунгальную активность пептидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (12-04-00117) и программы Президиума РАН «Живые системы», стипендии президента РФ СП-584.2012.4.

Литература

1. Broekaert WF, Cammue BPA, De Bolle MFC, Thevissen K, De Samblanx GW, Osborn RW. Antimicrobial peptides from plants // *Crit Rev Plant Sci*. 1997. V. 16. P. 297-323.
2. Odintsova T.I., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A., Musolyamov A.K., Finkina E.I., Khadeeva N.V., Rogozhin E.A., Korostyleva T.V., Pukhalsky V.A., Grishin E.V., Egorov T.A. A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif // *FEBS J*. 2009. V. 276. № 15. P. 4266-4275.
3. Andreev YA, Korostyleva TV, Slavokhotova AA, Rogozhin EA, Utkina LL, Vassilevski AA, Grishin EV, Egorov TA, Odintsova TI. Genes encoding hevein-like defense peptides in wheat: distribution, evolution, and role in stress response // *Biochimie*. 2012. V. 94. P. 1009-1016.
4. Dubovskii PV, Vassilevski AA, Slavokhotova AA, Odintsova TI, Grishin EV, Egorov TA, Arseniev AS. Solution structure of a defense peptide from wheat with a 10-cysteine motif // *Biochem Biophys Res Commun*. 2011. V. 411. № 1. P. 14-8.

STUDING OF WAMP ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM CEREALS

Slezina M.P., Korostyleva T.V., Istomina E.A., Slavokhotova A.A., Rogozhin E.A., Pukhalsky V.A., Odintsova T.I.

Triticum kiharae Dorof. et Migusch., wheat, antimicrobial peptides, plant immunity, hevein-like peptides

In this work we studied structural and functional properties of hevein-like wheat antimicrobial peptides (WAMPs) and the role of nonconservative amino acid substitution in position 34. We produced several recombinant antimicrobial peptides containing various amino acids at this position and reveal that the peptides had different antifungal activity corresponding to the amino acid. We found genes encoding WAMPs in different cereals including barley, oat, rye, rice, triticale. The most conservative region of precursor protein was the mature peptide although it contained Lis, Ala and Val in position 34. We suppose that high similarity of WAMP genes in cereals is the evidence of unique significance of the genes.

ЗЕЛЕНЬЙ СВЕТ ВЛИЯЕТ НА РОСТ И МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ МИЦЕЛИЯ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Соколянская Л.О., Глухова Л.Б., Плотников Е.В., Карначук О.В., Карначук Р.А.

ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», пр. Ленина, 36, г. Томск, 634050, Россия, E-mail: lusi5055@yandex.ru

зеленый свет, базидиомицеты, мицелий, рецепторы, опсины, полифенолоксидазы

Исследования последних лет показали, что грибы обладают фоторецепторами чувствительными к свету различной длины волны. У некоторых базидиомицетов найдены рецепторы синего (WWS, криптохромы и др.), красного (грибные фитохромы) и, возможно, зеленого света [1]. Несмотря на то, что молекулярные механизмы воздействия зеленого света на клетки мицелия грибов до сих пор не ясны, предполагают, что в физиологическом ответе могут участвовать белки опсины, как это было обнаружено у *Neurospora crassa*. Экспрессия генов многих ферментов растений является светозависимой. Есть сообщение, об увеличении активности грибной тирозиназы под действием синего света [2]. С точки зрения биотехнологии, селективный свет может быть использован для увеличения продукции биомассы.

Задачами данного исследования было: (1) изучить влияние зеленого света на рост мицелия базидиальных грибов медицинского и пищевого назначения: *Lentinula edodes* W4, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*; (2) определить возможное влияние на активность лакказы, образуемой мицелием базидиальных грибов.

Наши данные свидетельствуют, что зеленый свет оказывает влияние на рост и морфологию мицелия у всех изученных базидиомицетов. Однако, если у *L. edodes* облучение зеленым светом оказывает стимулирующее действие на образование биомассы, то у *G. lucidum* и *G. frondosa* свет ингибировал рост. Стимуляция роста у *L. edodes* сопровождалась увеличением числа субстратных гиф. Облучение узкополосным лазером выявило, что эффект связан с действием определенной области спектра, близкой к 532 нм.

Биоинформационный анализ показал, что возможные белки опсины присутствуют как в геноме *L.edodes* так и *G.lucidum*. Различный эффект зеленого света на эти два базидиомицета в совокупности с геномными данными позволяет спекулятивно предположить, что у *L.edodes* может существовать отличный от опсинов рецептор, поглощающий в области около 532 нм.

Зеленый свет ингибировал активность полифенолоксидаз в жидкой культуре *L.edodes*. Необходимы дальнейшие исследования механизмов регуляции роста и физиологического ответа базидиальных грибов на зеленый свет. К сожалению, количество доступных геномов базидиомицетов медицинского назначения ограничено, что не позволяет произвести полноценный поиск генов – претендентов рецепторов зеленого света.

Литература

1. Alfredo Herrera-Estrella Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photo-reception / Alfredo Herrera-Estrella, Benjamin A. Horwitz // Molecular Microbiology. 2007. V. 64(1), P. 5–15.
2. Shevchenko E. A. Identification of Genes Encoding Ligninolytic Enzymes in Naturally Occurring Basidiomycete Isolates / E. A. Shevchenko, E. A. Bessolitsyna, and I. V. Darmov // Applied Biochemistry and Microbiology, 2013, Vol. 49, No. 3, pp. 280–286.

THE GREEN LIGHT INFLUENCE ON GROWTH AND MORPHOPHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF BASIDIOMYCETES MYCELIUM

Sokolyansky L.O., Glukhova L.B., Plotnikov E.V., Karnachuk O.V., Karnachuk R.A.

green light, basidiomycetes, mycelium, receptors, opsins, polyphenol oxidase

Fungi have such photoreceptors sensitive to light of different wavelengths as WWC, cryptochromes, phytochromes and opsins. The mechanisms of green light influence on the mycelium are still not clear. The green light influence on growth and morphological parameters of all examined fungi have been shown in this article. The effect of green light influence is not unique. The bioinformatic analysis has shown the presence of the opsin proteins in the genome of *L.edodes* and *G.lucidum*. Different effects of green light on the examined fungi combined with the genomic data make possible to speculatively suggest the existence of a receptor unlike the opsin and having the absorption specter within 532 nm. The green light influence on the enzymes work has shown the inhibiting effect.

ВЛИЯНИЕ ЛИСТОВОЙ ПОДКОРМКИ ПРЕПАРАТОМ ФЕРТИГРЕЙН ФОЛИАР НА ПРОДУКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ (*ZEA MAYS L.*)

Терещенко С.А.¹, Сидачева Е.А.^{1,2}

¹ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет»,

Советский пр., 1, г. Калининград, 236022, Россия, E-mail: s.a.tereshchenko@mail.ru

²ООО «БалтАгроКорм», ул. Театральная, 30, офис 307, , г. Калининград, 236000, Россия,

E-mail: katerina.sida4eva@yandex.ru

Zea mays L., подкормка, Фертигрейн Фолиар, продуктивность растений

Введение

В связи с необходимостью обеспечения животноводческой базы Калининградской области дешевыми высокоэнергетическими кормами необходимо увеличение посевных площадей кукурузы на силос. За счет высокой кормовой ценности и концентрации энергии можно повысить рентабельность животноводства.

Кукурузу используют для добавки к кормам, более богатым белковыми веществами, а также в качестве основного корма при откормке крупного рогатого скота и кормлении рабочих лошадей. В зеленой массе кукурузы содержится 1,5-2,7 % сырого протеина, 0,7-0,8 жира, 4 сахара и 5-6 % клетчатки. Высокое содержание сахара отмечено в период выбрасывания метелок. Зеленая масса, убранная в фазе молочно-восковой спелости, содержит большое количество каротина.

Высокими кормовыми достоинствами обладает кормовая масса кукурузы с початками в фазе молочно-восковой спелости: 1 кг ее равен 0,32 к.е., в нем содержится 14-18 г перевариваемого протеина. Из такой зеленой массы получается прекрасный силос для всех видов животных, что позволяет кукурузе занимать первое место среди силосных культур [1].

Объекты и методика

Объектом исследования – кукуруза (*Zea mays L.*), выращиваемая на силос, гибриды: Делитоп, Гитаго.

Целью исследования является выявление влияния листовой подкормки Фертигрейн Фолиар на биометрические показатели

Полевые опыты проводили по методикам Всесоюзного НИИ кукурузы, ВНИИ кормов (1995) [2-4].

Опыт был заложен в 2012 г. в ООО «БалтАгроКорм» Озерского района Калининградской области в четырех вариантах в четырехкратной повторности. Схема опыта представлена в табл. 1.

Таблица 1 - Схема опыта

Table 1 - The scheme of the experiment

Вариант	Сорт	Листовая подкормка
1	Гитаго	без подкормки
2	Гитаго	подкормка Фертигрейн Фолиар в дозе 0,8 л/га
3	Делитоп	без подкормки
4	Делитоп	подкормка Фертигрейн Фолиар в дозе 0,8 л/га

Число вариантов опыта – 4. Число повторностей – 4.

Для проведения опыта были определены поля с посевами кукурузы, представляющие однородный контур дерново-слабоподзолистых среднесуглинистых почв.

Общая площадь посевов 1668 га.

Для анализа продуктивности с каждой повторности перед уборкой отбирали пробный сноп из 25 растений, в состав которого включены типичные растения. Для правильного от-

бора типичных растений за один-два дня до уборки определялась фаза развития путем осмотра всех растений. При анализе элементов структуры урожая пробный сноп разбирался на фракции. У кукурузы на силос определялась масса стеблей, листьев, початков (начиная с молочной спелости зерна). Масса отобранных растений суммировалась с общим урожаем по повторностям.

Статистическую обработку проводили с применением пакета Statistica для персонального компьютера.

Результаты и обсуждение

В хозяйстве применяется технология ресурсосберегающего земледелия, без проведения вспашки.

В основе технологий сберегающего земледелия лежат следующие принципы:

- отсутствие или минимизация механической обработки почвы;
- сохранение растительных остатков на поверхности почвы;
- использование севооборотов, включающих рентабельные культуры и культуры, улучшающие плодородие почв;
- интегрированный подход в борьбе с вредителями и болезнями;
- использование сортов и гибридов, отзывчивых к ресурсосберегающим технологиям.

Норма высева 73093 шт/га (0,914 посевных единиц). Посев проводили с 22 мая по 18 июня 2012 г.

На втором и четвертом варианте в баковую смесь для проведения химической прополки добавляли препарат для листовой подкормки Фертигрейн Фолиар в дозе 0,8 л/га.

Фертигрейн Фолиар (производитель – AgriTecn Fertilizantes, Испания) является препаратом, специально разработанным для листовых подкормок зерновых, технических и кормовых культур. Активизирует азотный обмен, растения в полной мере обеспечиваются необходимыми питательными элементами, одновременно предотвращается возникновение микродефицитов, улучшаются качественные и количественные показатели урожая, повышается устойчивость растений к неблагоприятным условиям и болезням. В состав входят: всего аминокислот – 10 % (из них свободные аминокислоты «L» – 8); азот – 5; органического вещества – 40; цинк – 0,75; марганец – 0,50; бор – 0,10; железо – 0,10; медь – 0,10; молибден – 0,02; кобальт – 0,01 %.

По рекомендациям производителя применяется в период вегетации в качестве некорневой подкормки путем опрыскивания. Для кукурузы рекомендуется проводить подкормку в фазе двух-четырёх листьев, в фазу шести-восьми листьев и в начало цветения в дозе 0,5-1,0 л/га.

Результаты опытов представлены в табл. 2.

Как видно из результатов табл. 2, при применении некорневой подкормки общая масса растений увеличивается по сравнению с вариантами без применения препарата Фертигрейн Фолиар. Увеличение массы происходит за счет увеличения массы початков у гибрида Гитаго и листостебельной массы у гибрида Делитоп.

Выводы

Анализ агроклиматических условий Калининградской области и биологических требований культуры показал, что условия региона благоприятны для возделывания кукурузы на силос, урожайность зеленой массы которой достигает в среднем 40-45 т/га.

При применении некорневой подкормки препаратом Фертигрейн Фолиар общая масса растений увеличивается по сравнению с вариантами без применения препарата. Увеличение массы происходит за счет увеличения массы початков у гибрида Гитаго и листостебельной массы у гибрида Делитоп, что положительно сказывается на качестве силоса.

Литература

1. Амелина, М.А. Кормопроизводство / М.А. Амелина, Л.С. Еремеева. – Калининград: КГТУ, 1998. – 186 с.
2. Методические указания по учету урожая кукурузы на силос в полевых опытах. – Днепропетровск: ВНИИК, 1960. – 11 с.

3. Методические указания по проведению полевых опытов с кормовыми культурами / ВНИИК. – М., 1983. - 197 с.

4. Моисейченко, В.Ф. Основы научных исследований в агрономии / В.Ф. Моисейченко. – М.: Колос, 1996. – 335 с.

Таблица 2 - Продуктивность надземной массы растений и соотношение листостебельной массы и початков кукурузы, убираемой на силос, 2012 г.

Table 2 - Productivity aboveground plant mass and mass ratio cormophyte and corn cobs, re-tractable silage, 2012 year

№ п/п	Вариант	Повторность	Масса одного растения, г			% от общей массы растения	
			общая	початка	листочтебельной массы	початков	листочтебельной массы
1	Гитаго (без подкормки)	1	400	248	152	62,0	38,0
		2	440	312	128	70,9	29,1
		3	405	300	105	74,1	25,9
		4	434	309	134	71,2	28,8
	Среднее		419,8	292,8	292,3	129,8	69,6
2	Гитаго (подкормка Фертигрейн Фолиар, 0,8 л/га)	1	548	140	408	25,5	74,5
		2	580	184	396	31,7	68,3
		3	585	178	407	30,4	69,6
		4	537	191	346	35,6	64,4
	Среднее		562,5	173,3	389,3	30,8	69,2
3	Делитоп (без подкормки)	1	552	184	368	33,3	66,7
		2	536	244	292	45,5	54,5
		3	540	198	342	36,7	63,3
		4	531	205	326	38,6	61,4
	Среднее		539,8	207,8	332,0	38,5	61,5
4	Делитоп (подкормка Фертигрейн Фолиар, 0,8 л/га)	1	612	220	392	35,9	64,1
		2	592	304	288	53,4	46,6
		3	598	281	317	47,0	53,0
		4	602	268	334	44,5	55,5
	Среднее		601	268,3	332,8	45,2	54,8

THE EFFECT OF FOLIAR APPLICATION OF PREPARATION FERTIGREYN FOLIAR FOR PLANT PRODUCTIVITY OF CORN (*ZEА MAYS L.*)

Tereshchenko S.A., Sidacheva E.A.

Zea mays L., feeding, Fertigreyn Foliar, plant productivity

In the article contains results of implementation research foliar application of Foliar Fertigreyn on plant productivity of corn, grown for silage, with minimum soil cultivation.

НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СУБСТРАТОВ ПРИ ГИДРОПОННОМ ВЫРАЩИВАНИИ РАСТЕНИЙ

Туркин Н.И., Вульферт Е.А., Туркина О.Н.

ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,
ул. А. Невского, 14, г. Калининград, 236041, Россия, E-mail: turkin203@rambler.ru

гидропоника, субстраты, водно-воздушные свойства

При гидропонном способе выращивания растений использование питательного раствора, содержащего все необходимые минеральные питательные вещества в нужных соотношениях, ускоряет рост и развитие растений, а отказ от почвы существенно уменьшает численность вредителей и болезней растений, что облегчает уход за растениями. В тоже время выращивание растений без субстрата также имеет ряд трудностей. Среди них необходимость частых поливов и быстрая гибель растений при отключении электричества или поломке оборудования, особенно при выращивании в тонком питательном слое, при периодическом затоплении корней и в аэропонной культуре. Поэтому часто вместо почвы используют различные субстраты. Главное требование к субстратам это создание благоприятного водно-воздушного режима для корней. Существенное значение также имеет и химическая инертность материала, чтобы не было химического взаимодействия с питательным раствором и чтобы из субстрата не выделялись вредные для растений или персонала вещества. Значение субстрата для закрепления растений имеет меньшее значение и может быть заменено другими способами (закреплением стебля поролоном или подвязкой к опоре).

В качестве субстратов используют различные материалы: минеральные (песок, гравий, керамзит, перлит, вермикулит, цеолит и др.), органические (торф, кокосовая стружка, древесная кора, мох, опилки и др.) и синтетические (минеральная вата, пенополиуретан, полиэтиленовая крошка, вспененные полистиролы, ионнообменные смолы, мочевино-формальдегидные пенопласты и др.), а также их смеси (например, торф и перлит).

Субстрат должен иметь открытые воздушные поры для аэрации корней, соединенные между собой и с атмосферой. Чем больше таких пор, тем лучше газообмен у клеток корней. При этом часть пор должна быть заполнена питательным раствором, чтобы в период между поливами растения не испытывали недостаток влаги. Поэтому объем пор должен быть достаточным для того, чтобы в период между поливами корни могли дышать и поглощать питательный раствор. Если в субстрате мало открытых пор, то необходимо увеличивать его объем.

При этом существенным недостатком субстратов является то, что большую часть субстрата занимает его собственный объем по сравнению с объемом открытых пор. Это также приводит к необходимости увеличивать объем субстрата. Увеличение объема субстрата в пересчете на одно растение приводит не только к его удорожанию, но и требует увеличения объема сосудов для корней. При выращивании с раздвижкой сосудов по мере роста растений это особенно не удобно как за счет большего веса, так и за счет большего размера сосудов для корней. Поскольку большой размер сосудов приводит к увеличению минимального исходного расстояния между рядами растений, что требует большей площади теплицы на ранних стадиях вегетации. Эта проблема частично решается за счет, по крайней мере, одной пересадки растений. Однако это не только увеличивает трудозатраты, но и оказывается недостаточным из-за медленного роста на ранних этапах вегетации растений. Кроме того раздвигать сосуды удобно в одном направлении (между рядами), поэтому расстояние между растениями внутри ряда сразу при пересадке выбирается оптимальным для конца вегетации, то есть является избыточно большим для начала вегетации.

Распределение воздуха и питательного раствора в субстратах неоднородно: даже при равном объеме открытых пор. В нижней части меньше объем воздуха и больше объем пита-

тельного раствора. Поэтому снабжение кислородом верхушек корней хуже, чем основания корней. В тоже время физиологические процессы в верхушках корней более интенсивные, что требует большего количества кислорода.

При транспортировке на дальние расстояния вес и объем субстрата должен быть минимальным, в тоже время частицы субстрата не должны всплывать в питательном растворе. Для удобства в работе часто используют сыпучие субстраты. В конце вегетации корни легче удаляются из сыпучих субстратов, что позволяет их использовать повторно. Однако многие легкие и сыпучие субстраты при подсыхании могут пылить, что ограничивает их применение в небольших замкнутых помещениях и в условиях невесомости. При выборе субстрата существенное значение имеют также его доступность и стоимость.

Водно-воздушные свойства субстратов меняются в течении времени за счет их разрушения. К отрицательным свойствам субстратов также относят выделение мелких частиц, которые могут приводить к засорению каналов перемещения питательного раствора.

Таким образом, при гидропонном выращивании растений существующие субстраты препятствуют миниатюризации емкостей для корней, что приводит к увеличению трудозатрат, стоимости и нерациональному использованию площадей на ранних этапах вегетации. При разработке новых субстратов следует улучшать их водно-воздушные характеристики без увеличения их веса и объема. При этом стоимость субстратов должна быть существенно снижена.

SOME PROBLEMS OF USING OF THE SUBSTRATES FOR THE HYDROPONIC CULTIVATION OF PLANTS

Turkin N.I., Vulfert E.A., Turkina O.N.

hydroponics, substrates, water-air features

In this article problems of using of the substrates for the hydroponic cultivation of plants are considered. The authors conclude, that it is essential to improve water-air features and other features while still reducing the volume and weigh of substrate itself.

КРИОСОХРАНЕНИЕ МЕТОДОМ ДЕГИДРАТАЦИИ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

Соловьева А.И., Долгих Ю.И., Высоцкая О.Н.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, г. Москва, 127276, Россия, E-mail: slvjova.aleksandra@rambler.ru

Triticum aestivum, *Fragaria vesca*, криосохранение, дегидратация, генетическая стабильность

Введение

Замораживание растительного материала при температуре жидкого азота – надежный способ долговременного сохранения генетических ресурсов, оно позволяет снизить до минимума потерю ценных образцов и сократить материальные затраты на поддержание коллекций. Вместе с тем, криосохранение – сложная, многостадийная процедура, в процессе которой клетки испытывают стресс и в результате могут возникать различные физиологические и генетические отклонения [1-3].

Последние пятнадцать лет для криосохранения тканей и органов растений все чаще применяют протоколы, несвязанные с использованием дорогостоящего и сложного в обслуживании программного оборудования, в частности, набирает популярность простой и не включающий в себя инкубирование клеток в растворах токсичных криопротекторов, таких как ДМСО, метод дегидратации [4-6].

В своем исследовании мы постарались ответить на вопрос о том влияет ли криосохранение методом дегидратации на генетическую стабильность растительного материала разного по степени дифференциации и размеру генома.

Материалы и методы

В нашей работе мы использовали два объекта с противоположными характеристиками: свежеполученный каллус из самоопыленных линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., $2n=6x=42$) и апексы клона земляники лесной (*Fragaria vesca* L., $2n=2x=14$), полученного от одного материнского растения и культивируемого *in vitro* в течение 25 лет.

Процедуру криосохранения обоих объектов провели по протоколу дегидратации [7].

Часть каллусов *T. aestivum* отсаживали и продолжали культивировать, затем регенерировали из них растения, другую часть подвергали криосохранению, восстанавливали и также получали регенеранты. Во всех вариантах отбирали пробы для последующего анализа ДНК. В случае *F. vesca* пробы листьев отбирали индивидуально с каждого растения до криосохранения и с тех же растений, восстановленных после оттаивания.

Для оценки стабильности восстановленного растительного материала *T. aestivum* были применены ряд ДНК-маркеров: ISSR (от Inter Simple Sequence Repet) и REMAP (от Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism). Для *F. vesca* в дополнение к ним использовали RAPD (от Random Amplified Polymorphic DNA) метод.

Результаты и обсуждение

Перед проведением опыта оценили исходный уровень полиморфизма растительного материала. Каллусы линий *T. aestivum* были полностью идентичны, а у растений *F. vesca* доля полиморфных фрагментов составляла 9,2%.

Возобновление роста образцов после криосохранения происходило с высокой частотой, в среднем составившей $87,2 \pm 3,1\%$ для каллусов *T. aestivum* и $74,9 \pm 4,3\%$ для апексов *F. vesca*.

После криосохранения каллусов *T. aestivum* в REMAP-профиле только одной пробы отмечено появление фрагмента размером около 90 п.н. (рис. 1а). Частота появления полиморфного фрагмента в каллусах *T. aestivum* после криосохранения составила 1,7%.

Растения-регенеранты, полученные из каллусов, восстановленных после криосохранения, были полностью идентичны исходному материалу внутри линий (рис. 1б).

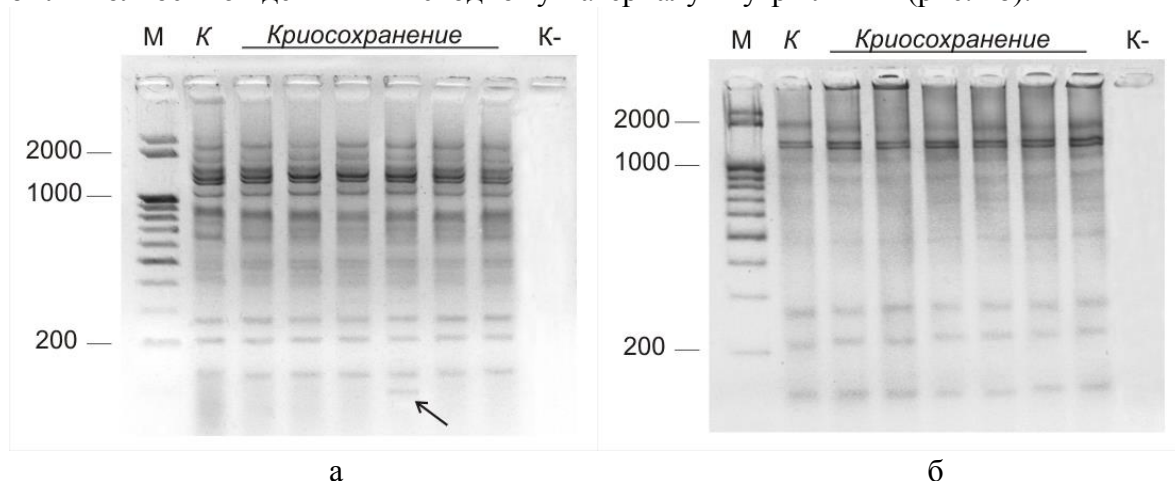


Рисунок 1 - REMAP-профили растительного материала *T. aestivum* после криосохранения: а – каллусы; б – растения-регенеранты. *K* – контроль; *K-* – отрицательный контроль; *M* – маркер молекулярного веса; стрелкой отмечен полиморфный фрагмент

Figure 1 - REMAP-spectra of *T. aestivum* plant material after cryopreservation: a – calli; b – regenerants. *K* – control; *K-* – water control; *M* – DNA size marker; arrow points polymorphic band

Среди проанализированных растений *F. vesca* в REMAP-профиле только одной пробы, отобранной после криосохранения, отмечено появление ранее незарегистрированного фрагмента размером около 1200 п.н. (рис. 2).

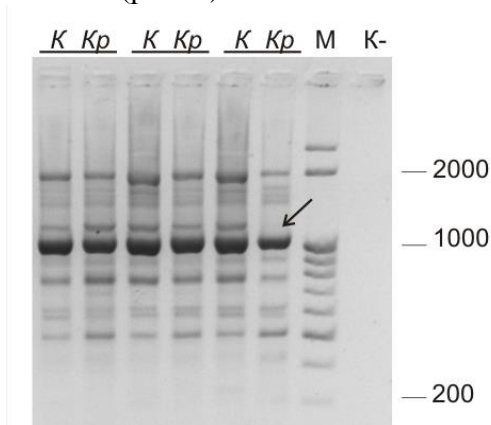


Рисунок 2 - REMAP-профили растений *F. vesca* до (*K*) и после криосохранения (*Kp*). *K-* – отрицательный контроль; *M* – маркер молекулярного веса; стрелкой отмечен полиморфный фрагмент

Figure 2 - REMAP-spectra of *F. vesca* plants produced before (*K*) and after (*Kp*) cryopreservation. *K* – control; *K-* – water control; *M* – DNA size marker; arrow points polymorphic band

Одной из вероятных причин отмеченных изменений в REMAP-профилях обоих объектов является встраивание новой копии ретротранспозона, спровоцированной стрессом, который испытывали клетками во время процедуры криосохранения.

Заключение

После криосохранения методом дегидратации растительный материал, вне зависимости от типа ткани и размера генома, в целом сохраняет генетическую стабильность.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-31615.

Литература

1. Martin C., Gonzalez-Benito M.E. Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration // *Cryobiology*, – 2005. – V.51 – P. 281–289.
2. Sanchez C., Martinez M.T., Vidal N., San-Jose M.C., Valladare S., Vieitez A.M. Preservation of *Quercus robur* germplasm by cryostorage of embryogenic cultures derived from mature trees and RAPD analysis of genetic stability // *Cryoletters*, – 2008. – V.29 – №6 – P. 493–504.
3. Marco-Medina A., Casas J.L. RAPD and phytochemical analysis of *Thymus moroderi* plantlets after cryopreservation // *Cryoletters*, – 2013. – V.34 – №2 – P. 119–127.
4. Kim H.M., Shin J.H., Sohn J.K. Cryopreservation of somatic embryos of the herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by air drying // *Cryobiology*, – 2006 – V.53 – №1 – P. 69–74.
5. Popova E., Kim H.H., Paek K.Y. Cryopreservation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) somatic embryos using sucrose preculture and air dessication // *Sci. Hort.*, – 2010. – V.124 – P. 522–528.
6. Hazubska-Przybyl T., Chmielarz P.; Michalak M.; Bojarczuk K. Cryopreservation of embryogenic tissues of *Picea omorika* (Serbian spruce) // *Plant Cell Tiss. Org.*, – 2013 – V.113 – P. 303–313.
7. Высоцкая О.Н., Данилова С.А., Попов А.С. Способ криосохранения *in vitro* меристем, изолированных из растений земляники садовой. Патент № 2302107 (Россия) // Б.И., – 2007 – Т.1. – № 19 – С.166.

GENETIC STABILITY OF PLANT MATERIAL AFTER DEHYDRATION CRYOPRESERVATION

Solov'yova A.I., Dolgih Yu.I., Vysotskaya O.N.

Triticum aestivum, *Fragaria vesca*, cryopreservation, dehydration, genetic stability

Two objects with opposite characteristics: 1-month-old callus culture of inbred lines of common wheat and apexes of 25-year-old forest strawberry clone were successfully cryopreserved. It was established dehydration cryopreservation generally not affect genetic stability of the plant material.

ДИНАМИКА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ

Ступко В.Ю.¹, Зобова Н.В.¹, Гаевский Н.А.²

¹ГНУ Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства РАСХН, пр. Свободный, 66, г. Красноярск, 660041, Россия, E-mail: stupko@list.ru

²ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, Россия, E-mail: nikgna@gmail.com

культура in vitro, каллус, селективные среды, пшеница, фотосинтетическая активность, стрессоустойчивость

Введение

Использование каллусных культур в процессе селекции сельскохозяйственных растений на устойчивость к стрессовым эдафическим факторам, в первую очередь засухе, позволяет создавать новые экологичные сорта, используя естественные источники изменчивости, без привлечения технологий ГМО. Повышение эффективности этого направления ряд исследователей усматривают в учете цвета каллусной культуры [1-5], предполагая связь хлорофиллсодержащих областей (ХСО) с образованием морфогенных зон. Наличие фотосинтетической активности (ФА) в этих областях каллусной культуры яровой мягкой пшеницы, и изменение её под действием стрессоров [6] создаёт предпосылки к использованию этого явления как для оценки стрессоустойчивости генотипов, так и для отбора морфогенных образцов на ранних этапах культивирования. Изучение динамики ФА каллусных культур пшеницы на стрессовых фонах, позволит определить наиболее репрезентативные сроки фиксации показателей при оценке стрессоустойчивости генотипов и подходы к отбору перспективных каллусов для получения регенерантов.

Материалы и методы

В качестве объектов использовали образцы яровой мягкой пшеницы селекции Красноярского НИИСХ. Каллусные культуры индуцировали на основе незрелых зародышей на среде Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением 1 мг/л 2,4-Д. Проллиферацию каллусов проводили на среде того же состава с уменьшенной концентрацией 2,4-Д. На этом этапе использовали контрольный и три варианта селективных сред (с NaCl - 0,73%, с рН 4,0 или с полиэтиленгликолем - 16% вес/объем). Культивирование каллусов проводили при температуре 20-24°C без досвечивания на первом этапе и при освещенности 2,5-3 кЛк, обеспечиваемой люминесцентными лампами, 16-часовом фотопериоде – на втором. Для исследований ФА отбирали каллусы двух категорий: имевшие побег на среде индукции (который удаляли при пассировании); имевшие ХСО без образования побега. Фиксацию показателей ФА осуществляли на ПАМ-флуориметре (IMAGING-RAM M, «Heinz Walz GmbH», Германия) в режиме записи «световой кривой».

Результаты и обсуждение

Исследование динамики скорости транспорта электронов (СТЭ) через ФС2 каллусных культур пшеницы проводили в интервале плотности потока поддерживающего актиничного света (ПАС) 0 до 400 мкмоль фотонов/м²с с 1 по 10 сут. культивирования на среде пролиферации. Поскольку на листьях пшеницы нами показано [6], что наибольшие достоверные различия между световыми кривыми на разных фонах отмечены при плотности потока ПАС 335 мкмоль фотонов/м²с, то на рисунке приведены данные СТЭ каллусов, полученные при этой плотности потока.

Полиномиальные линии тренда, основанные на данных измерений СТЭ каллусов, имевших побег на среде индукции, свидетельствуют о снижении СТЭ образцов в первые трое сут. на оптимальной среде, а также в условия повышенного осмотического давления (среды с ПЭГ и с NaCl) (рис. 1а). Этот процесс, вероятно, связан с периодом адаптации тканей к новой питательной среде. На 6-7-е сут. уровень СТЭ у каллусов на оптимальной среде и среде с ПЭГ достигал максимальных значений. К 10-ым сут. СТЭ у большинства каллусов

на среде с ПЭГ снизилась до нуля, в то время как в контрольном варианте вышла на плато. В отличие от этого СТЭ каллусов на засоленной среде продолжала снижаться, и у большинства из них была близка к нулю на 8-10-е сутки.

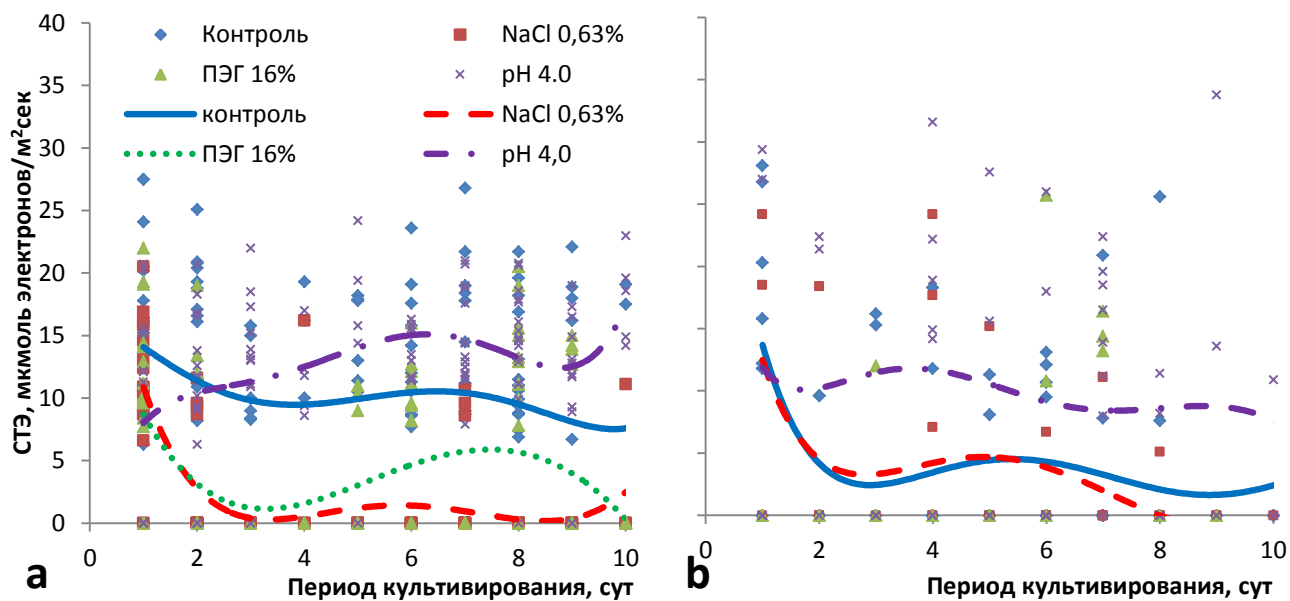


Рисунок 1 – Динамика СТЭ каллусов пшеницы с удаленным побегом (а) и не имевших стеблей (b) при плотности потока поддерживающего света 335 мкмоль фотонов/м²с

Figure 1 – The ETR dynamic of wheat calluses with desiccated shoots (a) and those, that didn't form shoots (b), under maintaining actinic light intensity of 335 μmol quanta/m²s

На каллусах, не имевших побегов на среде индукции, но сформировавших ХСО, наблюдалась схожая динамика изменений СТЭ (рис. 1 b). Но здесь в контроле снижение ФА на 3-ьи сут. было более выраженным, и при дальнейшем культивировании уровень СТЭ оставался низким. Засоление среды, в отличие от присутствия ПЭГ (полностью угнетавшего ФА каллусов), не оказывало заметного влияния на СТЭ по сравнению с контролем вплоть до 6-х сут. культивирования. Эти данные свидетельствуют о нецелесообразности использования каллусов, сформировавших только ХСО на среде индукции, для оценки стрессоустойчивости генотипов.

Во всех проведенных экспериментах наблюдалось стимулирующее влияние низкой рН среды пролиферации на ФА каллусов во время всего периода культивирования, что может быть опосредовано реакцией нефотохимического связывания CO₂, которая сдвигается в сторону диссоциации при низкой рН.

Проявившееся на стрессовых средах с NaCl и ПЭГ угнетение ФА на 7-8-е сут. культивирования каллусов без побегов и на 10-й – у каллусов с побегами ограничило период наблюдения динамики СТЭ десятью сутками. Это снижение ФА может быть как следствием истощения каких-то элементов в питательной среде, так и результатом изменения газового состава в замкнутом пространстве культурального сосуда, наблюдаемого в других исследованиях [7]. Направление изменения и его последствия разнятся в зависимости от вида растения.

Каллусы, отобранные нами по наличию побегов на среде индукции, могут быть использованы для оценки стрессоустойчивости генотипов, оптимальным сроком которой являются 6-7-е сут. культивирования на среде пролиферации, когда СТЭ достигает своего максимума на большинстве сред, а воздействие стрессовых факторов ярко выражено. Это подтверждается и тем, что световые кривые с наименьшим разбросом данных, позволяющие достоверно судить о влиянии высокого осмотического давления, засоления и низкой рН на СТЭ каллусных тканей пшеницы, получены на 7-е сут. культивирования (данные не приводятся).

Заклучение

Таким образом, полученные результаты позволяют предложить использование световых кривых для оценки устойчивости образцов к засухе и засолению, но не к низкой pH почв. Фиксацию показателей ФА целесообразно проводить на 6-7 сут. культивирования каллусов на среде пролиферации. Применение данного подхода к оценке селекционных образцов на устойчивость к закислению невозможно. Использование уровня ФА, как критерия отбора морфогенных каллусов также оправдано, и позволяет повысить эффективность селекции *in vitro* за счёт ранней отбраковки неперспективных образцов. Выявление причин достаточно быстрого снижения ФА каллусов на селективных средах позволит внести корректировку в процесс культивирования, направленную на пролонгирование активного роста каллусной культуры. При подтверждении гипотезы о влиянии изменений газового состава на ФА каллусов вентилирование путем открывания сосудов в стерильных условиях может способствовать поддержанию активного фотосинтеза в культуре более продолжительное время. Если же снижение ФА - результат изменений в составе питательной среды, то может потребоваться сокращение времени между пассажами.

Литература

1. Chen J., Yue R., Xu H., Chen X. Study of plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm-supported culture // Agriculture science in China. – 2006. – V. 5, I.8. – P. 572-578.
2. Ben Amer I. M., Börner A. The relationship between green spot initiation and plantlet regeneration of wheat callus grown under short-term conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1997. – V. 50, № 1. – P. 67-69.
3. Li H., Li X., Gao J., Wang H. Efficient callus induction and plant regeneration from immature embryo culture of *Triticum aestivum* L. - thinopyrum intermedium alien disomic addition lines // 自然科学版. – 2005. – V. 36, I.1. – P. 1-8.
4. Malik S.I., Rashid H., Yasmin T., Minhas N.M. Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus of mature seed explants of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Pakistan Journal of Botany – 2004. – V. 36, I.3. – P. 629-634.
5. Ступко В.Ю., Н.В. Зобова Окраска каллусов как критерий регенерации пшеницы в селекции *in vitro* // Сиб.вестник с.-х.науки. – 2012, № 6. – С. 5-9.
6. Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Гаевский Н.А. Биофизические подходы в оценке стрессоустойчивости яровой пшеницы // Сиб. вестник с.-х. науки. – 2013, № 1. – С. 18-23.
7. George E.F., Hall M.A., G.-J. De Klerk Effects of the Physical Environment // E. F. George et al. (eds.), Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Dordrecht: Springer Netherlands. – 2008. – P. 423–464.

THE DYNAMIC OF SOFT SPRING WHEAT CALLUS CULTURES PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY ON SELECTIVE MEDIA

Stupko V.Ju.¹, Zobova N.V.¹, Gaevsky N.A.²

in vitro culture, callus, selective media, wheat, photosynthetic activity, stress tolerance

The changes of photosynthetic activity of wheat calluses cultured on selective media for 10 days were observed. The dynamic curve characteristics showed the period needed for selective factor influence to become significantly. Therefore, prospects of callus culture use for estimation of stress tolerance of wheat breeding material was evaluated. Some hypothesis for the reasons of short period of calluses photosynthetic activity and consequence of their confirmation were suggested.

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ СВЕТОКУЛЬТУРЫ РАСТЕНИЙ:
ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ СВЕТОДИОДНЫХ ОБЛУЧАТЕЛЕЙ**

Тараканов И.Г.

ФГБОУ ВПО «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева», Тимирязевская ул., 49,
г. Москва, 127550, Россия, E-mail: plantphys@timacad.ru

светокультура растений, светоиспускающие диоды

Светокультура растений является интенсивной технологией, она широко используется при производстве рассады овощных и декоративных культур в защищенном грунте, при промышленном выращивании овощных культур и цветов, а также в разного рода фитотронах для решения исследовательских и прикладных задач (биотехнология, селекция и т.д.). Особое значение она приобретает в связи с развитием систем интенсивного культивирования растений, в том числе в так называемых «фабриках растений» [1]. Сегодня в большинстве осветительных систем используются адаптированные для растениеводства натриевые лампы высокого давления (НЛВД). Несмотря на их сравнительно высокую светоотдачу и эффективность, значительная часть затраченной энергии не преобразуется в фотосинтетически активную радиацию (ФАР), а рассеивается в виде тепла. Светоиспускающие диоды (СИД) являются альтернативными облучателями, производящими значительно меньше тепла. Они решают вопрос генерации света большой яркости с очень малым потреблением энергии на его производство, что позволяет существенным образом уменьшить энергопотребление. Таким образом, использование светодиодов, несомненно, станет одной из инновационных ресурсосберегающих технологий в растениеводстве.

Появление сверхъярких СИД – принципиально новых источников облучения - создает уникальные возможности для качественного развития светокультуры, в том числе – для разработки методов тонкой регуляции физиолого-биохимических процессов в растениях. Их внедрение открывает новые возможности в регуляции фотосинтеза и роста растений в тепличном овощеводстве и цветоводстве. Прежде всего это касается подбора оптимального спектрального состава света с учетом биологических особенностей не только вида, но и сорта, что в дальнейшем означает переход на сортовые технологии в светокультуре растений. На основе использования уже накопленного богатого материала фотофизиологических исследований с помощью комбинаций светодиодных облучателей, дающих свет разного спектрального состава, можно будет эффективно управлять морфогенезом растений, их габитусом, переходом к цветению, качеством получаемой продукции. Использование светодиодов позволяет также менять геометрию осветительных установок, освещая, к примеру, растения под разным углом, учитывая изменения их высоты и уровня загущения и т.д.

Кафедрой физиологии растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева в течение ряда лет проводятся эксперименты по применению светодиодных облучателей в светокультуре растений. В них показана возможность эффективного выращивания растений под узкополосными СИД. Проведен цикл исследований по выращиванию в светокультуре на основе светодиодных облучателей ряда овощных, эфиромасличных и декоративных растений: томата, огурца, салата кочанного и листового, редиса, горчицы салатной и корнеплодной, рукколы, базилика, мяты перечной, лаванды, шалфея, стевии, тагетеса, календулы, циннии, колеуса. Продуктивность растений и качество урожая в вариантах с использованием СИД были не ниже, чем с использованием традиционных НЛВД. В экспериментах испытываются облучатели на основе узкополосных синих и красных светодиодов с различающимися спектральными характеристиками, с разным соотношением синих и красных СИД, а также белых све-

тодиодов. В ходе первичного скрининга мы определяем условия, позволяющие оптимизировать световой режим с учетом видовых и сортовых особенностей растений.

При сравнительно-физиологическом изучении реакции растений 10 сортов салата, относящихся к разным морфобиотипам, на выращивание с использованием НЛВД и СИД мы установили, что расход электроэнергии на создание 1 кг биомассы урожая в вариантах с СИД снижается в 2-3 раза. Интересно отметить, что на фоне примерно одинаковой урожайности изучаемых сортов на режимах с НЛВД и СИД краснолистные сорта (Энтони, Мурай, Роксай) в вариантах с СИД показали более высокую продуктивность. В большинстве случаев растения, выращенные с использованием досвечивания СИД имели повышенное содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов). Содержание нитратов в конечной продукции не превышало ПДК.

Реакция детерминантных форм томата на СИД была связана с некоторой задержкой перехода растений к генеративному развитию; общая урожайность при этом возрастала. Опытные растения также характеризовались более высокой эффективностью водопотребления.

С помощью досвечивания светодиодными облучателями, как показали наши исследования, можно вырастить высококачественную цветочную рассаду для ковровых цветников и высокодекоративные однолетние растения на срезку. На ряде культур отмечены особенности ростовых реакций растений, связанные с увеличением площади листьев и размеров соцветий.

Возможность оптимизации спектральных характеристик облучателей позволяет не только обеспечить высокую продуктивность культуры, но и направленно влиять на качество продукции, в частности, добиться существенного снижения накопления нитратов в зеленных культурах, а также стимулировать биосинтез целевых продуктов вторичного метаболизма.

Широкие возможности в регулировании спектрального состава света и оптимизации световых режимов выращивания растений с использованием СИД (в том числе в онтогенезе – так называемый «интеллектуальный свет») служат основой для перехода на качественно новый уровень - к комбинаторной светокультуре растений [2].

Литература

1. Goto E. Plant Production in a Closed Plant Factory with Artificial Lighting // Acta Horticulturae, 2012, vol. 956, p.37-49.

2. Tarakanov I., Yakovleva O., Konovalova I., Paliutina G., Anisimov A. Light-Emitting Diodes: on the Way to Combinatorial Lighting Technologies for Basic Research and Crop Production // Acta Horticulturae, 2012, vol. 956, p.171-178.

DEVELOPMENT OF PLANT LIGHTING TECHNOLOGIES: LIGHT-EMITTING DIODES APPLICATION EXPERIENCE

Tarakanov I.G.

horticultural lighting, light-emitting diodes

Experimental data show that various LED systems, white or with discrete wavelength ranges peaking at blue and red spectral regions, can be used effectively for the fine tuning of physiological processes in plants and optimization of the horticultural lighting regimes.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ КОНСТРУКЦИЙ С ГЕНОМ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ ВИРУСА Б ХРИЗАНТЕМ (CVB) ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВИРУСОУСТОЙЧИВЫХ РАСТЕНИЙ

Титова С.М.¹, Митюшкина Т.Ю.^{1,2}, Фирсов А.П.^{1,2}, Долгов С.В.^{1,2}

¹ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, ул. Тимирязевская, 42, г. Москва, Россия, 127550, E-mail: f0t0nchik@mail.ru

²ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, проспект Науки, 6, г. Пущино Московской области, 142290, Россия

устойчивость к вирусу, ген белка оболочки, вирус Б хризантем, ИФА, вестерн-блот

Введение

Хризантемы сегодня входят в список наиболее популярных цветочных культур во всем мире, и предлагаются как срезочные, так и горшечные, садовые и тепличные растения. В литературе описано 15 вирусных заболеваний, поражающих хризантемы, одним из наиболее вредоносных вирусов хризантем является вирус Б хризантемы (*chrysanthemum virus B (CVB)*). Симптомы болезни сильно варьируют в зависимости от условий выращивания и сорта растения. На листовых пластинках у одних сортов появляются желто-зеленые кольца и пятнистость, некротические пятна, едва видимая мозаика, у других – изменение окраски цветков, деформация листьев и т.д. Основным признаком болезни у хризантем – недоразвитие соцветий и уменьшение числа ложноязычковых цветков. Иногда симптомы могут отсутствовать. ВБХ передается прививкой, механической инокуляцией, или несколькими видами тлей (*Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulacorthum solani*, *Coloradoa rufomaculata*, *Macrosiphoniella sanborni*) не персистентным образом [3].

В настоящее время существует ряд молекулярно-биологических подходов для повышения устойчивости растений к вирусам, в частности, основанных на трансформации растений геном белка оболочки вируса в смысловой или антисмысловой ориентации. Кроме того, активно развиваются методы на основе РНК-интерференции.

Широкое распространение вирусов на цветочной культуре, а также отсутствие радикальных мер борьбы с вирусными болезнями делает актуальным создание трансгенных хризантем, устойчивых к вирусу Б. Поэтому целью нашей работы является тестировка полученных трансгенных хризантем с различными конструкциями, содержащими ген белка оболочки вируса Б.

Материалы и методы

Были исследованы растения хризантем сорта White Snowdon, трансформированные следующими конструкциями: ген белка оболочки вируса хризантем Б (CP-CVB) в смысловой ориентации (pBSS), с двойной смысловой последовательностью гена CP-CVB (pBDS), с антисмысловой последовательностью гена CP-CVB (pBAS) и РНК-интерференционной конструкцией на основе фрагмента гена CP-CVB 273 пн (pRNAiVB), ранее полученные на станции искусственного климата «Биотрон». Эти последовательности находились под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты и терминатора гена *nos A. tumefaciens* [1,2]. Используемые в работе инфицированные растения хризантем любезно были предоставлены ГНУ Всероссийским научно-исследовательским институтом цветоводства и субтропических культур РАСХН.

Для обнаружения вируса Б хризантем использовали метод DAS-ELISA (набор Loewe, Germany). В качестве исследуемого материала были использованы инфицированные листья растений хризантем. Образцы были приготовлены соответственно инструкции фирмы-производителя набора. Концентрацию общего белка в полученных препаратах определяли методом DC Protein Assay (BioRad, USA), затем препараты разводили до концентрации общего белка, равной 1 мг/мл. DAS-ELISA выполнялась соответственно инструкции фирмы-производителя. В качестве контрольных были использованы оздоровленные растения хризантем сорта White Snowdon, полученные ранее на станции

искусственного климата «Биотрон». Результаты были прочитаны с помощью плашечного ридера Biotrak II Reader (Amersham, USA) и обработаны в программе Excell. Оценка степени зараженности образцов проводилась путем сравнения полученных значений оптической плотности (ОП) с ОП образцов контрольных растений.

Для вестерн-блот анализа использовали экстракцию тотального белка из растений хризантем. Образцы белков разделяли при помощи электрофореза в 12,5% SDS-ПААГ в трис-глициновом буфере при напряжении 160В по Laemmli (1970). На одну дорожку наносили по 25 мкл белкового препарата, предварительно смешав пробу с буфером для нанесения. После разделения белки переносили на мембрану методом электропереноса в Towbinбуфере. Мембраны блокировали в 5% обезжиренном молоке в PBS при комнатной температуре на качалке. В буфер с сухим молоком добавляли первичные антитела и гибридизовали в течение ночи при +4°C при медленном покачивании. Для детекции целевого белкового продукта на мембранах были использованы антитела Anti-CVB-IgG в разведении 1:1000. В качестве вторичных антител использовали антикроличьи IgGс щелочной фосфотазой (Pierce, USA) в разведении 1:3000. Гибридизацию со вторичными антителами проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембрану окрашивали с помощью хромогенного субстрата BCIP/NBT (Fermentas, Литва).

Результаты и обсуждение

Методом DAS-ELISA был получен сигнал в зараженных растениях, однако в устойчивых линиях сигнал отсутствовал. В результате было изучено 17 трансгенных линий хризантем и одна нетрансгенная линия, использованная в качестве контроля. Наиболее устойчивыми к вирусу Б хризантем оказалась конструкция с двойной смысловой последовательностью гена CP-CVB (pBDS). В то время как линии трансформированные конструкциями гена белка оболочки вируса хризантем Б (CP-CVB) в смысловой ориентации (pBSS), с антисмысловой последовательностью гена CP-CVB (pBAS) и РНК-интерференционной конструкцией на основе CP-CVB (pRNAiVB) показали частичную устойчивость к вирусу. Значение ОП устойчивых трансгенных линий хризантем не превышало значений ОП образцов относительно отрицательных контролей. Нетрансгенная инфицированная линия хризантемы характеризовалась очень сильной степенью инфицированности, её значения ОП многократно превышало значение ОП нетрансгенной неинфицированной линии хризантемы, которое было взято в качестве отрицательного контроля. Необходимо отметить, что заражение трансгенных линий было бессимптомным. Различия в степени устойчивости изученных трансгенных линий могут быть связаны с использованием разныхмолекулярно-биологических подходов устойчивости к вирусу.

Дополнительно был проведен Western blot анализ, который выявил наличие специфических полос в зараженных растениях. В экстракте инфицированных растений детектировался сигнал, соответствующий белку оболочки CVB (~37 кДа) (рис.2).

Заключение

Проанализирован метод ИФА, полученные результаты представлены на рис.1. Сигнал был получен в заведомо зараженных, в то время как в безвирусных растениях, сигнал отсутствовал.

Для подтверждения результатов ИФА был проведен вестерн-блот анализ (рис.2), который выявил наличие специфических полос, соответствующих белку оболочки CVB(~37 кДа) в инфицированных растениях, а в неинфицированных – полосы не детектировались соответствующие белку оболочки.

Литература

1. Mitiouchkina T., Skachkova T., Shulga O., Dolgov S. Expression of the Chrysanthemum Virus B Coat Protein Gene in Transgenic Chrysanthemum//Acta Hort. – 2011. V.901. – P. 95-98.
2. Skachkova T.S., Mitiouchkina T. Yu., Taran S.A., Dolgov S.V. Molecular Biology Approach for Improving Chrysanthemum Resistance to Virus B//Acta Hort. – 2006. V.714. – P. 185-192.
3. Temaja I.G.R.M., Suastika G., Hidayat S.H. et.al. Characterization of a Severe Strain of Chrysanthemum Virus B (CVB) Isolated from *Chrysanthemum* in Indonesia//Acta Hort. – 2011. V.901. – P. 149-158.

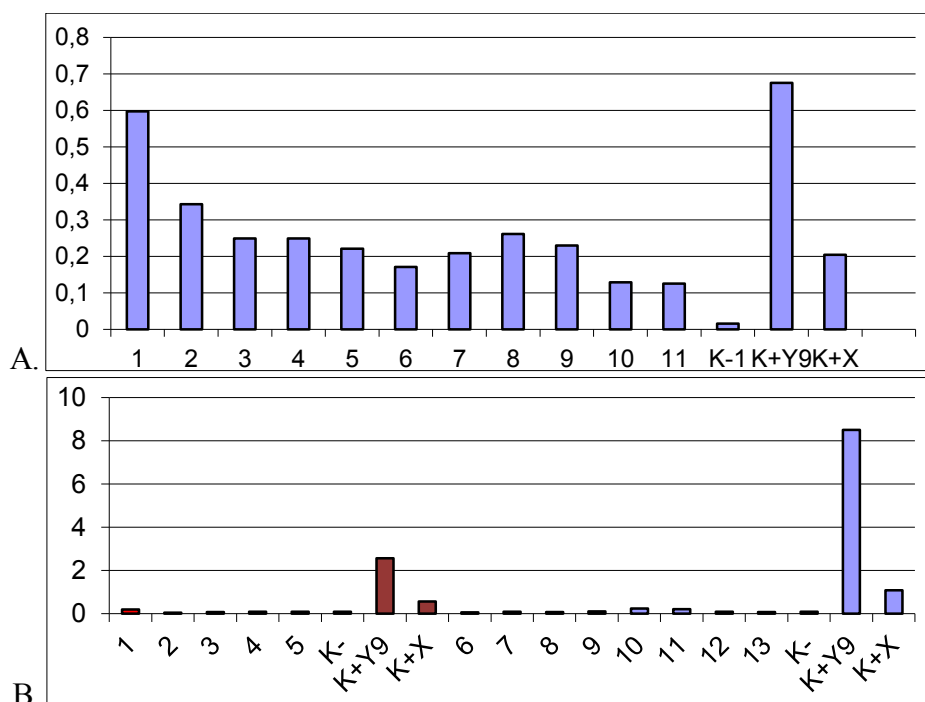


Рисунок 1 - ИФА хризантем. А – контрольное растение, нетрансгенное неустойчивое к вирусу Б хризантем: 1-11 – повторности, К-1 – отрицательный контроль (нетрансгенное неинфицированное растение), К+Y9 и К+X – положительные контроли (инфицированные растения). В – трансгенная линия хризантемы (BDS), устойчивая к CVB

Figure 1 - DAS-ELISA *Chrysanthemum*

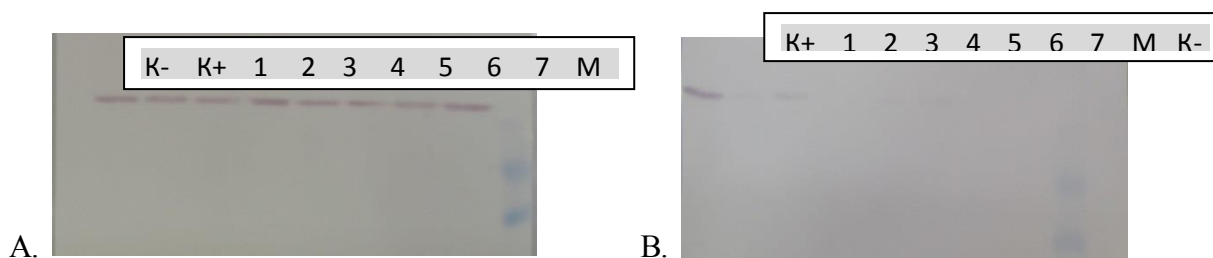


Рисунок 2 - Вестерн-блот анализ растений хризантем. А – нетрансгенное растение инфицированное вирусом Б хризантем: 1-7 – повторности, К- – отрицательный контроль (нетрансгенное неинфицированное растение), К+ – положительный контроль (хризантема, инфицированная CVB), М – маркер, В – трансгенная линия хризантемы (BDS), устойчивая к CVB

Figure 2 - Western blot *Chrysanthemum* plants

EVOLUTON OF EFFICIENCY OF VARIOUS CONSTRUCTS WITH COAT PROTEIN GENE TO VIRUS B CHRYSANTHEMUM (CVB) FOR DEVELOPMENT OF RESISTANT PLANTS

Titova S.M., Mitiouchkina T.Yu., Firsov A.P., Dolgov S.V.

virus resistance, coat protein gene, Chrysanthemum virus B, DAS-ELISA, Western blot

ELISA showed the presence of a signal in known infected plants, while the virus-free plants were no signal. Additionally was carried out Western blot analysis, which revealed the presence of specific bands in the infected plants. In extracts of infected plants was detected signal corresponding to the coat protein gene of CVB (~ 37 kDa).

УДК: 581.132.8; 634.21: 635.07

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НАТУРАЛЬНЫХ СТЕРОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ АБРИКОСА

Титова Н.В., Шишкану Г.В.

Институт Генетики, Физиологии и Защиты Растений НАН Молдовы, ул. Пэдурий, 20,
г. Кишинев, 2002, Молдова, E-mail: nvtmd@mail.ru

натуральные стероидные гликозиды, абрикос, рост, урожайность

Известно, что для регуляции роста и развития растений широко используются синтетические биологически активные соединения, однако в последние годы всё больший интерес проявляется к поиску биорегуляторов натурального происхождения, повышающих устойчивость и урожайность растений. К ним относятся природные стероидные гликозиды фуру- и спиростанолового ряда, выделенные в ИГФЗР АНМ из растений *Trigonella foenum greacum* L., *Capsicum annuum* L., *Solanum melongena* L., *Linaria vulgaris* Mill. (тригонеллозид, капсикозид, мелонгозид, линарозид), в большей мере изученные на однолетних растениях.

В задачу работы входило исследование влияния этих стероидных гликозидов на жизнеспособность, рост, фотосинтетическую продуктивность и урожайность подвойных сеянцев и различных сортов абрикоса.

Опыты проводили в питомнике и в молодом саду Института Плодоводства с подвойными сеянцами и однолетними саженцами абрикоса сортов Костюженский, Надежда и Шалах, районированными в республике Молдова, и перспективными новыми сортами Олимп, NJA-32, NJA-42 и Траян, привитыми на сеянцах абрикоса MVA, а также с плодоносящими четырехлетними растениями, выращенными в лизиметрах вегетационного комплекса ИГФЗР. В период интенсивного роста (май-начало июня) опытные растения опрыскивали 0,01 - 0,025% водными растворами исследуемых соединений и контрольные – водой. В каждом варианте 7 -10 растений. Через 2 недели и в течение вегетации определяли ростовые характеристики растений. В конце вегетации учитывали рост и биомассу надземных органов и корней, рассчитывали параметры фотосинтетической продуктивности: листовой индекс, фотосинтетический потенциал и чистую продуктивность фотосинтеза, а также учитывали урожай у плодоносящих растений. Статистическую обработку данных проводили с применением критерия Стьюдента, результаты достоверны при 0,05% уровне значимости.

Исследованию действия тригонеллозида, капсикозида, мелонгозида и линарозида на сеянцы и привитые растения абрикоса, показавшие их высокую отзывчивость на применение биорегуляторов. Выявлена активизация ростовых процессов у сеянцев абрикоса и жердели под влиянием капсикозида и тригонеллозида, в особенности в главном аттрагирующем центре – корнях, что, как известно [1], оптимизирует соотношение фитогормонов и увеличивает их экологическую стабильность. В хорошо согласованной системе донорно-акцепторных связей в целом растении оптимально реализуется рост и фотосинтез [2]. Это наглядно подтверждают данные, характеризующие фотосинтетическую продуктивность растений: листовой индекс, фотосинтетический потенциал и чистая продуктивность фотосинтеза (табл. 1). Значительно повышались жизнеспособность и качество посадочного материала сеянцев и саженцев.

В 2006-2008 гг. в питомнике исследовали районированные сорта Надежда, Шалах, Костюженский и перспективные сорта американского происхождения NJA - 32, NJA – 42 и местного - Траян.. Выявлены особенности ответной реакции исследуемых растений на некорневую обработку натуральным стероидным веществом капсикозид: увеличение высоты и диаметра стволика, массы и площади листьев в среднем на 7-8%. Наибольший эффект был у сортов Траян и NJA-32, NJA-42, где различия между опытом и контролем доходили до 16%. У однолетних саженцев абрикоса сортов NJA под действием капсикозида увеличивалась удельная поверхностная плотность листьев, важный показатель структурного роста листа, положительно коррелирующий с интенсивностью фотосинтеза и продуктивностью растений. В контроле эта величина составляла 2,42 и в опыте – 3,0 г·дм⁻² сы-

рой массы листа. Под влиянием капсикозида у перспективных сортов более значительно, чем у районированных. повышаются значения фотосинтетического потенциала, что характеризует не только величину листового аппарата, но и длительность его функционирования (в 1,25-1,30 и 1,1-1,2 раз в сравнении с контролем соответственно).

Таблица 1 - Влияние стероидных гликозидов на фотосинтетические параметры сеянцев абрикоса и жердели. 19.09.2004

Table 1 - Steroid glycosides influence on photosynthetic parameters of seedlings of stone fruit. 19.09.2004

Варианты, параметры	Конт- роль	Капси- козид	Триго- неллозид	Конт- роль	Капси- козид	Триго- неллозид
	Абрикос			Жердель		
Листовой индекс, м·м ⁻²	1,18	2,72	2,68	0,75	0,10	1,27
Фотосинтетический потенциал, тыс м ² ·сут ⁻¹ ·га ⁻¹	1626,3	3752,0	3704,0	1032,0	1096,4	1752,6
Чистая продуктивность фотосинтеза, г·м ⁻² ·сут ⁻¹	4,00	6,20	8,10	3,40	5,10	7,50

В годы (2007,2010) с длительной атмосферной и почвенной засухой (с дневными температурами 35-40⁰С и 20% осадков от нормы) исследуемые вещества проявили себя как биологически активные соединения антистрессового типа, способствуя поддержанию оптимальных ростовых и метаболических процессов растений абрикоса в таких условиях и сохранению параметров фотосинтетической продуктивности на высоком уровне. Эти соединения, в особенности мелонгозид, активизировали рост побегов и листьев, повышая отношение длины листа к его ширине, что является наиболее изменчивым морфологическим признаком, отражающим, по мнению [3], адаптацию растений к внешней среде. Изучали влияние капсикозида и мелонгозида на жизнедеятельность плодоносящих растений абрикоса пятилетнего возраста сорта Костюженский в саду и в лизиметрах. Опытные растения в засушливых условиях характеризовались более высокой влажностью тканей листа. В таблице 2 показано превышение опытных растений над контролем по таким важнейшим фотосинтетическим показателям как содержание пигментов, интенсивность фотосинтеза и составляющие продукционного процесса в условиях атмосферной засухи 2010 г.

Таблица 2 - Влияние мелонгозида на фотосинтетические параметры растений абрикоса с. Костюженский. Июль 2010

Table 2 - Melongozid influence on photosynthetic parameters v/.Kostyuzhensky apricot plants. July 2010

Вариант	Сумма хлорофиллов мг·дм ⁻²	Фотосинтез, мкмоль СО ₂ ·м ⁻² ·с ⁻¹	Листовой индекс, м ² ·м ⁻²	Фотосинтетический потенциал, тыс м ² ·сут ⁻¹ ·га ⁻¹	Чистая продуктивность фотосинтеза, г·м ⁻² ·сут ⁻¹
Контроль	2,88	2,00	4,58	389,3	1,06
Мелонгозид О	3,01	2,17	4,90	418,0	1,08

Как и под действием других стероидных гликозидов, особенности разворачивания листовой поверхности и структурные характеристики листьев у опытных растений абрикоса в значительной степени определяли величины листового индекса, фотосинтетического потенциала, нетто-ассимиляции и в конечном итоге продуктивность растений, превышающую контроль на 8-10 %. Хотя по чистой продуктивности фотосинтеза варианты мало отличались, но значительное превышение значений фотосинтетического потенциала в опыте над контролем способствовало повышению урожайности под влиянием мелонгозида О на 12%.

Изучение влияния линарозида на растения абрикоса было начато на вступающих в плодошение четырехлетних растениях сорта Костюженский. Установлено, что опрыскивание этим препаратом увеличивает массу одного плода на 6-7% и общий урожай на 25-29%. В таблице 3 показано стимулирование роста плодов линарозидом в сравнении с контролем и капсикозидом. Линарозид был эффективнее капсикозида на 18-20%.

Таблица 3 - Урожай растений абрикоса с.Костюженский, обработанных линарозидом. Июль 2011 г.

Table 3 - Apricot yield v..Kostyuzhensky treated with linarozid, July 2011

Вариант	Контроль	Капсикозид	Линарозид
Масса одного плода, г	48,4	51,6	62,3
Урожай на одном растении, % от контроля	100	107	129

В дальнейших исследованиях выявлено значительное стимулирующее действие препарата линарозид на однолетние растения абрикоса. Это проявилось в активизации процессов нарастания листовой поверхности, интенсивности роста побегов, штамба и корневой системы. Количество листьев, общая масса и площадь листьев на одном растении у сортов Олимп и NJA-42, обработанных линарозидом, превышали эти величины у контрольных растений в среднем на 7-10%. Растения абрикоса сорта Олимп были более отзывчивыми на обработку линарозидом, чем сорт NJA-42.

Таким образом, в результате многолетних исследований дано физиологическое обоснование применения натуральных стероидных соединений тригонеллозид, капсикозид, мелон-гозид и линарозид для оптимизации процессов роста и фотосинтеза с целью повышения продуктивности растений абрикоса.

Литература

1. Latiffe H.R., Travis R.A. Photosynthesis and assimilate partitioning in closely related lines of rice exhibiting different sink-source relationships // Crop.Sci., 1984, v.24, № 3. P.447 - 452.
2. Мокронос А.Е. Интеграция функций роста и фотосинтеза // Рост растений и его регуляция. Кишинев, Штиинца, 1985. – С.183 – 198.
3. Tsukaya H. The leaf index. Heteroblasty, natural variation and the genetic of polar processes of leaf expansion // Plant and Cell Physiol., 2002, v 43, №4. P. 372 – 378.

STUDY OF NATURAL STEROIDAL GLYCOSIDES ON APRICOT PLANT PRODUCTIVITY

Titova N.V., Shishkanu G.V.

natural steroidal glycosides, apricot, growth, yield

Studied the effect of glycosides isolated from plants of the genera *Trigonella*., *Capsicum*., *Solanum* and *Linaria* on the photosynthetic activity of rootstock seedlings and grafted plants apricot different ages. Revealed the stimulatory effect of glycosides on growth, yield and photosynthetic parameters of the test plants.

СКРИНИНГ ШТАММОВ ДИАЗОТРОФОВ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОГО БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА

GLYCINE MAX (L.) MERR.- BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM

Третьяков В.О.¹, Караушу Е.В.², Воробей Н.А.¹, Таран Н.Ю.¹, Коць С.Я.²

¹Институт биологии Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская 64/13, г. Киев, 01601, Украина, E-mail: patsko_lena@ukr.net

²Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, ул. Васильковская 31/17, г. Киев, 03022, Украина

дiazотрофы, Glycine max. Merrill., ТБК-активные продукты, нитрогеназная активность

Введение

Актуальной задачей настоящего в области симбиотической азотфиксации является разработка препаратов биологической стимуляции роста, развития бобовых растений, усиление их продуктивности и устойчивости за счет использования биологического азота. Основой этих препаратов могут быть высокоэффективные штаммы клубеньковых бактерий, которые выделяют комплекс веществ активизирующих рост и развитие растений: положительно влияют на корневую систему растений, улучшают плодородие почв, увеличивают в них содержание азота за счет повышения активности. Соответственно, они могут быть рекомендованы для использования в агробиотехнологии.

Материалы и методы

Целью данной работы было изучение эффективности функционирования симбиотических систем, созданных на основе *Glycine max (L.) Merr.* и бактериальных культур diaзотрофов для регуляции продуктивности и устойчивости растений разных сортов сои. Для инокуляции семян сои сортов Аннушка, Васильковская и Марьяна использованы клубеньковые бактерии *Bradyrhizobium japonicum* из коллекции азотфиксирующих микроорганизмов ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ НАН Украины – производственный штамм 6346 и Tn5-мутанты: T66, B1-16, B1-20.

Tn5-мутанты полученные методом транспозонового мутагенеза [1] и отобраны по улучшенным симбиотическим свойствам. Бактериальный титр суспензий – 10^9 клеток /мл.

В лабораторных опытах с семянами сои проращивание и снятие показаний проводили в соответствии с ГОСТ 12038–84 [3].

Вегетационные исследования проводили в условиях модельных опытов на вегетационной площадке ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ НАН Украины при влажности субстрата 60% ПВ и естественном освещении. Растения выращивали по 6 штук в 15–килограммовых сосудах Вагнера. Сосуды предварительно стерилизовали 20%-ным раствором H_2O_2 . В качестве субстрата использовали промытый речной песок с добавлением минеральной питательной смеси Гельригеля [4], содержащей 1,0 норму азота (1 норма соответствует $708 \text{ мг Ca(NO}_3)_2 \times 4H_2O$ на 1 кг песка). Перед посевом семена стерилизовали 70%-ным этанолом в течение 15 мин, а затем промывали проточной водой в течение 2 ч. После этого инокулировали подготовленными суспензиями соответствующих штаммов *B. japonicum*. Контроль – семена сои увлажненные водопроводной водой. Повторность в вариантах опытов – семикратная.

С целью изучения влияния инокуляции на устойчивость растений в фазу бутонизации определяли интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в фотосинтетических тканях и корнях растений сои, которые оценивали по количеству ТБК-активных продуктов [5]. Азотфиксирующую (нитрогеназную) активность корневых клубеньков сои определяли в фазу бутонизации растений ацетиленовым методом [6]. Газовую смесь анализировали на газовом хроматографе Agilent Technologies 6855 Network GC System (USA). Определения проводили в пятикратной повторности. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли по общепринятым методикам [7] с привлечением пакета специальных программ Microsoft Excel `00. Вероятность разницы между вариантами оценивали по критерию Стьюдента и уровнем значимости $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что обработка семян монокультурами клубеньковых бактерий приводит к увеличению энергии прорастания семян по сравнению с контролем во всех опытных вариантах. Для сорта Марьяна наиболее эффективным по влиянию на исследуемый показатель оказался штамм В1-16, для сорта Аннушка – 6346 и Т-66, для сорта Васильковская – штамм В1-20, инокуляция семян которыми приводила к увеличению энергии прорастания на 29,4%, 57,1% и 48,5% соответственно по сравнению с контролем.

Особенно заметно стимулирующее влияние инокуляции микроорганизмами на длину проростков сои. Обработка семян всеми без исключения штаммами ризобий приводила к увеличению длины проростков на 45,5–122,3% по отношению к контрольному варианту. Наиболее эффективными для сортов Марьяна и Аннушка оказался штамм Т-66, для сорта Васильковская – В1-20, инокуляция которыми положительно влияла на рост проростков и приводила к увеличению их длины более чем в два раза по сравнению с контролем.

Поскольку поддержание ПОЛ на необходимом безопасном для клеток уровне –жизненно важное условие их нормального роста и функционирования, одним из наших заданий было исследование влияния штаммов-инокулянтов *V. japonicum* на содержание ТБК-продуктов в фотосинтетических тканях и корнях сои. Показано, что низкое содержание ТБК-активных продуктов в фотосинтетических тканях наблюдалось при инокуляции семян сои сорта Аннушка штаммами 6346 и В1-20, семян сортов Марьяна и Васильковская – 6346 *V. japonicum* (рис. 1, А). Наибольшее содержание ТБК-активных продуктов отмечали при инокуляции семян сои сортов Аннушка и Васильковская Тn5-мутантным штаммом Т66, а сорта Марьяна – штаммом В1-20. Исследовав содержание ТБК-активных продуктов в корнях растений, существенной разницы между использованными штаммами ризобий по влиянию на исследуемый показатель для всех трех сортов растений мы не отмечали (рис. 1, Б).

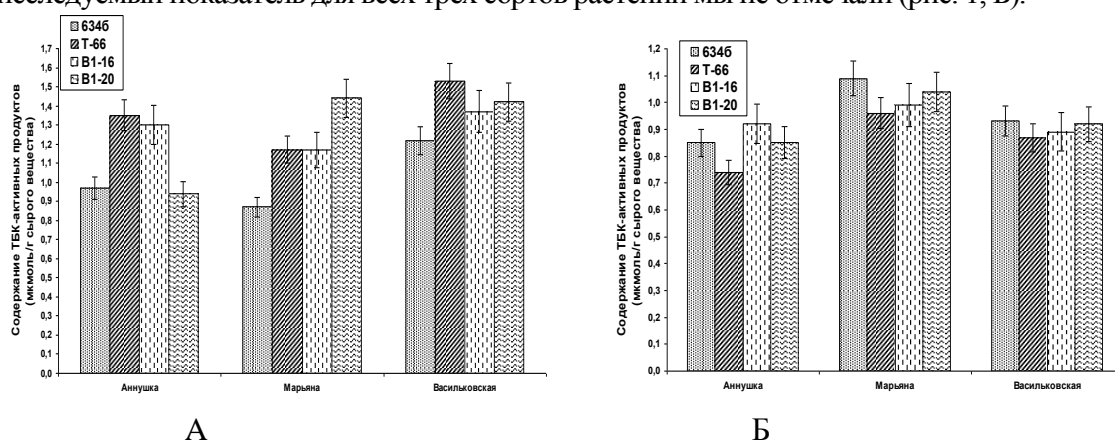


Рисунок 1 - Содержание ТБК-активных продуктов в листьях (А) и корнях (Б) растений сои при инокуляции семян различными штаммами diazotрофов

Figure 1 - The content of TBA-active products in leaves (A) and roots (B) of soybean plants by inoculation of different strains of diazotrophs

В результате исследований выявлено также, что симбиотические системы сои, образованные с участием идентичных микросимбионтов отличаются по количеству сформированных корневых клубеньков в зависимости от использованного сорта сои, что отражается на показателе интенсивности азотфиксирующей активности при функционировании бобово-ризобияльной системы. Как видно с рис. 2 оптимизировать азотфиксирующий потенциал симбиотической системы сои сорта Васильковская возможно за счет использования Тn5-мутантов В1-16 и В1-20 *V. japonicum*, которые способны к большей азотфиксации по сравнению с мутантом Т66 и производственным штаммом 6346. Бактероиды образовавшиеся на основе клубеньковых бактерий Тn5-мутанта *V. japonicum* Т66 проявляли наибольшую азотфиксирующую активность в симбиозе с соей сорта Марьяна. Нитрогеназная активность клубеньков сои сорта Аннушка была наибольшей при инокуляции мутантом В1-16.

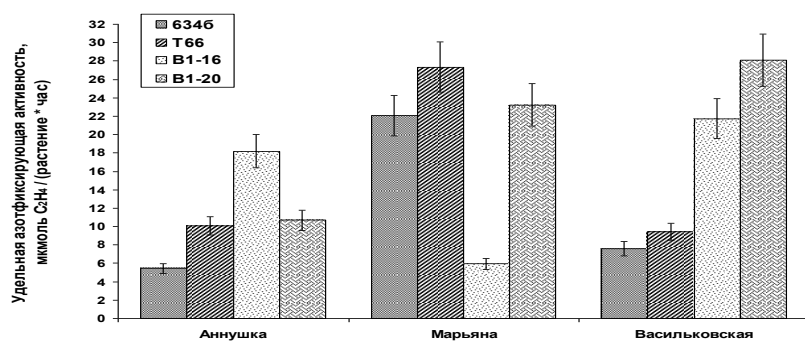


Рисунок 2 - Удельная азотфиксирующая активность симбиотических систем *Glycine max* (L.) Merr.-*Bradyrhizobium japonicum*, сформированных в результате предпосевной инокуляции семян штаммами ризобий

Figure 2 - Specific nitrogen-fixation activity of symbiotic system of *Glycine max* (L.) Merr.-*Bradyrhizobium japonicum*, formed in result of pre-inoculation the seeds by rhizobia strains

Таким образом, для повышения азотфиксирующего потенциала симбиотической системы исследуемых сортов сои можно рекомендовать применение данных Tn5-мутантов, способных обеспечить более высокий уровень нитрогеназной активности. Все это открывает большие перспективы перед исследованиями по оптимизации симбиотической азотфиксации и повышению ее вклада в урожайность и устойчивость бобовых растений.

Литература

1. Маліченко С.М. Транспозоновий мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* / С.М. Маліченко, В.К. Даценко, В.М. Василюк // Физиол. и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39, № 5. – С.409–418.
2. Child J.J. Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. association with non-leguminous plant cell cultures // Nature. – 1975. – Vol. 253. – P. 350–351.
3. Справочник по семеноводству / Н.В. Лобода, Б.А. Весна, М.М. Сирота и др. – Киев: Урожай, 1991. – 352 с.
4. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. – Киев: Наук. думка, 1964. – 388 с.
5. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. – 1968. – Vol. 125. – № 1. – P. 189–198.
6. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene – ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. – 1968. – Vol.42. – № 8. – P.1185–1207.
7. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

SCREENING OF DIAZOTROPHS STRAINS TO FORM AN EFFECTIVE SYMBIOSIS OF LEGUME-RYZOBIUM *GLYCINE MAX* (L.) MERR. - *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

Tretyakov V.O., Karaushu E.V., Vorobey N.A., Taran N.Yu., Kots S.Ya.

diazotrophs, Glycine max. Merrill., TBA-active products, nitrogen-fixing activity

In present study efficiency of pre-sowing treatment of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds of different varieties by bacterium *Bradyrhizobium japonicum* – commercial strain 634b and Tn5-mutants T66, B1-16, B1-20. The obtained data showed positive influence of inoculation on the plants in the early stages of development, the level of nitrogen-fixation activity and the level of lipid peroxidation in plant tissues.

ВВЕДЕНИЕ *CYPRIPEDIUM CALCEOLIS* L. В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Фатеева Е.В., Андрюшечкина Г.В., Мокшин Е.В., Лукаткин А.С.

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева»,
ул. Большевикская, 68, г. Саранск, 430005, Россия. E-mail: aslukatkin@yandex.ru*Cypripedium calceolus*, *in vitro*, инфицированность, жизнеспособность, стерилизующий агент

Венерин башмачок – одна из красивейших орхидей умеренного пояса, поэтому она издавна уничтожалась как при сборе на букеты, так и при выкопке корневищ для переноса растения в сады. Сокращается численность башмачка также и в результате изменений или разрушений его местообитаний при рубке лесов и внесении удобрений. В случае, если на вырубках образуются луга, башмачок постепенно выпадает. На сплошных вырубках травяных сосняков башмачок выпадает уже через 3 года [1]. В связи с быстрым исчезновением башмачок – первая орхидея, взятая под охрану [2]. Венерин башмачок настоящий *Cypripedium calceolus* L. – растение, занесенное в Красную Книгу Российской Федерации. В связи с проблемой сохранения аборигенной флоры и восстановления численности орхидных необходима разработка подходов и методов получения растений в культуре *in vitro* для последующей их интродукции и репатриации [3].

Первым этапом введения в культуру *in vitro* является стерилизация первичных эксплантов, так как это напрямую влияет на инфицированность эксплантов, их состояние и степень жизнеспособности. Применяют большое количество различных стерилизующих растворов: 5-10% хлорамин Б, 0,1% диацид, 70% этанол, 0,1% мертиолат, 0,01% бенлат, 0,1% каптан, 0,01% превикур-Н, 0,1 % сулема, и др. [4]. Однако в каждом конкретном случае необходимо эмпирически подбирать стерилизующий агент и время экспозиции, обеспечивающие максимальную стерильность и жизнеспособность эксплантов.

Целью нашей работы было изучение влияния режима стерилизации на инфицированность и жизнеспособность эксплантов (коробочки, фрагменты корневища) венериного башмачка настоящего (*C. calceolus* L.). В качестве стерилизующих агентов использовали 0,1% KMnO_4 , 70% этанол, 6% хлорамин, 50% Domestos.

Стерилизацию проводили по двум схемам. Первая включала в себя промывку объектов проточной водой, затем мыльным раствором, ополаскивание в дистиллированной воде и экспозицию в 0,1% KMnO_4 (30 мин.), 70% этаноле (1–2 мин.), 6% хлорамине (15–25 мин.). Во втором случае стерилизацию осуществляли по той же схеме, за исключением того, что 6% хлорамин заменяли на 50% Domestos (25 мин.). Посадку эксплантов проводили на агаризованную (0,7%) среду по прописи Мурасиге и Скуга (рН 5,6–5,8), дополненную 1,5 мг/л индолуксусной кислоты (ИУК) и 2,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП). Культивирование эксплантов осуществляли в пробирках при естественном освещении и температуре 23–25 °С.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что для фрагментов корневищ наименьший процент зарастания (13%) отмечался в варианте 0,1% KMnO_4 (30 мин.) + 70% этанол (1 мин.) + 50% Domestos (25 мин.). Использование другого режима стерилизации оказалось неэффективным применительно к этим эксплантам. В то же время при стерилизации коробочек наименьшая инфицированность была зафиксирована в варианте с использованием 6% хлорамина – 46%. Несколько большим (56%) данный показатель был в варианте с использованием 50% Domestos.

Максимальный процент жизнеспособных эксплантов (87%) в случае фрагментов корневищ отмечен в варианте с 50% Domestos. При эксплантации коробочек наилучший результат по жизнеспособности (54%) был при использовании 6% хлорамина.

В ходе длительного культивирования на среде Мурасиге-Скуга с 1,5 мг/л ИУК и 2,5 мг/л 6-БАП выявлена неодинаковая реакция различных эксплантов. Для фрагментов корне-

вищ не показано видимого органогенеза или каллусогенеза, тогда как на коробочках формировался каллус. Образующийся каллус был светло-желтоватым, средне-плотной консистенции, медленно растущим. Пересадку каллуса на свежую питательную среду провели спустя 5 месяцев после первичной эксплантации, и наблюдали продолжение роста каллусной ткани. В последующем была произведена пересадка каллусной ткани на питательные среды с измененным составом гормонов с целью органогенеза (ризогенеза или формирования побегов).

Таким образом, использованные режимы стерилизации эксплантов *C. calceolus* L. показали неплохие результаты как по стерильности, так и по проценту жизнеспособности эксплантов. Для коробочек целесообразно использовать более мягкий режим стерилизации (с использованием 6% хлорамина), тогда как для корневищ лучше применять стерилизацию с использованием Доместоса. Введение *C. calceolus* L. в культуру *in vitro* с последующей регенерацией растений из каллусной ткани и клональным размножением позволит в дальнейшем провести работу по интродукции и реинтродукции этого исчезающего вида в естественных местообитаниях.

Литература

1. Пушай Е. С. Биология, экология и распространение видов сем. *Orchidaceae* Juss. в Тверской области: монография / Е. С. Пушай, С. М. Дементьева. – Тверь: Твер. гос. ун-т. – 2008. – 206 с.
2. Денисова Л. В. Биологическая флора Московской области / Л. В. Денисова, М. Г. Вахрамеева. – М.: Издательство Московского университета. – 1978. – Вып. 4. – 255 с.
3. Батыгина Т. Б. Теория репродукции и сохранение естественного генофонда орхидных с позиции системы надежности / Т. Б. Батыгина, Е. А. Брагина // Охрана и культивирование орхидей. – СПб. – 2011. – С. 55-62.
4. Мокшин Е. В. Практикум по культуре растительных клеток и тканей: Учебное пособие / Е. В. Мокшин, А. С. Лукаткин. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та. – 2009. – 48 с.

INTRODUCTION *CYPRIPEDIUM CALCEOLIS* L. IN CULTURE *IN VITRO*

Fateeva E.V., Andryushechkina G.V., Mokshin E.V., Lukatkin A.S

Cypripedium calceolus; *in vitro*; infections; viability; sterilizing agent.

Cypripedium calceolus L. is a plant of the Russian Red Book. The effect of *C. calceolus* sterilization was studied on the explants (fragments of rhizomes, or capsules) infection and viability. As a sterilizing agent was used 0,1% KMnO₄, 70% ethanol, 6% chlorine amine, 50% Domestos. The used sterilization modes showed good results as to sterility, as to explants viability. It should be used a softer sterilization (using 6% chlorine amine) for capsules, and Domestos – for rhizomes .

**ВЫЯВЛЕНИЕ СУБСТРАТНЫХ СВОЙСТВ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ
ПРИ СИНТЕЗЕ БИОФЛАВОНОИДОВ РАСТЕНИЙ РЖИ ПОСЕВНОЙ
(*SECALE CEREALE L.*)**

Федураев П.В., Чупахина Г.Н., Скрыпник Л.Н.

ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,
ул. А. Невского, 14, г. Калининград, 236041, Россия, E-mail: pavelf15@mail.ru

салициловая кислота, сумма фенолов, катехины, лейкоантоцианы

Введение

Особое внимание исследователей к салициловой кислоте (СК) связано с обнаружением ее ключевой роли в индукции системной приобретенной устойчивости растений к инфицированию фитопатогенами. Однако не вызывает сомнения факт участия СК в развитии защитных реакций в растениях в ответ на неблагоприятные факторы среды не только биотической, но и абиотической природы. В последнее время все более актуальным является поиск негенетических средств увеличения продуктивности и устойчивости растений, особенно сельскохозяйственных. В связи с этим вызывает интерес поиск низкомолекулярных веществ, которые могут выступать в качестве фитостимуляторов. Так же стоит отметить, что в литературе практически отсутствуют сведения о роли влияния СК на биосинтез вторичных метаболитов, а также вовлечение данного вещества в обмен фенольными соединениями, и в частности биофлавоноидов последнего синтетического звена [1,2].

Материалы и методы

В качестве объекта исследования нами была выбрана рожь посевная (лат. *Secale cereale L.*). Растения ржи посевной выращивались при различных концентрациях салициловой кислоты: 100 мкМ; 200 мкМ; 500 мкМ; 1000 мкМ. В качестве контроля использовалась дистиллированная вода.

Семена предварительно дезинфицировались раствором 70% этилового спирта со временем экспозиции около 30 секунд. Отбирались по 50 кондиционных семян (отсутствие визуальных повреждений) для каждой из приведенных концентраций и переносились в чашки Петри. Отобранные семена залились 30 мл рабочего раствора.

Чашки Петри были перенесены в климатическую камеру Binder, первые трое сут. проращивание семян осуществлялось в полной затененности при температуре 20 °С. Последующие 4 сут. растения выращивались со стандартным фотопериодом 16 ч световой экспозиции и температуре 25 °С и 8 ч затененности при температуре 22 °С.

На 7 сутки, для интактных растений были заменены рабочие растворы с заданными концентрациями. Для установления функциональных изменений на уровне клетки в растениях выращенных при разных концентрациях на 14 сут. измерялась концентрация фенольных соединений различных классов. Количественное определение содержания суммы полифенольных соединений проводили с помощью гексацианоферрата калия. В кислой среде фенольные соединения восстанавливают гексацианоферрит калия (Fe+3) до гексацианоферрата калия (Fe+2), который в присутствии ионов трехвалентного железа образует окрашенные соединения (берлинская лазурь) которые измеряются при длине волны 720 нм.

Различия в окислительно-восстановительных потенциалах для различных фенолов приводит к дифференциальным окислительно-восстановительным реакциям в анализируемых жидкостях. Для этого пробы были стандартизированы по галловой кислоте. Таким образом, результаты выражены как "эквиваленты галловой кислоты", а не как абсолютные величины.

Определение содержания катехинов (флаван3,4 диолов) в растительных пробах. В кислой среде ванилин реагирует с конденсированными дубильными веществами, с образованием коротко живущих соединений красного цвета, которые представляют собой продукты конденсации флавоноидов с ванилином, с максимумом поглощения 520 нм.

Определение содержания лейкоантоцианов (флаван-Золов) в растительных пробах. Бутанол-НСI метод определения флаван-3,4диолов (лейкоантоцианов) основан на расщеплении внутрифлаваноидной связи в проантоцианидине с использованием горячих кислот, приводящий к окислению флаван-3,4диолов и дальнейшее их преобразование в антоцианы (окрашенные соединения). Сформировавшийся окрашенный раствор имеет максимальную оптическую плотность про 520 нм.

Опыты проводили в трех биологических повторностях. Полученные данные были обработаны с использованием пакета электронных таблиц Microsoft Excel и представлены в виде средних арифметических значений с указанием среднего квадратического отклонения. Работа проводилась на базе лаборатории природных антиоксидантов химико-биологического института, Балтийского федерального университета им. И. Канта[1, 3].

Результаты и обсуждение

Для определения биохимического статуса экспериментальных растений в них определялось содержание вторичных метаболитов фенольной природы: таких как катехины, лейкоантоцианы, сумма фенольных соединений. Измерения проводились на 14 сут. после посадки.

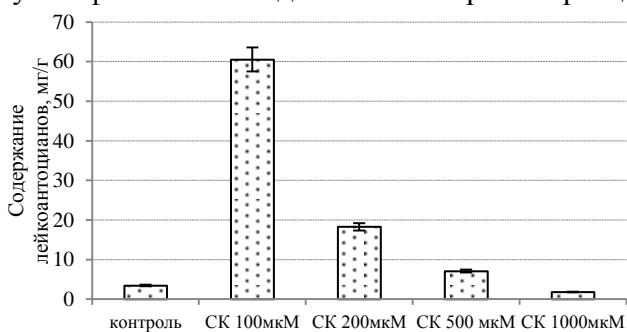


Рисунок 1 - Влияние различных концентраций СК на накопление лейкоантоцианов в растениях ржи посевной

Figure 1 - Effect of different concentration of SA on the accumulation of leucoanthocyanins in *Secale cereale* L.

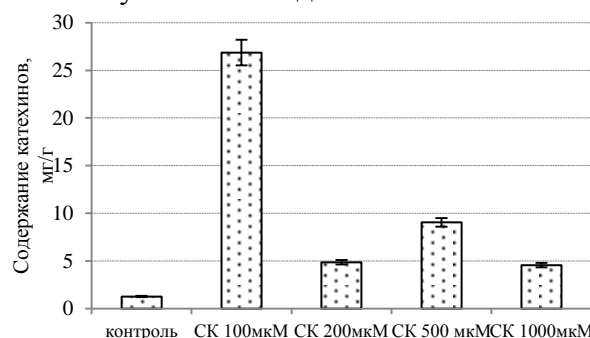


Рисунок 2 - Влияние различных концентраций СК на накопление катехинов в растениях ржи посевной

Figure 2 - Effect of different concentration of SA on the accumulation of catechins in *Secale cereale* L.

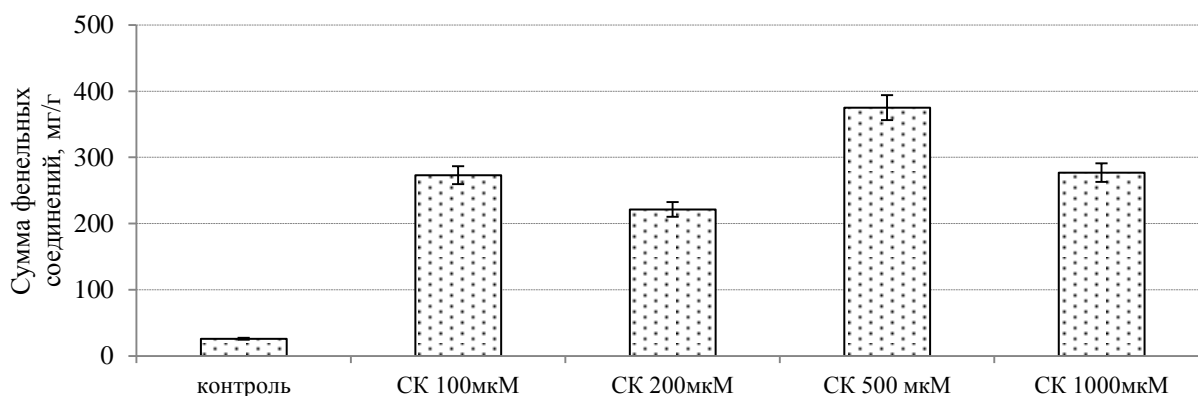


Рисунок 3 - Влияние различных концентраций СК на содержание фенолов в растениях ржи посевной

Figure 3 - Effect of different concentration of SA on the accumulation of total phenols in *Secale cereale* L.

Отмечен высокий пул флаван-3,4 диолов в растениях выращенных при концентрации действующего раствора 100 мкМ ($60,55 \pm 4,2$ мг/г). Однако стоит отметить, что содержание лейкоантоцианов в растения выращенных на растворах с концентрациями 200 мкМ и 500 мкМ была достоверно выше чем у растений выращенных на среде без добавления СК (контроль).

Максимум содержания катехинов был отмечен в растениях выращенных при концентрации 100 мкМ ($26,85 \pm 2,11$ мг/г). Однако растения выращенные при больших концентрация действующего вещества (200 мкМ, 500 мкМ, 1000 мкМ) были так же достоверно выше контроля.

Отмечен сравнительно высокий уровень суммарного содержания фенольных соединений у растений выращенных на растворах СК. Однако, максимум был отмечен у растений выращенных при концентрации 500 мкМ ($375,13 \pm 27,51$ мг/г), что может быть объяснено тем что общий пул фенольных соединений при данной концентрации составляют вещества не входящие в число исследуемых нами классов (флаван-3,4 диолов, флаван-3 олов). Как было написано выше, максимум накопления для данных классов биофлавоноидов отмечался при концентрации действующего раствора 100 мкМ.

Заключение

В работе показан поиск путей увеличения продуктивности растений за счет использования негенетических методов. Вовлечение в обмен веществ экзогенных вторичных метаболитов, а в частности разнородной группы фенольных соединений является эффективным способом активации ростовых процессов растений особенно при низких концентрация действующих растворов (100 мкМ и 200 мкМ). Данные эффекты можно рассматривать двояко. С одной стороны это изменение в окислительно-восстановительном балансе клетке, приводящий к увеличению пула антиоксидантов. С другой стороны вовлечение их, а в частности СК, в общий фенольный обмен, что стимулирует лигнификацию клетки, тем самым увеличивая резистентность растения при воздействии на него не благоприятных факторов среды.

Литература

1. Кравец В.С. и др. Регуляторы роста растений: внутриклеточная гормональная сигнализация и применение в аграрном производстве // Физиология растений, 2008, том 55, №4, с. 629 – 640.
2. Федурев П.В., Чупахина Г.Н., Скрыпник Л.Н. Влияние экзогенных фенольных соединений на пул биофлавоноидов в листьях клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) Материалы симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», 2012, С. 477-481
3. Федурев П.В., Чупахина Г.Н., Скрыпник Л.Н. Динамика накопления катехинов щавелем курчавым (*Rumex crispus* L.) – суперпродуцентом фенольных соединений проантоцианидинового ряда, Химия растительного сырья. 2011. №4. С 205-208.

IDENTIFICATION SUBSTRATE PROPERTIES OF SALICYLIC ACID IN SYNTHESIS OF FLAVONOIDS BY *SECALE CEREALE* L.

Feduraev P.V., Tchoupakhina G.N., Skrypnik L.N.

salicylic acid, total phenolic content, catechins, leucantocyanins

Effect of low concentrations of salicylic acid in the accumulation of phenolic compounds and different classes of bioflavonoids was shown.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ ФОРМ ПШЕНИЦЫ МЕТОДАМИ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ И ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ

Хайленко Н.А., Алтаева Н.А., Искакова А.Б., Терлецкая Н.В.

Республиканское государственное предприятие «Институт биологии и биотехнологии растений» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, ул. Тимирязева, 45, г. Алматы, 050040, Республика Казахстан, E-mail: Khailenko@yandex.ru

отдаленная гибридизация, виды, гибриды, зародыши, эмбриокультура

Введение

Одной из актуальных проблем является проблема сохранения видов растений, как дикорастущих, так и сельскохозяйственных, с помощью методов биотехнологии. В результате использования методов эмбриокультуры можно сохранять не только редкие и исчезающие виды растений, но и добиться более высокой завязываемости семян и плодов при проведении отдаленной гибридизации растений. Но чаще всего, при проведении таких исследований возникают формы растений с новой комбинацией генов и признаков, приводящей, в конечном итоге, к развитию новых организмов. Для сельского хозяйства Казахстана создание новых, высокопродуктивных сортов сельскохозяйственных растений является основной задачей генетиков и селекционеров на долгие годы. В последнее время в процессе выведения новых сортов, для придания растениям полезных признаков, начаты исследования *эпигенетических* изменений у мягкой пшеницы.

Эксперимент по выращиванию незрелых зародышей видов, сортов и межвидовых гибридов пшеницы на искусственных питательных средах, проводили с дальнейшей целью получения как можно большего количества гибридных растений с различными хозяйственно-ценными признаками, для проведения генетико-селекционных анализов полученного в результате отдаленной гибридизации материала, в частности, стерильных и фертильных растений.

Материалы и методы

Все исследования были проведены в 2009 -2013 гг. Объектами для исследований служили виды пшениц: *T.aestivum* L. (A^uA^uBBDD) (сорт Саратовская-29), линия мягкой пшеницы, полученная из питомника СИММИТ: №1374 [MX103-04MF5YCINT-210] и *T.compactum* L. (A^uA^uBBDD), а также гибридные растения F₁ - F₃, полученные от межвидовых скрещиваний: Саратовская-29 × *T.compactum*, *T.compactum* × №1374 [MX 103-04 MF5YCINT-210, №1374 MX 103-04 MF5YCINT-210] × *T.compactum*. Незрелые семена от этих скрещиваний были использованы как для эмбриокультуры, так и оставлены на созревание, для того, чтобы в последующие годы получить гибридные потомства.

Посев производили на полях КазНИИЗиР АО «Казагроинновация» МСХ РК. Скрещивания всех видов, сортов, линий и гибридов проводили по общепринятым методам, с некоторыми модификациями [1, 2]. Во всех полевых опытах соблюдали режим агротехнических мероприятий общепринятый для данного региона. После получения урожая проводили анализ по элементам структуры урожая.

На искусственные питательные среды в 2009 г. были посажены незрелые 15-ти – 18-ти – суточные зародыши видов и гибридов, участвовавших в эксперименте. Всего было посажено около 700 незрелых зародышей. Описание методов получения каллусов и растений-регенерантов представлено в инновационном патенте Республики Казахстан № 79082 от 10.12.2012 г. [3].

Результаты и обсуждение

В решении проблемы получения гетеро- и гомозиготных линий из гибридных комбинаций для ускорения селекционного процесса основную роль играет разработка методов оптимизации компонентов питательных сред и изучение образования каллусов и растений-регенерантов при культивировании незрелых зародышей пшеницы. [4].

Каллусы из незрелых зародышей комбинаций №1374 × *T.compactum*, *T.compactum* × №1374, Саратовская-29 × *T.compactum* хорошо развивались и росли, а в некоторых случаях зародыши почти сразу же после посадки – через 1-2 недели давали ростки. Процент растений-регенерантов колебался от 26,5% *T.compactum* × Саратовская-29 и до 80,6% у комбинации Саратовская-29 × *T.compactum*. Визуальные наблюдения за ростом и развитием каллусов показали, что такие проростки росли из точек роста самого зародыша, а не из каллусной ткани. Если же такие каллусы с проростками разделяли на две части и пересаживали отдельно – растение-регенерант на среду с ИУК, а каллус снова на свежую среду МС, то через некоторое время начинали расти слабые проростки уже из каллусной ткани, однако при последующих пересадках практически все они погибали. Таким образом, в массовом количестве получены растения-регенеранты не только видов и сортов пшеницы, используемых в межвидовых скрещиваниях, но и растения-регенеранты гибридных комбинаций.

Зимой 2009 – 2010 гг. растения-регенеранты сорта Саратовская 29, видов *T.compactum* L. и гибрида № 1374 × *T.compactum* L. на стадии кушения были пересажены в горшки с почвой. В апреле 2010 г. все растения расколосились и даже зацвели. Весной 2011 г. зерна со всех растений были высеяны на экспериментальном участке. При фенологических наблюдениях оказалось, что семена растений F₂ хорошо прорастали, растения развивались и росли – все стадии – кушение, выход в трубку, колошение были нормальными для растений ярового посева, но созревание задерживалось на 2 недели. В дальнейшем опыте зерна всех растений, прошедших стадию эмбриокультуры, ежегодно высеивали в озимом посеве. Завязываемость зерен у растений видов и гибридов F₁ - F₃, колебалась в пределах от 40% до 70%. Также как и у растений, выращенных из контрольных семян, не прошедших стадию эмбриокультуры, стабильными были признаки: «высота растений», «длина главного колоса», «количество колосков», «количество цветков в главном колосе» – коэффициент вариации у них редко превышал 20%. Признаки «количество колосьев на одно растение» и «количество зерен в колосе» имели высокий коэффициент вариации, достигающий 57,9% у растений гибридной комбинации *T.compactum* L × № 1374. Таким образом, снова подтверждается наше предположение о том, что наследование морфофизиологических признаков у пшеницы контролируется двумя системами генов – классической и эпигенетической.

На рис. 1 и 2 представлены колосья сорта Саратовская-29, и растений из расщепляющейся гибридной комбинации № 1374 × *T.compactum* L.



Рисунок 1 - Колосья сорта Саратовская-29. F₂ после эмбриокультуры
Figure 1 - Grade ears Saratov-29. F₂ after embryoculture



Рисунок 2 – Колосья растений комбинации № 1374 × *T.compactum* L. F₂ после эмбриокультуры

Figure 2 - Ears of plants of a combination No1374 × *T.compactum* L. F₂ after embryoculture

Заключение

В результате комплексных генетических и биотехнологических исследований предложен метод, с помощью которого можно будет получать большое количество растений как материнских и отцовских форм, так и гибридных растений, полученных в результате межвидовых скрещиваний в роде *Triticum* L. В настоящее время на метод получен инновационный патент Республики Казахстан.

Литература

1. Хайленко Н.А. Цитогенетические и цитоэмбриологические закономерности формирования межвидовых и межсортовых гибридов пшеницы и риса // Автореферат дисс. докт., Алматы, 2004, 58 с.
2. Хайленко Н.А. Цитоплазматическая мужская стерильность у некоторых гибридов тетра- и гексаплоидной пшеницы // Вестник КазНУ, серия биол. - 2008. - № 2(37). – С. 69-74.
3. Способ получения жизнеспособных растений зерновых культур и их межвидовых гибридов из эмбриокультуры незрелых зародышей. Инновационный патент Республики Казахстан № 79082 от 10.12.2012 г. (Н.А.Хайленко, Н.А.Алтаева, А.Б.Искакова, Н.В.Терлецкая).
4. Иванов Г.И. Биотехнологические аспекты создания исходного материала для селекции зерновых колосовых культур / Автореф. доктор. диссерт., Краснодар, Россия. – 2006. – 45 с.

GENETIC BASES OF CREATION OF WHEAT FORMS BY METHODS OF THE REMOTE HYBRIDIZATION AND EMBRYOCULTURE.

Khailenko N.A., Altayeva N.A., Iskakova A.B., Terletskaia N.V.

remote hybridization, species, hybrids, embryo, embryoculture

Results of experiments on receiving viable posterity of plants from interspecific crossings at wheat are presented. In researches various receptions and methods of the remote hybridization and biotechnology, in particular a method of cultivation of unripe nuclei were used. The innovative patent of the Republic of Kazakhstan No. 79082 of 10.12.2012 is taken out.

РАСТЕНИЯ – АКТИВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ АНТИОКСИДАНТОВ КАК ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Чупахина Г.Н.¹, Масленников П.В.¹, Скрыпник Л.Н.¹, Чупахина Н.Ю.², Мальцева Е.Ю.¹,
Полтавская Р.Л.¹, Федураев П.В.¹

¹ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,
ул. А. Невского, 14, г. Калининград, 236041, Россия, E-mail: GCHupakhina@kantiana.ru

²ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет»,
Советский проспект, 1, г. Калининград, 236022, Россия

антиоксиданты, растения, биотехнологии

Введение

Современные методы генетической инженерии дают возможность использовать полезные гены любых живых организмов, с целью создания генетически-модифицированных объектов – активных продуцентов полезных веществ. В связи с этим поиск носителей полезных свойств активно ведётся среди объектов разного уровня организации: среди бактерий, растений и животных.

По видовому составу растения – не самое многочисленное население нашей планеты, но на их полезные свойства человек обратил внимание в первую очередь потому, что с ними он находился в постоянном контакте и использовал как более доступную пищу. Среди растений уже открыто огромное количество продуцентов полезных веществ, но эти поиски продолжаются и можно быть уверенными в том, что много новых биотехнологических продуктов будет получено в будущем с использованием растительных генов.

Дикорастущие растения являются источниками многих физиологически активных соединений, представляющих интерес для медицины, пищевой промышленности, фармации и сельского хозяйства. Сбор дикорастущих растений предусматривает выбор экологически чистых районов, которые в связи со снижением сельскохозяйственной деятельности, имеются и в Калининградской области. Однако биохимическое исследование природной флоры области, как источника биологически активных соединений, в послевоенное время не проводилось, исключая работы по характеристике растительных кормов для животных [1].

В 2008 году на базе Балтийского федерального университета в результате реализации национального проекта «Образование» организована лаборатория природных антиоксидантов. Выбор для исследования данной группы соединений был продиктован ролью антиоксидантов для сохранения здоровья человека и животных [2].

В настоящее время продолжается поиск активных продуцентов антиоксидантов среди всех объектов живого мира, относящихся или к конкретному региону [3, 4], или к определённому семейству, виду, сорту [5], к группе лекарственных растений [6, 7].

Исследуется участие антиоксидантов в защитных реакциях при окислительном стрессе – когда повышается содержание свободных радикалов. Для нейтрализации свободных радикалов, в организме должно быть достаточное количество антиоксидантов. Этим объясняется значимость количественного определения содержания антиоксидантов и поиск новых продуцентов. Большой экспериментальный материал по количественному анализу содержания антиоксидантов выполнен под руководством Я.Н. Яшина [8].

Важным направлением в исследовании антиоксидантов являются поиски путей влияния на эндогенный пул антиоксидантов. Так, показано [9], что обработка семян пшеницы экзогенными флавонолами приводима к изменениям антиоксидантной системы: при действии кверцетина уровень антиоксидантного стресса снижался, а при действии рутина – увеличивался.

Эндогенный уровень антиоксидантов помимо видовой и сортовой специфики во многом зависит от экологических факторов [10].

Материалы и методы

Проанализировано 50 видов дикорастущих растений, 66 видов лекарственных и около 40 сортов культурных растений.

Определялась суммарная активность водорастворимых антиоксидантов амперометрическим методом на приборе «Цвет – Яуза - 01» [11], спектрофотометрически определялось количественно содержание антоциановых пигментов, каротиноидов [12], суммарное содержание полифенолов, катехинов, лейкоантоцианов [6], титрометрически – количество аскорбиновой кислоты и рутина [12].

Результаты и обсуждение

Выполненные исследования показали, что оценивая растения по способности синтезировать те или иные полезные соединения, характеризующие их как активных продуцентов антиоксидантов, необходимо учитывать некоторые закономерности, выявленные нами для растений Балтийского региона.

Прежде всего это влияние климата приморской зоны. Показано, что в менее благоприятных условиях приморской зоны: более низкая температура, повышенная влажность, постоянное ветровое воздействие пул водорастворимых антиоксидантов у злаковых и бобовых растений был выше, чем у растений континентальной зоны [13].

Однотипная реакция на условия приморской зоны выявлена и в накоплении растениями антоцианов и аскорбиновой кислоты. Защитная функция данных соединений хорошо проявляется в онтогенезе растений, например, у колосняка песчаного: в начале вегетации в большом количестве присутствуют антоцианы, что объясняется их физиологической функцией. У растений с не вполне сформированным фотосинтетическим аппаратом антоцианы предохраняют их зелёные пигменты от фотоокисления, а также поглощают свет в видимой области спектра и тем самым дают дополнительную энергию растению, начинающему рост в весеннее ещё холодное время года. Во время деградации зелёных пигментов в конце вегетации наблюдается второй максимум в накоплении антоцианов. Он приходится на период более низких температур и здесь будут востребованы те же функции антоцианов, что и в период, весеннего возобновления роста растений.

Ценность растений как источников биологически активных веществ резко меняется в присутствии поллютантов. Изучен антиоксидантный статус растений в условиях загрязнения кадмием городской среды. Показано, что у всех растений содержание водорастворимых антиоксидантом в присутствии кадмия снижалось. Такая же ситуация и с содержанием каротиноидов, а вот уровень антоцианов повысился.

Высокая положительная корреляционная зависимость между содержанием Cd и накоплением антоцианов в вакуолях ($r = 0,92$) позволяет отнести их биосинтез к неспецифическим механизмам адаптации растений к большим концентрациям металла, а их содержание использовать в качестве теста, характеризующего реакцию растений на уровень загрязнения территорий ионами кадмия.

Заключение

Таким образом, поиски растений с повышенным синтезом тех или иных соединений, представляющих интерес для промышленной биотехнологии необходимо вести с учётом того, что масштаб новообразования соединения определяется не только видовой принадлежностью растения и этапом его онтогенетического развития.

Существенное влияние на показатели биосинтеза биологически активных соединений оказывают экологические факторы, которые могут оказать значительное влияние на масштаб новообразования интересующего нас соединения и дать результат существенно отличающийся от нормальных возможностей растения, особенно это касается биосинтеза антиоксидантов.

Литература

1. Панасин В.Н., Кремлёв Е.П., Калиниченко Л.А., Кариличева М.А. Экология и профилактика минеральной и витаминной недостаточности у животных. – Калининград: Изд-во РГУ им. И.Канта, 2007 – 139с.
2. Румянцева С.А., Федин А.И., Силина Е.В., Болевич С.Б. Антиоксидантная нейропротекция при инсульте. – СПб: Тактик-Студио, 2008. – 104с.
3. Pool of water-soluble antioxidants in some plants of the Kaliningrad region G.N. Tchoupakhina, E.Yu. Maltseva, N.Yu. Chupakhina, R.L. Poltavskaya 19th international scientific conference Human and nature Safety. 8-10 may, 2013, 145-147 P.
4. Чупахина Г.Н. Антиоксидантные свойства некоторых растений. Химия и технология растительных веществ: Тезисы докладов VIII Всероссийской научной конференции. Сыктывкар – Калининград, 2013. – С. 17.
5. Скрыпник Л.Н., Чупахина Г.Н., Полтавская Р.Л., Федураев П.В., Пугач Н.С. Антиоксидантные свойства базилика душистого различных сортов. Химия и технология растительных веществ: Тезисы докладов VIII Всероссийской научной конференции. Сыктывкар – Калининград, 2013. – С.202.
6. Масленников П.В., Чупахина Г.Н., Скрыпник Л.Н. Содержание фенольных соединений в лекарственных растениях Ботанического сада. Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2013. №5. С.551-557.
7. Масленников П.В., Чупахина Г.Н., Скрыпник Л.Н., Федураев П.В., Полтавская Р.Л. Содержание антоциановых и каротиноидных пигментов в лекарственных растениях. Вестник Московского государственного областного университета. 2013. № 1. С. 6.
8. Яшин Я.И. Банк данных антиоксидантов. Химия и жизнь – XXI век. – 2010, № 3, с. 49-50.
9. Загоскина Н.В., Костина В.М. Влияние экзогенных флавоноидов на антиоксидантную систему высших растений. Химия и технология растительных веществ: Тезисы докладов VIII Всероссийской научной конференции. Сыктывкар – Калининград, 2013. – С.271.
10. Чупахина Г.Н., Масленников П.В., Скрыпник Л.Н. Природные антиоксиданты (экологический аспект). – Калининград: Изд-во БФУ им. И. Канта, 2011, -111с.
11. Яшин А.Я. Новый прибор для определения антиоксидантной активности пищевых продуктов, биологических активных добавок, растительных лекарственных экстрактов и напитков // Прибор и автоматизация. – 2004, № 11, с. 45-48.
12. Чупахина Г.Н., Масленников П.В. Методы анализа витаминов. Калининград: Изд-во КГУ, 2004. – 36с.
13. Чупахин Г.Н., Масленников П.В., Мальцева Е.Ю., Фролов Е.М., Бессережнова М.И. Антиоксидантный статус растений в условиях загрязнения кадмием городской среды. Вестник БФУ им. И. Канта – Калининград: Изд-во БФУ им. И. Канта, 2011, - Вып.7: Естественные науки. – с. 16-22.

PLANTS - ACTIVE ANTIOXIDANTS PRODUCERS AS OBJECTS OF BIOTECHNOLOGY

Choupakhina G.N., Maslennikov P.V., Skrypnik L.N., Choupakhina N.Yu., Malceva E.Yu., Poltavskaya R.L., Feduraev P.V.

antioxidants, plant, biotechnology

It is proved, that one has to search for substance producing plants which are of interest for industrial bio-technology, concerning that the amount of produced valuable compounds does not depend only on plant species, nor It depends on a phase of it's ontogenetic development but it essentially depends on ecological factors, mostly antioxidants, which do influence the biosynthesis.

**ВОЗМОЖНОСТЬ СОХРАНЕНИЯ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ
В КУЛЬТУРУ *IN VITRO***

Шейко Е.А.

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, г. Киев,
01601, Украина, E-mail: lenasheyko@mail.ru*orchidaceae, фитогормоны, культура in vitro, эксплант, каллусогенез***Введение**

Традиционно, приоритетными объектами биотехнологических исследований является изучение различных видов, сортов и гибридов культурных растений. В настоящее время в мире появилась тенденция применения для охраны растительных ресурсов биотехнологических методов, которые базируются на культивировании клеток, тканей и органов растений в контролируемых условиях *in vitro*, при этом все чаще для подобных исследований используют виды дикорастущей флоры. Эти методы становятся составляющей частью общей стратегии сохранения генофонда растений, среди которых развиваются такие направления биотехнологии, как клонирование и размножение редких, исчезающих дикорастущих видов, создание генетических банков на основе пересадочных культур и криобанков. Однако, эти методы пока еще не нашли широкого применения в работе по сохранению биоразнообразия растительных ресурсов умеренной зоны. Главная причина такого положения заключается в недостаточной изученности биологических особенностей таких видов растений, их жизненных репродуктивных стратегий, а также ряда теоретических и методических аспектов, которые связаны с моделированием и регуляцией морфогенетических процессов в культуре тканей и органов *in vitro*. При этом главной проблемой является подбор оптимальных условий для реализации морфогенетического потенциала эксплантов в условиях *in vitro*, экспериментальное моделирование процесса регенерации и получения жизнеспособных растений. Важную роль в индукции деления клеток экспланта, образовании каллуса и морфогенезе играют фитогормоны. Они позволяют регулировать развитие эксплантов *in vitro* путем изменения их концентрации и соотношения. Для большинства растений поиск гормональных компонентов среды имеет случайный характер, когда необходимо проверить широкий диапазон концентраций и комбинаций фитогормонов в питательной среде для стимуляции и активации пролиферации, роста и развития эксплантов в культуре. Поэтому изучение комплекса эндогенных фитогормонов растений позволяет ускорить процесс оптимизации культивирования эксплантов *in vitro*.

Материалы и методы

Материалом для проведения исследований были следующие виды орхидных: *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce), *Himantoglossum caprinum* (M. Bieb.) K. Koch, *Ophrys oestriifera* M. Bieb [1]. Экспедиционными исследованиями было охвачено центральный район главной горной гряды и западный район Южного берега Крыма. В лабораторном эксперименте с культурой тканей экспланты культивировали на стерильных питательных средах: Мурасиге-Скуга (завязи), Нича и Нич (семязачатки и пыльники), Кнудсона С (стебель) [2]. В качестве эксплантов использовали вегетативные и генеративные органы орхидей, которые были отобраны в период вегетации (стебли), в начале цветения (пыльники), и на 25-й день после опыления (завязи, семязачатки). Предварительно проводили поверхностную стерилизацию эксплантов стерилентами, подобранными для каждого типа экспланта, после чего их промывали стерильной дистиллированной водой. Для пыльников использовали двойную стерилизацию 0,8 % $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ и 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ в течение 2 и 1 мин соответственно, для завязей – стерилизацию 80 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1,5 мин) вместе с 15 % H_2O_2 (2 мин), для стерилизации семязачатков – двойную стерилизацию 70 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (2 мин) вместе с 15 % H_2O_2 (3 мин), для получения стерильной культуры из сегментов стебля - 0,1% HgCl_2 с экспозицией 10 мин. Культивирование проводили в фотолуминостане ФСЛ-В (Россия) при 20–25⁰С, 16-часовом фотопериоде с освещением 1000–3000 Лк и 70 % относительной влажности воздуха и в термостате ВТ-120 (Польша) при температуре 25⁰С и отсутствии освещения. Для индукции роста и поддержания культур тканей ис-

пользовали индолилмасляную кислоту (ИМК), 2,4-дихлорфеноксисукусную кислоту (2,4-Д) и 6-бензиламинопурин (6-БАП) в концентрациях от 0,5 мг/л до 3,0 мг/л.

В фиксированных образцах определяли количество индолилуксусной кислоты (ИУК), абсцизовой кислоты (АБК) и цитокининов (ЦТК) [3]. Фракцию гормонов выделяли 80%-ным этанолом, спирт упаривали. Водный остаток промораживали, центрифугировали при 10000 g, супернатант экстрагировали диэтиловым эфиром при pH 2,5 (ИУК и АБК) и бутанолом при pH 8 (ЦТК). Уровни связанных ИУК и АБК оценивали после химического гидролиза. Фракции ИУК и АБК очищали с помощью кислотно-щелочной переэкстракции и ТСХ на пластинах Silufol UV-254 (Kavalier, Чехия) в системе растворителей хлороформ:этилацетат:уксусная кислота (70:30:5). Очистку ЦТК проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке Дауэкс 50Wx8 (H⁺-форма, элюция аммиаком) и ТСХ в системе изопропанол:аммиак:вода (10:1:1). В качестве стандартов использовали препараты фитогормонов фирмы Sigma (США). Окончательный анализ качественного и количественного содержания фитогормонов проводился методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1200 LC с диодно-матричным детектором G 1315 В (США), колонка Eclipse XDB-C 18 2,1×150 мм, размер частиц 5 мм. Элюция проводилась в системе растворителей метанол:вода (37:63). Анализ и обработка хроматограмм проводилась с программным обеспечением Chem Station, версия В.03.01 в режиме *on line*.

Все полученные результаты обрабатывали статистически с помощью компьютерной статистической программы Excel лицензионного пакета Microsoft Office 2007. В таблицах и на рисунках приведены средние арифметические и их статистические ошибки. Достоверность разницы оценивали по критерию Стьюдента, используя 5 % уровень значимости ($P \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Главную роль в индукции деления клеток экспланта, образовании каллуса и морфогенезе играют фитогормоны [4;5;6]. Перед подбором оптимальных концентраций и соотношений фитогормонов в питательной среде для культивирования эксплантов предварительно провели исследования содержания фитогормонов в интактных органах. Исследования по подбору оптимальных концентраций и соотношений фитогормонов в питательной среде показали на примере эксплантов из завязей, что максимальная частота каллусогенеза наблюдается на питательных средах, в которых сохраняется такое же соотношение цитокининов и ауксинов, как и для интактного органа (табл. 1).

Таблица 1 - Зависимость каллусогенеза эксплантов завязей орхидных от соотношения эндогенных и экзогенных цитокининов и ауксинов

Table 1 - Dependence of explants callusogenesis on correlation of endogenous and exogenous cytokinin and IAA

Цитокинины/ауксины		Частота каллусогенеза, %
эндогенные	экзогенные	
<i>Ophrys oestrifera</i>		
1,7	1,7	29,9 ± 1,5
1,7	1,3	1,3 ± 0,1
1,7	0,7	5,4 ± 0,3
1,7	0,5	3,0 ± 0,2
<i>Himantoglossum caprinum</i>		
1,5	1,5	34,6 ± 1,7
1,5	1,3	3,0 ± 0,1
1,5	0,7	3,8 ± 0,2
1,5	0,5	1,9 ± 0,1
<i>Cephalanthera damasonium</i>		
1,5	1,5	23,9 ± 1,1
1,5	1,3	4,0 ± 0,1
1,5	0,7	3,6 ± 0,3
1,5	0,5	0,9 ± 0,01

У *O. oestrifera* максимальная частота каллусогенеза наблюдается при культивировании на питательной среде с добавлением экзогенных цитокининов и ауксинов в соотношении 1,7, что характерно для интактных органов. Для эксплантов завязей *H caprinum* такое соотношение фитогормонов составило 1,5, а для *C. damasonium* – 1,5. При культивировании на питательных средах с другими количественными соотношениями фитогормонов частота каллусогенеза была значительно меньше и не превышала для всех типов эксплантов 10 %.

Результаты работы расширяют представление о роли фитогормонального комплекса вегетативных и генеративных органов растений в процессах роста и развития и могут служить основой для разработки эффективных методов размножения редких орхидных в культуре *in vitro* при помощи экзогенных регуляторов роста. Кроме того, полученные данные указывают на перспективность применения методов микроклонального размножения редких и исчезающих видов растений, в частности орхидей, и могут быть использованы для сохранения генофонда орхидных.

Выводы

Впервые установлена взаимосвязь интенсивности каллусогенеза из эксплантов вегетативных и генеративных органов орхидных и соотношения составляющих фитогормонального комплекса на определенных этапах онтогенеза, что необходимо учитывать при разработке методов микроклонального размножения этих видов.

Показано, что максимальная частота каллусогенеза в определенных условиях культивирования характерна для генеративных органов орхидей, которые отличаются повышенным содержанием цитокининов, индолилуксусной кислоты и низким уровнем абсцизовой кислоты.

Установлено, что максимальная частота каллусогенеза для эксплантов из генеративных и вегетативных органов орхидных наблюдается на питательных средах с подобным соотношением экзогенных и эндогенных фитогормонов.

Литература

1. Червона книга України. Рослинний світ / [за ред. Я.П. Дідуха]. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
2. Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. – К.: Наук. думка, 2008. – 560 с.
3. Методические рекомендации по определению фитогормонов. – К., 1988. – 78 с. – (Препринт, Институт ботаники)
4. Regulation of plant growth by cytokinin / [T. Werner, V. Motyka, M. Strnad, T. Schmölling] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – P. 10487–10492.
5. Role of hormonal regulation of auxin and cytokinin in lateral root development / [E. Benkova, A. Chist, J. Trinkl, G. Jugens] // XV Congress Federation of European Societies of Plant Biology (17–21 July 2006), Lyon, France. – 2006. – P. 117.
6. Van Staden J. Occurrence and potential physiological effects of algae plant growth regulators / J. Van Staden // Intern. Workshop and Training Course on Microalgal Biology and Biotechnology (Mosonmagyaróvár, Hungary, 18–20 June 1999) – Hungary, 1999. – P. 40.

A POSSIBILITY OF CONSERVATION OF RARE PLANT SPECIES IN CULTURE *IN VITRO*

Sheyko E.A., Musatenko L.I.

Orchidaceae, phytohormones, culture in vitro, explants, callusogenesis

It is the first time when there has been found the interrelation of tylosis genesis intensity of orchid vegetative and generative organs explants and the content and ratio of the phytohormonal complex components at the specified stages of ontogenesis that must be taken into account in the elaboration of methods of this species microclonal reproduction.

ТЕХНОЛОГИЯ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЕННОГО МАТЕРИАЛА ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ИХ ПРОДУКТИВНОСТИ В УСЛОВИЯХ СЕВЕРА

Шерудило Е.Г.¹, Матвеева Е.М.¹, Котова З.П.²

¹ФГБУН Институт биологии КарНЦ РАН, ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, 185910, Россия, E-mail: sherudil@krc.karelia.ru

²ГНУ Карельская государственная сельскохозяйственная опытная станция РАСХН, ул. Центральная, 12, п. Новая Вилга Прионежского р-на, 185506, Россия

сельскохозяйственные культуры, продуктивность, устойчивость, низкие температуры

Введение

Получение стабильных урожаев сельскохозяйственных культур в условиях неблагоприятного климата на Северо-западе России, характеризующегося резкими колебаниями температур в суточном цикле, особенно в ранне-весенний период, является составной частью продовольственной безопасности России. Решение этой задачи возможно с применением новой технологии выращивания овощных культур, основанной на использовании физического фактора (температура) в небольших модификациях в зависимости от экологических характеристик и предпочтений сельскохозяйственных культур и учитывающей климатические условия региона.

Предлагаемая технология включает обработку посевного материала перед посадкой низкими закаливающими температурами в течение 2 ч продолжительностью 4–6 дней и основана на ДРОП–эффекте (от англ. drop–падение) – воздействии на растения кратковременных (часовых) повторяющихся в суточном цикле снижениях температуры до области закаливающих температур для каждой культуры [1]. Кратковременные снижения температуры не только увеличивают устойчивость растений к действию низких температур, но и оказывают положительное влияние на их биологическую продуктивность [1] и скорость развития [2]. Важным является факт сохранения растениями в последствии ДРОП-обработки повышенного уровня устойчивости к низким температурам, а также быстрая индукция устойчивости при повторном действии фактора [3]. ДРОП-обработка клубней картофеля и меристемных растений повышала не только холодоустойчивость и продуктивность растений, но и их устойчивость к узкоспециализированному паразиту культуры - картофельной цистообразующей нематоды [4, 5]. Параметры ДРОП-технологии для картофеля запатентованы [6, 7].

Целью настоящих исследований была разработка технологических приемов предпосевной обработки семян ряда овощных культур, способствующей увеличению продуктивности за счет уменьшения потерь от заболеваний и стрессовых условий.

Материал и методы

Опыты проводили со следующими видами сельскохозяйственных культур: лук (*Allium cepa* L.), редис (*Raphanus sativus*), свекла (*Beta vulgaris*). Низкотемпературной обработке подвергали семена (редис, свекла) и луковицы (лук-севок).

Режим низкотемпературной обработки варьировал по продолжительности действия в зависимости от видовых особенностей растений. Величину температуры определили с учетом ее закаливающего эффекта [8, 9], для выбранных культур она составила 10°C. ДРОП-обработку проводили в темноте, ее продолжительность составляла 2 ч ежедневно в течение от 1 до 4 сут. для семян редиса, 5 сут. для семян свеклы и 6 сут. для лука-севка.

В ходе исследований анализировали показатели роста и развития растений, продуктивность овощных культур.

Результаты и обсуждение

Исследование влияния низкотемпературных обработок (ДРОП) на развитие и продуктивность растений в полевых условиях показали, что в первую неделю всходы варианта ДРОП опережали по росту контрольные, но спустя 10-14 дней разница в габитусе растений между вариантами нивелировалась. Однако к концу сезона растения, прошедшие ДРОП-обработку, характеризовались повышенным урожаем и увеличенной средней массой корнеплодов (табл. 1). Самые высокие значения повышения общего урожая и средней массы одного корнеплода отмечены для свеклы (238 и 198%, соответственно), самые низкие показатели определены для редиса при продолжительной (до 4-х суток) ДРОП-обработке - 119 и 101%, соответственно. ДРОП-обработка лука-севка положительно влияла на сохранность растений в период вегетации и их продуктивность. Урожай луковок в последствии холодной обработки был на 40% выше, чем в контроле, масса одной луковки – на 11 %.

Таблица 1 - Влияние предпосевной ДРОП-обработки семенного материала на продуктивность различных овощных культур

Table 1 - Effect of a seed pre-sowing treatment on yield of vegetables

Культура	Урожай, % к контролю	Средняя масса 1 корнеплода, % к контролю
Свекла	238	198
Лук - севок	140	111
Редис, семена	126	127
Редис, проросшие семена→рассада	119	101

Установлена видоспецифичность эффектов предпосевной ДРОП-обработки овощных культур, основанная на биологических особенностях культур. Так, для свеклы и лука севка ДРОП-обработка в течение 5-6 сут. показала высокое стимулирующее действие. Для семян редиса достаточно эффективной оказалась уже однократная (в течение 1 сут) предобработка низкой температурой, ускорявшая развитие растений и повышающая общий урожай и среднюю массу корнеплода на 26-27%. Интенсивное прорастание семян редиса в ходе 4-суточной ДРОП-обработки затруднило их посев в грунт, сказалось на приживаемости рассады, что и определило незначительное повышение продуктивности культуры (табл. 1). Таким образом, при выборе технологических приемов предпосевной обработки семян необходимо учитывать скороспелость растений для достижения оптимального эффекта обработки.

Заключение

Эффективность использования ДРОП-технологии зависит от вида и биологических особенностей сельскохозяйственной культуры. Влияние предпосевной температурной обработки на всхожесть семян и последующее развитие растений исследованных культур выражается в более активном прорастании семян и раннем (на 2- 3 суток) появлении всходов. Установлено положительное влияние ДРОП-обработок на продуктивность и качество урожая овощных культур.

Дальнейшие исследования влияния ДРОП-обработки на развитие и продуктивность сельскохозяйственных культур необходимо провести с расширением круга овощных культур и проведением температурных обработок на различном посевном материале (включая рассаду) для сравнения эффективности применения технологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России...» (№ г.р. 01201262103) .

Литература

1. Марковская Е.Ф., Сысоева М.И. Роль суточного температурного градиента в онтогенезе растений. М.: Наука, 2004. 119 с.
2. Сысоева М.И., Слободяник И.И., Шерудило Е.Г., Василевская Н.В. Влияние ежесуточных кратковременных снижений температуры на процессы органогенеза у *Cucumis*

sativus L. в условиях разных фотопериодов // Известия РАН. Сер. биол. 2007. № 6. С. 765-767.

3. Марковская Е.Ф., Сысоева М.И., Шерудило Е.Г. Кратковременная гипотермия и растение/Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2013. 194 с.

4. Лаврова В.В., Матвеева Е.М., Сысоева М.И. Эффект предпосадочной низкотемпературной обработки клубней картофеля в условиях заражения картофельной цистообразующей нематодой // Сельскохозяйственная биология. 2014. № 1. С. 98-102.

5. Лаврова В.В., Сысоева М.И., Матвеева Е.М., Шерудило Е.Г., Котова З.П. Способ микроклонального размножения растений для получения устойчивых к заражению нематодой и действию низких температур растений картофеля // Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений». Москва, Россия, 2-6 июня 2013 г. М., 2013. С. 205.

6. Сысоева М.И., Матвеева Е.М., Шерудило Е.Г., Марковская Е.Ф. Способ предпосадочной обработки клубней семенного картофеля // Бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. 2009. №4. 5 с.

7. Матвеева Е.М., Сысоева М.И., Шерудило Е.Г., Котова З.П., Лаврова В.В. Способ микроклонального размножения картофеля // Бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. 2013. №20. 5 с.

8. Дроздов С. Н., Курец В. К., Титов А. Ф. Терморезистентность активно вегетирующих растений. Л.: Наука, 1984. 168 с.

9. Марковская Е.Ф., Сысоева М.И., Харькина Т.Г., Шерудило Е.Г. Влияние кратковременного снижения ночной температуры на рост и холодостойкость растений огурца // Физиология растений. 2000. Т. 47, № 4. С. 511-515.

TECHNOLOGY OF PRE-SOWING SEED TREATMENT OF VEGETABLES TO INCREASE CROP PRODUCTIVITY IN THE NORTH

Sherudilo E.G., Matveeva E.M., Kotova Z.P

vegetables, productivity, low temperatures

New technology of pre-sowing seed treatments of vegetables is suggested for increasing of crop productivity. It was shown that temperature DROP-treatment stimulated germinating capacity and plant development, increased crop productivity.

ИЗМЕНЕНИЯ В ОБРАЗОВАНИИ АНТОЦИАНОВ В ЦВЕТКАХ ПЕТУНИИ СОРТА «SNOW BALL» ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ МУТАГЕНОВ

Широкова А.В.¹, Лапшин П.В.², Костяновский Р.Г.³, Крутиус О.Н.², Загоскина Н.В.²

¹ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, г. Москва, 119071, Россия, E-mail: glandularia@yahoo.com

²ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, г. Москва, 127276, Россия

³ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, ул. Косыгина 4, г. Москва, 119991, Россия

петунья, цветки, мутагеназ, антоцианы

Введение

Окраска цветка – один из самых важных признаков для декоративных однолетников, обеспечивающих успешное их использование в озеленении. В большинстве семейств высших растений она в значительной степени зависит от образования таких пигментов фенольной природы, как антоцианы (АН), относящиеся к обширному классу флавоноидов [1, 2]. Они имеют несложную химическую структуру и хорошо изучены: это пеларгонидин, цианидин и дельфинидин [3]. Все эти соединения являются антоцианидинами и различаются только числом гидроксильных групп в кольце Б (1,2 или 3). Кроме того, в растительных тканях широко распространены еще три пигмента, образующиеся путем метилирования АН: пеонидин, петунидин и мальвидин. Баланс и комбинации различных АН и приводят к формированию окраски цветков – от бледно-розовой до темно-фиолетовой.

Одним из подходов для получения новых сортов растений с измененной и более разнообразной окраской цветка является использование химических соединений - мутагенов, к числу которых относятся нитрозометилмочевина, нитрозоэтилмочевина, этиленимин, диэтил- и диметилсульфат (ДЭС и ДМС, соответственно), и другие [4]. Индуцированный мутагенез успешно использовали для улучшения свойств сельскохозяйственных и декоративных культур [5]. Следует также подчеркнуть, что наиболее изменчивым признаком при действии мутагенов оказывается окраска цветка [6].

Одним из широко распространенных декоративных растений с яркой окраской цветков является петунья гибридная (*Petunia hybrida hort.*), которая используется в декоративном озеленении во всем мире.

Целью нашей работы было изучение действия различных мутагенов (ДЭС, ДМС, ЭМС) на изменчивость окраски цветков растений петунии поколения М₄ и накопления в них АН.

Объект и методы исследования

Семена *P. hybrida hort.* сорта «Snow Ball» выдерживали в водных растворах ДЭС (0,05 % или 0.0025 %), ЭМС (0,02 %; 0,03 % и 0.04 %) или ДМС (0,02 %; 0,04 % и 0,08 %), проращивали в перлите. Рассаду высаживали на участок Кропотовский биостанции ИБР РАН. Для исследований использовали растения поколения М₄.

В период цветения фиксировали целые отгибы венчиков или их части в стандартной смеси 97% этанола и концентрированной соляной кислоты (99:1). Через 2 недели надосадочную жидкость отделяли и использовали для определения содержания АН [7].

Результаты и обсуждение

Действие мутагенов вызывало широкий спектр изменений в окраске цветков петунии. Так, если у исходного сорта они были белыми, то у мутантных растений – от фиолетового до сиреневого и от лососево-розового до бледно-розового. Следовательно, химические мутагены вызвали изменения в биосинтезе АН, что привело к накоплению в цветках различных производных петунидина, мальвидина, дельфинидина, пеонидина и цианидина.

Определение содержания АН показало, что более выраженные изменения в их накоплении отмечены при действии ЭМС (0,02%) и ДМС (0,08%). При этом в ряде случаев высокий их уровень был в молодых, только что раскрывшихся цветках, после чего – снижался. В других же случаях он сохранялся без изменений в течение всего периода их цветения.

Были отмечены и формы с двойной окраской цветков: фиолетово-синяя с темно-розовым центром, синяя с сиренево-розовым центром и др. В этом случае накопление АН было значительно ниже в центральной части отгиба. Так, в фиолетовой части цветка количество АН достигало 12,5 мг/ сырой массы, тогда как в темно-розовой – 5,5 мг/г сырой массы. Все это свидетельствует о значительных отличиях в биосинтезе АН в различных частях цветка, что, по-видимому, является следствием действия мутагенов на гены фенольного метаболизма, в том числе ответственных за образование этих окрашенных пигментов фенольной природы.

Литература

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука, 1993 289 с.
2. Brouillard R., Chassaing S., Isorez G., Kueny-Stotz M., Figueiredo P. The visible flavonoids or anthocyanins: from research to applications // *Recent Advances in Polyphenol Research*. Wiley-Blackwell, UK, 2010. V. 2. P. 1-22.
3. Andersen O.M., Jordheim V. The anthocyanins // *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications* (eds O.M. Andersen, K.M. Markham)/ CRC Press: Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2006. P. 471-551.
4. Рапопорт И.А. Открытие химического мутагенеза. М.: Наука, 1993. 304 с.
5. Химические супермутагены в селекции. М.: Наука, 1975. 400 с.
6. Эффективность химических мутагенов в селекции. М.: Наука, 1976.
7. Клышев Л.К., Бандюкова В.А., Алюкина Л.С. Флавоноиды растений (распространение, физико-химические свойства, методы исследования). Алма-Ата: Наука, 1978. 220 с.

CHANGES IN THE FORMATION OF ANTHOCYANINS IN FLOWER *PETUNIA* VARIETY «SNOW BALL» AFTER ACTION OF MUTAGENS

Shirokova A.V., Lapshin P.V., Kostyanovsky R.G., Krutius O.N., Zagoskina N.V.

Petunia, flowers, mutagenaz, anthocyanins

Studied the effect of different mutagens (DES, DMS, EMS) on the variability of color flowers of *Petunia* plants M₄ generation and accumulation in anthocyanins. Action of mutagens cause a wide range of changes in the color of flowers. At the initial variety, they were white, the mutant plants - from purple to lilac and from salmon pink to pale pink. Content of anthocyanins in flowers also significantly increased.

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ ЯЧМЕНЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ТОКСИЧНЫМ МЕТАЛЛАМ И ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

Шуплецова О.Н., Широких И.Г.

ГНУ Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока РАСХН,
ул. Ленина, 166 а, г. Киров, 610007, Россия, E-mail: olga.shuplecova@mail.ru*ячмень, каллусная ткань, ионная токсикация, осмотический стресс, селективные схемы, регенеранты***Введение**

Лимитирующим фактором урожайности ячменя на доминирующих дерново-подзолистых и подзолистых почвах Нечерноземья является почвенная кислотность, негативное влияние которой усиливается наличием в них подвижных ионов алюминия Al^{3+} и марганца Mn^{2+} [1, 2]. В последнее время, вследствие усиления техногенного влияния, в почвах сельскохозяйственного назначения повышается содержание тяжелых металлов, в частности, содержание ионов кадмия Cd^{2+} значительно превышает безопасные пределы [3]. Неблагоприятные для растений последствия почвенной ионной токсичности усугубляются в условиях неравномерного, в течение вегетационного периода, выпадения осадков, на фоне повышения среднемесячных температур. Усиление стрессового давления окружающей среды расширяет спектр стрессовых поражений растений [4]. В свете прогнозируемого ухудшения климата особую актуальность приобретает целенаправленное создание сортов с высокими адаптивными реакциями, обеспечивающими комплексную устойчивость к ионной токсикации и дефициту влаги (осмотическому стрессу). В числе мер, обеспечивающих устойчивость зерновых культур к неблагоприятным абиотическим, в том числе техногенным воздействиям, основная роль принадлежит селекции, в т.ч. перспективно использование биотехнологических методов. Благодаря соматоклональной изменчивости, возникающей в культурах клеток и ткани *in vitro*, возможно получение генотипов с измененными свойствами, отбор которых в селективных системах и последующая регенерация растений позволяют создать перспективный для адаптивной селекции материал. Настоящая работа имеет своей целью создание генотипов ячменя с комплексной устойчивостью к ионной токсикации и осмотическому стрессу для последующего включения этих форм в практическую селекцию.

Материалы и методы

В качестве исходных генотипов для введения в культуру ткани использовали генотипы ячменя (*Hordeum vulgare* L.). Индукцию каллусогенеза и регенерацию растений проводили, как описано ранее [5]. Каллусную культуру получали на среде Мурасиге и Скуга (МС) без введения селективных агентов. На этапах пролиферации и морфогенеза для создания селективных условий исследуемые металлы вносили в питательные среды в виде сульфатных солей: $3CdSO_4 \times 8H_2O$ (0 – 35 мг/л Cd^{2+}); $MnSO_4 \times 5H_2O$ (0 – 400 мг/л Mn^{2+}); $Al_2(SO_4)_3 \times 18H_2O$ (20 – 30 мг/л Al^{3+}). Кислотность среды устанавливали на уровне pH 4,5. Для моделирования водного дефицита в питательную среду в качестве осмотика вносили 10 % полиэтиленгликоля (ПЭГ). Сравнивали различные схемы отбора, включающие в себя последовательное и/или одновременное воздействие селективных агентов на этапах пролиферации и морфогенеза каллусных культур. Контролем служили каллусные линии, культивируемые на средах с реакцией, близкой к нейтральной (pH 6,0), без добавления селективных агентов. О приемлемости для клеточной селекции той или иной селективной схемы судили по средним значениям выживаемости каллуса и частоте регенерации растений.

Результаты и обсуждение

При анализе дозовых кривых было выявлено, что каллус ячменя, в среднем для трех генотипов (Новичок, Купец, Белгородский-100, в порядке снижения кислотоустойчивости), наиболее устойчив к ионам марганца и высоко чувствителен к ионам кадмия. Летальные дозы и LD_{50} для марганца (350 и 250 мг/л соответственно) и кадмия (30 и 10 мг/л соответственно) отличались более чем на порядок, тогда как для алюминия критические концентрации занимали промежуточное положение и были близки к кадмию, составив соответственно 42 и 20 мг/л.

Между частотой регенерации растений в каллусных культурах, подвергнутых селективному воздействию, и концентрацией ионов металла в селективной среде не выявлено прямой зависимости. По сравнению с контролем частота регенерации изменялась волнообразно, в результате чего дозовые кривые для показателя частоты регенерации во всех случаях имели конфигурацию, близкую к синусоидальной. В индивидуальном для каждого из исследуемых металлов диапазоне концентраций, регенерационная способность каллусных культур превышала контрольное значение. Наличие нескольких максимумов на кривой, отражающей регенерационную способность, по-видимому, обусловлено различными механизмами токсического действия металлов в градиенте концентраций, а также функционированием различных генетических систем, определяющих морфогенетическую реакцию ячменя в стрессовых условиях.

Руководствуясь полученными данными по выживаемости и морфогенетической активности каллуса ячменя в присутствии ионов металлов, для отбора устойчивых каллусных линий в дальнейшем использовали рабочие концентрации, равные для кадмия – 10 и 20, для марганца – 200 и 250, для алюминия 20 и 30 мг/л.

В задачи следующего этапа исследований входило выявление кратности и последовательности введения в селективные среды ионов металлов и осмотика по отдельности и в комбинациях, а также определение оптимального для селективного воздействия этапа развития каллусной ткани. Рассматривали различные схемы отбора, скомпонованные в три блока, в зависимости от состава селективных агентов: среды с добавлением ионов Cd^{2+} и Al^{3+} ; среды с добавлением ионов Mn^{2+} и Al^{3+} и среды с добавлением ПЭГ и ионов металлов. Сравнивали реакцию пяти генотипов ячменя *in vitro* при введении селективного агента на различных стадиях развития каллусной ткани – пролиферации и морфогенеза, а также при прямом и обратном воздействии селективными агентами и, в отдельных случаях, постепенном увеличении дозы токсиканта.

В результате исследований были выявлены оптимальные схемы отбора линий, устойчивых к комплексной ионной токсикации. Рекомендуется вводить в селективные среды ионы кадмия (20 мг/л) на этапе пролиферации, а ионы марганца (200 мг/л) – на этапе морфогенеза. Ионы алюминия (20-30 мг/л) можно вводить на том и другом этапах развития каллусной ткани, без существенного снижения выживаемости каллуса и частоты регенерации растений. Для отбора каллусов с комплексной устойчивостью к ионной токсикации и осмотическому стрессу целесообразно вводить осмотик (10% ПЭГ) исключительно на этапе морфогенеза, а на этапе пролиферации возможно воздействие на каллус ионами алюминия (20 мг/л) в сочетании с 20 мг/л ионов кадмия или с 200 мг/л марганца.

Всего в ходе проделанной работы на селективных средах с ионами Cd^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} и ПЭГ в различных сочетаниях получено более 50 растений - регенерантов ячменя. По результатам физиологической оценки их семенного потомства выделившиеся соматоклональные формы переданы в практическую селекцию для изучения в полевых условиях по стандартной схеме селекционного процесса.

Литература

1. Родина, Н.А. Селекция ячменя на Северо-Востоке Нечерноземья / Н.А. Родина. - Киров: Зональный НИИСХ Северо-Востока, 2006. - 488 с.

2. Алексеев, Ю.В. Тяжелые металлы в агроландшафте / Ю.В. Алексеев.- СПб., 2008.- 216с.
3. Шихова Л.Н. Тяжелые металлы в почвах и растениях Северо-Востока европейской части России / Л.Н. Шихова, Т.Л. Егошина.- Киров: Зональный НИИСХ Северо-Востока, 2004.-264с.
4. Сергеева, Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов: новые аспекты комплексной устойчивости /Л.Е. Сергеева, Л.И. Бронникова // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: Тез. докл. X междунар. конф. - Казань: КИББ КазНЦ , 2013.- С. 82-83.
5. Широких, И.Г. Получение *in vitro* форм ячменя, устойчивых к токсическому действию алюминия в кислых почвах /И.Г. Широких, О.Н. Шуплецова, И.Н. Щенникова // Биотехнология. - 2009. - №3. - С.40-48.

**CELL SELECTION OF BARLEY TO RESISTANCE
AGAINST TOXIC METALS AND OSMOTIC STRESS**

Shupletsova O.N., Shirokikh I.G.

barley, callus tissue, ion intoxication, osmotic stress, selective scheme, regenerated plants

Selective scheme proposed for the selection of *in vitro* resistant barley lines to the ion intoxication and osmotic stress. For use as a raw material in practical breeding transferred 50 regenerated plants.

**INFLUENCE OF THREE MODIFICATIONS OF NATURAL GROWTH REGULATOR
REGLALG ON CUCCUMBER SEEDS GERMINATION AND SEEDLINGTH GROWTH**

Caus M., Dascaluic A.

Institute of Genetics, Plant Physiology & Protection, Moldovan Academy of Sciences,
Padurii str., 20, MD-2002, Chisinau, Republic of Moldova*modifications of natural growth regulator Reglalg, cucumber, biomass, antioxidant activity, phenolic compounds***Introduction**

Phenolic compounds represent the most common secondary metabolites, the formation of which is almost characteristic for all plant cell compartments [2]. They are involved in a wide variety of physiological processes, participating in regulation of plant growth, development and reproduction. Phenolic substances in plant cells are synthesized during normal vegetative growth and as well in stress conditions [7, 3]. It is known that in periods of active plants growth, including during seeds germination, in cells appears the *reactive oxygen species (ROS)* [1]. An excess of *ROS* leads to the development of oxidative stress in plant tissues, which is quite harmful to them. As response to oxidative stress, for annihilating *ROS* and excess free radicals, the antioxidant system is induced. The important components of this system are phenolic compounds. The antioxidant capacity in plant tissues is often correlated with their content [3]. Changes in the level of phenolic compounds in cell compartments represent the characteristic reaction of higher plants to the action of stress factors. It is established that in plants with the higher ability to adapt to stress factors a more significant content of phenolic compounds is accumulated. In this context a special interest represents the elucidation of the possible links between changes in the content of phenolic compounds, antioxidant activity of *natural growth regulators (NGR)* and their beneficial effects on seeds germination and seedling development [5, 6]. Among the *NGR*, used in agricultural practice, a special attention is given those extracted from plants. Their biological effects may vary due to the different composition of active compounds. The purpose of this study was to investigate the biological effects of different modifications of *NGR Reglalg*, applied to cucumber seeds before germination.

Materials and Methods

Seeds of *Cucumis sativus* L., cv. Concurrent, were treated with three modifications of *NGR Reglalg*, extracted from green algae *Spirogyra* sp. in the spring (*R1*), summer (*R2*), and autumn (*R3*). Germination of seeds was provided in the dark germination chamber, at 25°C, and 80 % relative humidity. The three days old seedlings were collected and used for biomass evaluation, total phenolic compounds and total antioxidant capacity of roots extracts determination.

The total content of phenolic compounds (TCP) was determined by the method [8], using the Folin-Ciocalteu reagent. The *TPC* in fresh root biomass was expressed as *gallic acid equivalents (GAE)* in g⁻¹ FW.

The total antioxidant capacity (TAC) in root extracts was measured spectrophotometrically according to the method [4] and expressed as *ascorbic acid equivalents (AAE)* in g⁻¹ FW.

Statistic analysis. Each experiment was performed three times in triplicate. The arithmetic means and their standard deviations (SD) were calculated.

Results and Discussion

After 24 hours of incubation 100% of control and treated with *Reglalg* seeds were germinated. All three modifications of *Reglalg* exerted beneficial effects on seedlings biomass accumulation, but the influence of modification *R2* was more pronounced than other two.

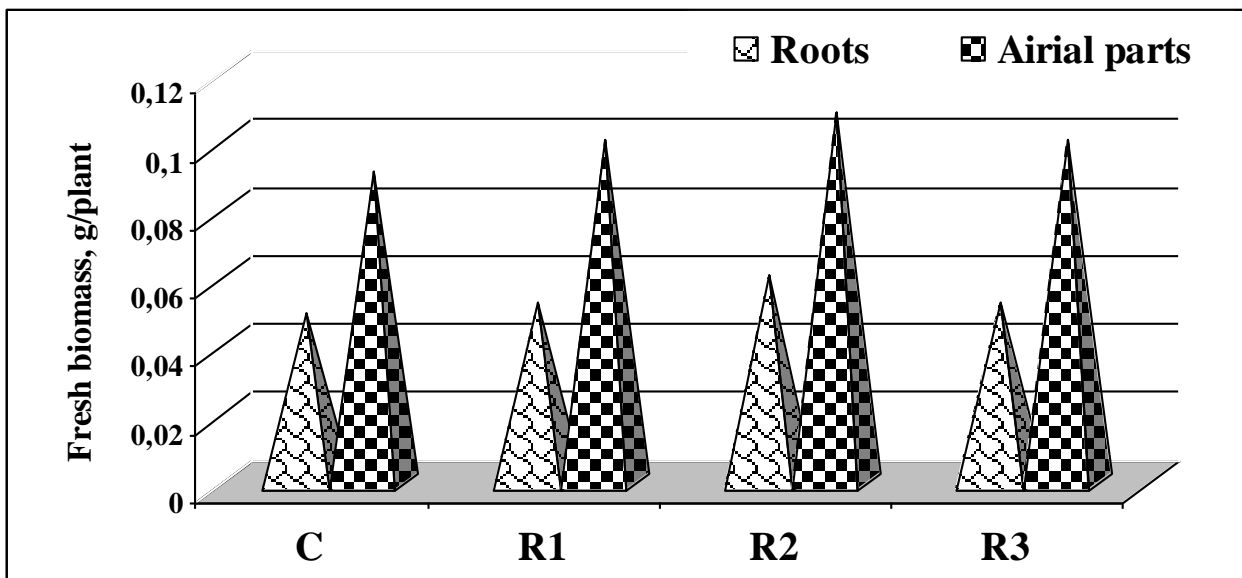


Figure 1 - Biomass accumulation by three days cucumber seedlings, cv. Concurrent, obtained from control seeds (C) and those treated with solutions of three modifications of *Reglalg* (R1, R2, and R3), diluted with water in ratio 1/200.

Data presented in figure 2 show that only modification R1 has influenced significantly TPC in cucumber roots. The values of TAC were statistically identically in control and all three experimental variants of *Reglalg* (figure 2). It is interesting to point that antioxidative activity of modifications of *Reglalg* is increasing in sequence R3>R2>R1.

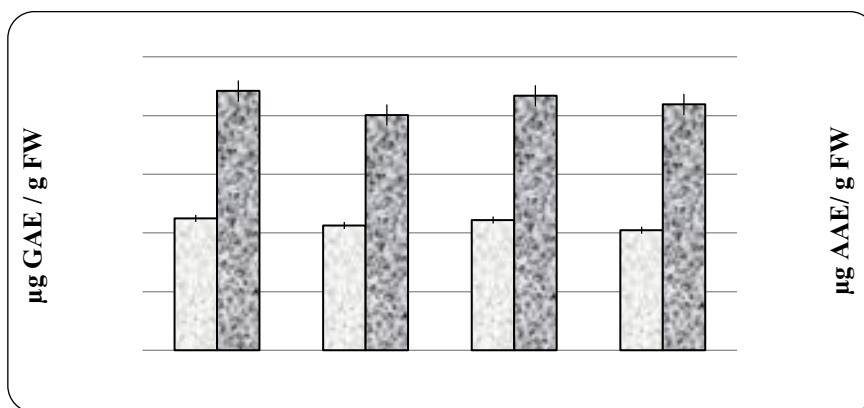


Figure 2 - Total phenolic content (TPC) and total antioxidant capacity (TAC) determined in extracts from roots of 3 days cucumber seedlings, obtained from control seeds (C) and those treated with solutions of three modifications of *Reglalg* (R1, R2, and R3), diluted with water in ratio 1/200.

Summarizing the results, we draw the following conclusions:

All three modifications of the *NGR Reglalg* favourably influenced the growth of seedlings derived from cucumber seeds treated with these modifications of *Reglalg*.

The beneficial effects of *Reglalg* did not correlated with antioxidant activity of its modifications, or of antioxidant activity of extracts obtained from roots of treated plants.

References

1. Bailly C., El-Maarouf-Bouteau H., Corbineau F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology // C. R. Biol., 2008, vol. 331, p. 806–814.

2. Boudet A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds // *Phytochemistry*, 2007, vol.68, p.2722-2735.
3. Chon S.U. Total polyphenols and bioactivity of seeds and sprouts in several legumes // *Curr. Pharm. Des.*, 2013, vol. 19, (34), p.6112-24.
4. Muanda F., Kone D., Dicko A. et al. Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian medicinal plant parts // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, Article ID 674320, 8 pages, doi:10.1093/ecam/nep109.
5. Nerson H. Seed production and germinability of Cucurbit crops // *Seed Science & Biotechnology*, 2007, vol. 1, (1), p. 1-10.
6. Ozgur M. Growth control in cucumber seedlings by growth regulators application // *Bulgarian J. of Agricultural Science*, 2011, vol.17, (1), p.99-106.
7. Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants // *Toxicology*, 2002, vol.177, p.67–80.
8. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent // *Methods Enzymology*, 1999, vol. 299, p.152-178.

PROTEIN IN LONG-TERM STORAGE OF FABA BEAN (*VICIA FABA* L.)Dobiesz M.¹, Rydzyński D.¹, Margas M.¹, Ziółkowska A.¹, Adomas B.², Piotrowicz-Cieślak A.I.¹¹Department of Plant Physiology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury, Oczapowskiego 1A, Olsztyn, 10-722, Poland, E-mail: acieslak@uwm.edu.pl²Department of Environmental Toxicology, Faculty of Environmental Management and Agriculture, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Prawocheńskiego 24, Olsztyn, 10-718, Poland*faba bean, storage, 2D-electrophoresis***Introduction**

The faba bean (*Vicia faba* L.) belongs to the section *Faba* of the genus *Vicia* under *Papilionaceae* of *Leguminosae*. There are four subspecies of this bean differentiated on the basis of size, color and seed-shape: *minor*, *equina*, *major* and *paucijuga* [1, 2, 3, 4]. The faba bean is a cultigen separated from all related wild taxa by strong reproductive barriers. It is thought that this European, Asian and African legume has been cultivated since ancient times, from the Indian Peninsula to the Western Mediterranean area. There is no overall concord regarding its domestication center and its wild variety is unknown [2, 3].

Due to a high protein content and a symbiotic relationship with *Rhizobium* bacteria the faba bean is very important for agriculture [5]. Although it is consumed in smaller amounts in the countries of Western Europe as human food, it is considered to be one of the main sources of easily accessible protein and energy in Africa, India, Pakistan, China and Latin America, where most of the population cannot afford protein of animal origin. The significance of this plant has still been growing in the Saudi diet, due to the large lysine content of the seed, which encourages people to use this plant as a protein supplement derived from cereals [7]. The faba bean prevents erosion of the soil, and it is praised for its good agricultural properties, because it is customarily used as a cover cultivation to recover nitrogen content [8].

An average protein content in the faba bean seeds is about 27-28% and depends on genotypes. There are also genotypes with 35% or higher protein content [1, 6]. The faba bean seed proteins are composed of two basic fractions, globulins (79%) and albumins (7%). Globulins consist of legumin, vicilin and convicilin. Albumins are rich in sulfur amino acids and lysine. Moreover, the seeds contain several relatively small proteins, which are relevant to their nutritional quality, including lectins, trypsin inhibitors, urease and lipoxygenase [6, 7].

Albumins were firstly discovered in 1924 by Osborn, who classified them as water soluble proteins. Albumins 2S contained in seeds perform the storage protein function. They are a valuable source of sulfur and nitrogen for developing embryos due to methionine and cysteine contents. They protect seeds of plants against pathogens, as well as inhibiting the growth of fungi and bacteria. 2S albumin molecules are generally composed of two subunits: a smaller and a larger one. Furthermore, they have a characteristic secondary structure, unusual for other proteins [9].

In the current study, the authors analyzed protein contents, 2S protein content, 2D-electrophoresis profile after 27 years of storage at -14°C and 20°C.

Material and Methods

The study material comprised faba bean (*Vicia faba* L.) seeds, Nadwiślański and Dino varieties. Seeds were stored in hermetically sealed glass 'twist' jars at -14°C and 0°C, and in laboratory conditions (temp. about +20°C, linen sacks) for 27 years. At the beginning of the experiment (in 1986) seeds contained 8.8% ± 0.2 of water assayed with the gravimetric method. After 27 years of storage, vigour and viability of seeds (ISTA 1999) and proteins were determined.

Proteins were isolated from seeds with 5mM N-ethylmaleimide and their content was assayed with the Bradford method (1976). The protein extract was subjected to desalination in Zeba™ Desalt Spin Columns, by Thermo. 125 ml of 20 % protein solution was applied on readystrip™ IPG Strips (7

cm, pH 4-7), by BIO – RAD. Rehydration and isoelectric focusing (IEF) were next performed, with the following separation parameters: 250 V for 15 minutes, then 4 000 V for 2 hours and 4 000 V for 10 volt-hours. Strips were dried and rinsed in water and were used for 2-D – SDS – PAGE, at 200V for 40 minutes (readyprep™ 2-D Starter Kit – Instruction Manual, BIO – RAD, 2011). Electrophoresis was performed using vertical electrophoresis gel apparatus (Bio-Rad Instrument). After electrophoresis, the gel was stained, photographed and analyzed with PDQuest (BIO-RAD).

Results

Faba bean seeds stored at -14°C germinated better in comparison to seeds kept at $+20^{\circ}\text{C}$. Seeds stored at -14°C germinated in 95,6%, while those stored at 20°C did not germinate.

For seeds stored at -14°C , the content of 2S proteins was similar and amounted to 2.2% for two varieties (Nadwiślański and Dino). The content of these proteins was lower in seeds stored at $+20^{\circ}\text{C}$ and amounted to about 1.3%. To render 2D IEF / SDS-PAGE maps protein extracts from seeds stored since 1987 were used (Fig. 1). The map shows four figures for seeds stored at -14°C and $+20^{\circ}\text{C}$, respectively for the two varieties of the faba bean. For both seeds cultivars there were considerable differences between maps rendered for proteins stored at -14°C and $+20^{\circ}\text{C}$, which suggests that storing conditions have a great influence on the seed protein make-up. The images of gels were converted in the PDQuest program.

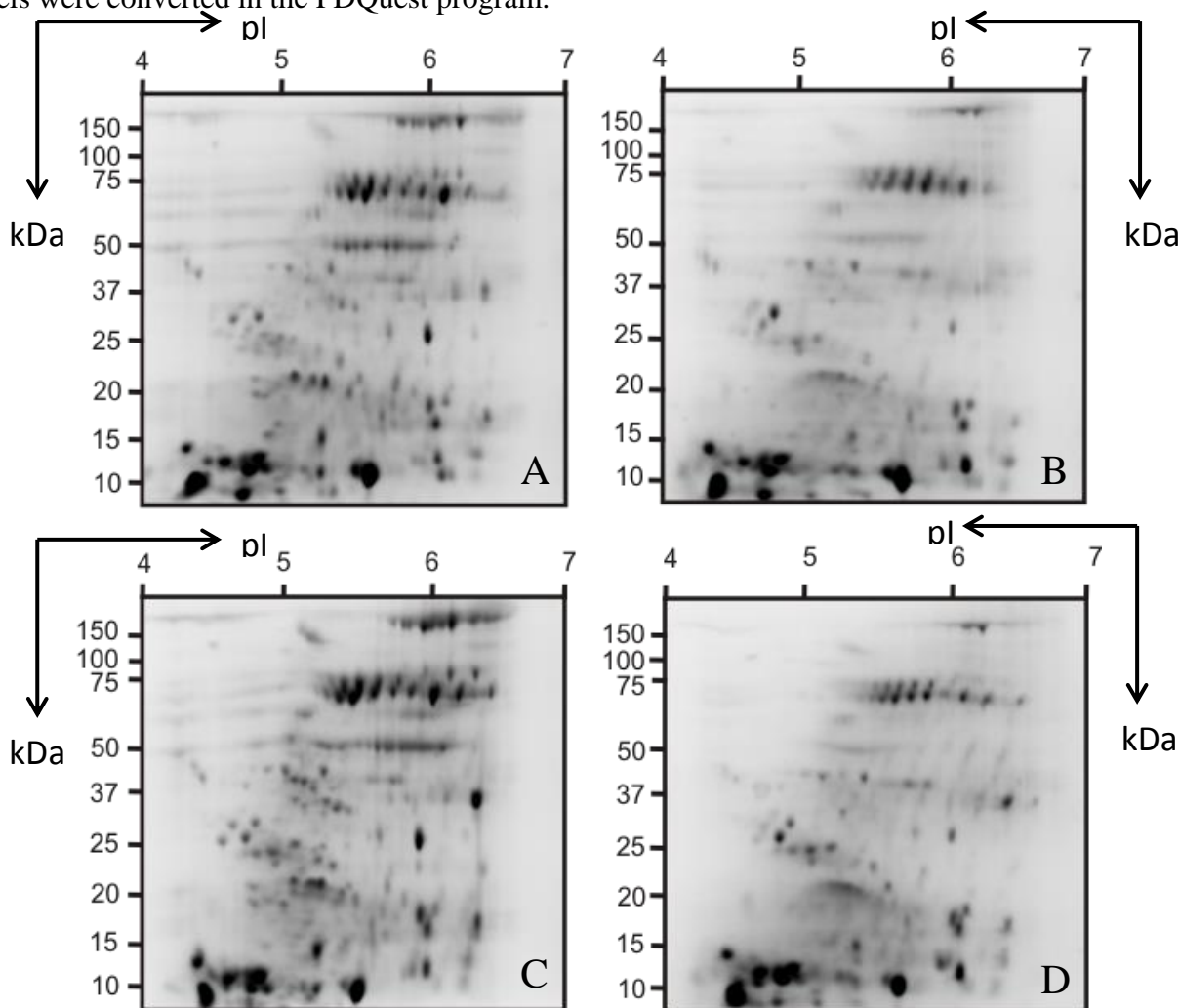


Figure 1 - Two-dimensional electrophoretograms of the faba bean extracted using 5mM N-ethylmaleimide. The seeds were stored at different temperatures (-14°C and $+20^{\circ}\text{C}$) during a 27-year period. A- map for seeds stored at -14°C of the Nadwiślański variety, B- map for seeds stored at $+20^{\circ}\text{C}$ of the Nadwiślański variety, C- map for seeds stored at -14°C of the Dino variety, D- map for seeds stored at $+20^{\circ}\text{C}$ of the Dino variety

The map rendered for seeds stored in -14°C contained 189 spots for the Nadwiślański variety and 195 spots for the Dino variety, while the map created for seeds stored in $+20^{\circ}\text{C}$ was significantly different and contained 114 and 111 spots, respectively for the Nadwiślański and Dino variety. There were 51 common spots in seeds stored at different temperatures and different cultivars. In the maps created for seeds stored in different temperatures, but the same varieties, 85 common spots were found for the Nadwiślański variety, while for the Dino variety there were 78 common spots. The maps of different varieties of seeds stored under the same conditions were also compared. There were 122 common spots for seeds stored at -14°C and for these stored at $+20^{\circ}\text{C}$ there were 71 spots. Automatic alignment (matching) of two-dimensional gel electrophoresis images for Nadwiślański was 74% and for Dino 70%. Matching for seeds stored under the same conditions was respectively 62% (-14°C) and 68% ($+20^{\circ}\text{C}$).

Discussion

Most authors are consistent about the fact that conditions (temperature and humidity) of seeds storage have a significant impact on the length of the viability period of seeds. Storing seeds at low temperatures and humidity allows one to maintain the viability of seeds at a high level. [9, 10, 11, 12, 13]. The faba bean seeds after 27 years of storage at -14°C germinated in 95,6% . This relationship is confirmed by studies carried out on the seeds of winter oilseed rape, which placed in a chamber at $+1^{\circ}\text{C}$ after 15 years of storage germinated in 90% [14].

In long-term storage of seeds metabolic processes are continued; however, they are significantly slower. The metabolic processes can cause adverse effects in the seeds and loss of seed viability [15]. The faba bean seeds stored at $+20^{\circ}\text{C}$ were characterized by a reduced content of soluble proteins. The accelerated aging in seeds of pigeon pea (*Cajanus cajan*) [16], maize (*Zea mays*) [9], *Jatropha curcas* L. [17] and watermelon (*Citrullus lanatus*) [18] seems to confirm this phenomenon. Biochemical changes in seeds were subjected to accelerated aging and were the same as in seeds aging in a natural way, with the only difference being in this case they are faster. Many authors observed a reduction in total soluble protein content in terms of both quantity and quality, also a changed profile of the protein [9, 17]. For example, the total protein content of the watermelon aging seed fell by more than 50% [18]. The presence of large concentrations of reducing sugars in the aging seed results in glycosylation of proteins and subsequently lipid peroxidation, resulting in leakage of electrolyte and embryo damage or destruction [17].

Reference

1. Hossain, M.S. and Mortuza, M.G. (2006) Chemical composition of kalimatar, a locally grown strain of faba bean (*Vicia faba* L.). Pakistan Journal of Biological Sciences 9 (9), 1817-1822.
2. Adsule, R.N. and Akpapunam, M. (1996) Faba bean (*Vicia faba* L.). In: Food and Feed from Legumes and Oilseeds. (eds. Nwokolo, E. and Smartt, J.), pp. 197-202, London.
3. Przybylska, J. and Zimniak-Przybylska, Z. (1994) Electrophoretic seed albumin patterns and species relationships in *Vicia* sect. *Faba* (*Fabaceae*). P1. Syst. Evol. 198, 179-194.
4. Cubero, J.I. (1973) Evolutionary trends in (*Vicia faba* L.). Theoretical and Applied Genetics 43, 5965.
5. Skrzypek, E., Czyczyło-Mysza, I. and Marcińska I. (2012) Indirect organogenesis of Faba bean (*Vicia faba* L.). Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 54 (2), 102–108.
6. Alghamdi, S.S. (2009) Chemical Composition of Faba Bean (*Vicia faba* L.) Genotypes under Various Water Regimes. Pakistan Journal of Nutrition 8 (4), 477-482.
7. Vioque, J., Alaiz, M., and Girón-Calle, J. (2012) Nutritional and functional properties of *Vicia faba* protein isolates and related fractions. Food Chemistry 132, 67–72.
8. Czarnecka, J. and Koziółkiewicz, M. (2007) Albuminy 2S – roślinne białka zapasowe o właściwościach alergicznych. Biotechnologia 2 (77), 114–127.
9. Radha, B.N., Channakeshava, B.C., Hullur, N., Pandurange Gowda, K.T., Bhanuprakash, K., Ramachandrappa, B.K. and Munirajappa, R. (2014) Effect of seed ageing on protein quality and quantity in maize. International Journal of Bioassays 3 (1), 1708-1713.

10. Gawrysiak-Witulska, M., Siger, A., Wawrzyniak, J. and Nogala-Kałużka, M. (2011) Wpływ warunków przechowywania (wilgotności i temperatury) nasion rzepaku na szybkość degradacji tokoferoli. *Acta Agrophysica* 18(1), 55-65.
11. Ratuszniak, I., Sobisz, Z. and Ratuszniak, E. (2007) Ocena żywotności nasion złoczenia polnego *Chrysanthemum segetum* L.. *Sectio E Agricultura* 62 (2), 257-264.
12. Justice O.L., Bass L.N. (1978) Principles and practices of seed storage. *Agriculture-Handbook-Science and Education Administration, USDA*, pp. 506.
13. Desai, B.B., Kotecha, P.M. and Salunkhe, D.K. (1997). Seed handbook. In *Biology, production, processing and storage*. (eds. B.B. Desai, P.M. Kotecha, D.K. Salunkhe), pp. 627, Marcel Decker, Inc., New York, Basel, Hong Kong.
14. Gorski, M. (2003) Żywotność nasion rzepaku ozimego w długoterminowym przechowywaniu. *Biuletyn instytutu hodowli i aklimatyzacji roślin* 228, 157-160.
15. Pääkkönen E., Holopainen T., Kärenlampi L. (1995) Ageing-related anatomical and ultrastructural changes in Leaves of Birch (*Betula pendula* Roth.) Clones as Affected by Low Ozone Exposure. *Annals of Botany*, 75(3), 285–294.
16. Kalpana, R. and Madhava Rao, K.V. (1997) Protein metabolism of seeds of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) cultivars during accelerated ageing. *Seed Science and Technology*, 25(2), 271–279.
17. Moncaleano-Escandona, J., Bárbara C.F., Silva, Silvia R.S. Silva, João A.A. Granjab, Maria Claudjane J.L. Alvesc, Marcelo F. Germination responses of *Jatropha curcas* L. seeds to storage and aging *Pompeii Industrial Crops and Products* 44 (2013) 684– 690.
18. Rashed, M.M., Shallan, M., Fathy, M. and Ismail, A.I. (2010) Changes in Biochemical and Isozymes Components of Watermelon seeds during accelerated Ageing Technique. *Journal of American Science* 6 (12).

**RHIZOSPHERIC PHOSPHATE SOLUBILIZING *PANTOEA AGGLOMERANS* LP1
CAN PERSIST IN NON-STERILE MATERIALS IN LONG TERM**

Fatih Er, Ahmet Sami Erol

Selcuk University, Çumra Vocational College, Çumra, Konya, Turkey

*Rhizobacteria, zeolite, organic fertilizer, bacterial survival***Introduction**

Possibility of using phosphate solubilizing microorganisms to enhance P-availability in soil led to some studies worldwide (Krishnaraj and Goldstein, 2001; Kumar, 1999). Phosphate solubilizers are expected to dissolve hardly soluble phosphorus (P) in rhizosphere following soil- or seed-inoculation. Phosphorus solubilized in this manner could readily be taken up by plants without being affected from P-solubility decreasing processes such as precipitation and adsorption in bulk soil. Plants, which are inoculated with phosphate solubilizing microbes can accumulate higher amounts of P and dry matter than the uninoculated control plants (Gaind and Gaur, 2002; Sundara et al., 2002).

Introduction of a phosphate solubilizing microorganism into a non-sterile carrier material has almost never been experimented. The substances that are used in organic fertilizers usually contain low numbers of microorganisms. However, introduction of inoculant culture to the materials used in organic fertilizers brings about the exhausted carbon sources and moisture for the growth of microbial contaminants in the material. The objective of this study was to test the hypothesis that a rhizospheric phosphate solubilizing bacterium (PSB), *Pantoea agglomerans* LP1 can persist in non-sterile zeolite, leonardite, peat, rock phosphate and organic fertilizer without being affected by the local microflora.

Materials and Methods

Root samples of ryegrass (*Lolium perenne* L.) taken from a mountainous area (40°20'N, 36°36'E) in Tokat-Turkey were washed with sterile water to remove soil adhering to the roots. The soil-free roots were cut into 1-2 cm pieces by a sterile lancet. The root pieces were surface sterilized by dipping in 95% ethanol for 2 min, then 1% sodium hypochlorite (NaOCl) for 1 min followed by 6 washes in sterile distilled water. They were placed aseptically in plates of tricalcium phosphate (TCP) agar. The cultures were grown at 30 °C for 72 h. Colonies, which rapidly acidified its surrounding were regarded as phosphate solubilizer. In fact, all colonies in the isolation plate were of the same morphology.

The carrier materials used were *i.*) zeolite, *ii.*) leonardite, *iii.*) peat, *iv.*) rock phosphate, and *v.*) organic fertilizer [(%); leonardite, 58.6; urea, 12.6; rock phosphate, 24.0 (29 % P₂O₅); humic substances, vitamins, and enzymes]. An overnight bacterial culture and non-sterile materials were mixed in a sterile bag for 2 min in a stomacher at 250 compressions min⁻¹. The bag was then loosely closed. The control treatments were run only for rock phosphate and organic fertilizer, which received either sterile water or phosphate solubilizing medium with autoclaved cells of the PSB. The initial moisture contents (v/w) were 45 % for zeolite/rock phosphate and 65 % for leonardite/peat/organic fertilizer. Initial population density of the PSB was 10⁹ cfu g⁻¹. Each treatment had three replications. The sample containing bags were placed in an incubator at 28 °C (± 1 °C) and a cooler at +4 °C (± 1 °C). They were removed 1, 5, 9, and 13 weeks post the start of the storage for bacterial/fungal counts.

Results and Discussion

The number of PSB slightly increased at 28 °C, but, it decreased at +4 °C in zeolite, leonardite and rock phosphate within the first week (Figure 1). The numbers of the PSB at 28 °C dropped logarithmically after the first week. The rates of decrease in zeolite were not as pronounced as the rates in the other materials. However, population density of the PSB at +4 °C increased logarithmically after the first week. The increase in the materials lasted up to week-5 in leonardite and week-9 in zeolite and rock phosphate at +4 °C (Figure 1). Numbers of the PSB then dropped to about 5×10⁸ CFU g⁻¹ in zeolite/rock phosphate and to about 10⁸ CFU g⁻¹ in leonardite at the end of the cold storage. Although initial density of the PSB was adjusted to be the standard (10⁹ CFU g⁻¹) for each material, the numbers of PSB in peat and organic fertilizer were initially

less than 10^6 CFU g^{-1} at week⁻¹ (Figure 1). The numbers of the contaminant bacteria and fungi were below the detection limit (10^6 cfu g^{-1}) before week-5 in peat/rock phosphate and before week-9 in zeolite/leonardite. There is almost no microorganism in the organic fertilizer samples, which were not inoculated (control) by the PSB, regardless of sterile water or medium being added (Table 1). However, there are always contaminant bacteria in the rock phosphate control treatments (Table 1).

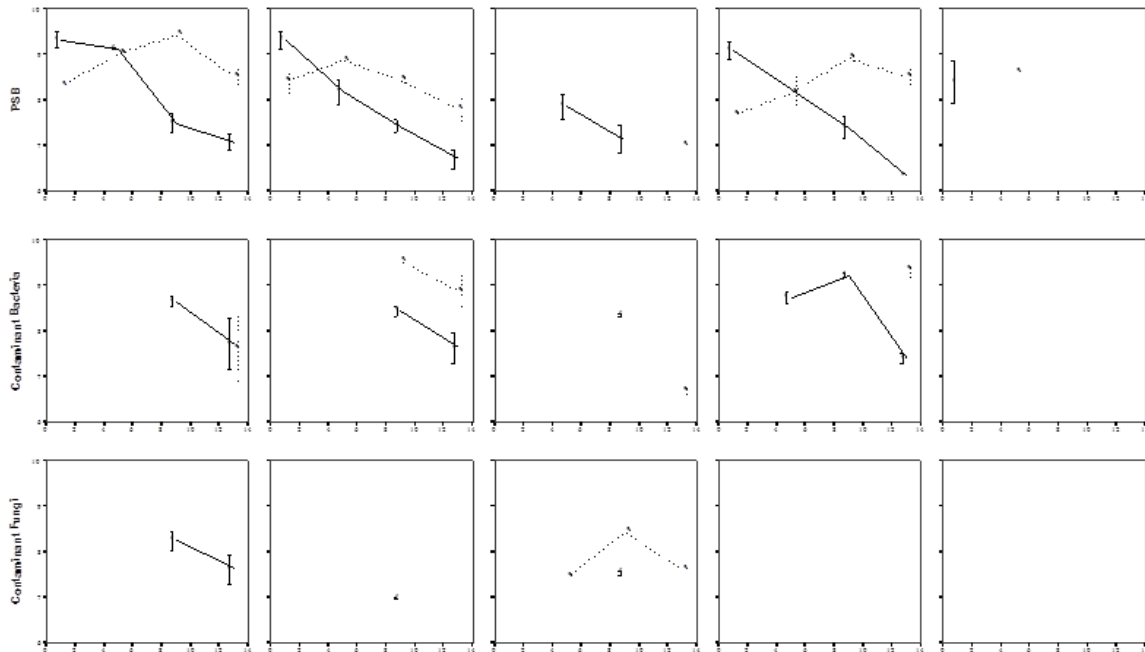


Figure 1 - The numbers of the PSB, contaminant bacteria and fungi in Log_{10} during storage at 28°C (O) and $+4^\circ\text{C}$ (Δ). Error bars show SE. When there is no data point, the population density is below the detection limit (10^6 cfu g^{-1}).

Table 1 - The number of microorganisms in the control treatments (dead cells of the PSB), which were stored at 28°C .

			MICROORGANISMS (10^8 CFU g^{-1})			
Carrier	condition	microbe	(weeks)			
			1	5	9	13
Rock Phosphate	water	bacteria	4,934	0,597	1,002	0,063
		fungi	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
	medium	bacteria	0,933	0,202	2,948	0,386
		fungi	<0,010	0,702	<0,010	<0,010
Organic Fertilizer	water	bacteria	0,212	<0,010	<0,010	<0,010
		fungi	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
	medium	bacteria	<0,010	<0,010	0,445	<0,010
		fungi	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010

References

1. Gaind S., Gaur A.C. (2002). Impact of fly ash and phosphate solubilizing bacteria on soybean productivity. *Biores. Technol.*, 85: 313-315.
2. Krishnaraj P.U., Goldstein A.H. (2001). Cloning of a *Serratia marcescens* DNA fragment that induces quinoprotein glucose dehydrogenase-mediated gluconic acid production in *Escherichia coli* in the presence of stationary phase *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 205: 215-220.
3. Kumar G.N. (1999). Involvement of phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 171: 223-229.
4. Sundara B., Natrajan V., Hari K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Res.*, 77: 43-49.

**WHEAT GROWTH IS DEPENDENT ON THE TYPE OF NITROGEN NUTRITION
AND INOCULATION WITH *BACILLUS sp. #189***

Mehmet Öğüt

Selcuk University, Çumra Vocational College, Çumra, Konya, Turkey

*Bacillus sp. #189, phosphate solubilizing bacteria, wheat, maize, cold stress***Introduction**

Bacillus sp. #189 is a bacterial strain, which significantly increases plant growth and yield in wheat plant, as determined in field conditions (accepted manuscript). The mechanism, by which *Bacillus sp. #189* increases plant growth is direct phosphorus solubilization in rhizosphere (Öğüt et al., 2011). However, there is not information on the effects of different types of nitrogen source on the effectiveness of the bacterial inoculation with this strain. This study was conducted to evaluate the different effects of nitrogen source and inoculation with *Bacillus sp. #189* on the chlorophyll content, dry matter accumulation, and root length in wheat plant.

Materials and Methods

The microcosm system employed in the current study was principally the same as the one used by Ström et al. (2002). The height of the microcosm was 300 mm. The diameter of the lower part (250 mm) was 10 mm and that of the upper part (50 mm) was 20 mm. Each microcosm was cut into two identical parts to allow easy sampling of the soil. These two parts were joined together by two rings at the beginning of the experiment. The soil (pH, 7.6; CaCO₃, 11%; Organic Matter, 1.35%; Olsen-P, 6 mg kg⁻¹; Sand, 19%; Silt, 25.5%; Clay, 55.5%; DTPA-extractable Fe, 2.8 mgkg⁻¹; Mn, 14 mgkg⁻¹; Zn, 0.87 mgkg⁻¹; Cu, 0.65 mgkg⁻¹) was air dried and sieved to 2 mm before it was filled into the microcosms. The soil moisture content was adjusted to 65 % of the water holding capacity initially and maintained gravimetrically during the growth of seedlings.

An overnight culture of *Bacillus sp. #189* was harvested in sterile saline solution (0.85% NaCl) by centrifuging twice at 13,000×g for 10 min. The bacterial density of each suspension was adjusted to be 10⁷ CFU ml⁻¹. A winter wheat (*Triticum aestivum ssp. vulgare* L. cv Bezostaja) seed was surface sterilized as mentioned above and sown into the soil in microcosm. One ml of either the bacterial suspension or autoclaved cells was dispensed. The fertilizer treatments contained 35 mg N kg⁻¹ per treatment of each ammonium nitrate - NH₄NO₃, ammonium sulphate - (NH₄)₂SO₄, potassium nitrate - KNO₃, and urea. The microcosms were transferred into a growth chamber, which was adjusted to a day/night time regime of 16/8 h with a temperature of 22/18°C and a daytime light intensity of 200 μmolm⁻²sec⁻¹. The experiment was designed as completely randomized design with 5 replications.

The seedlings were grown for 30 days in the growth chamber. Chlorophyll content of the leaves was measured by chlorophyll meter (SPAD-501). The dry matter of the plants was recorded. The root pieces collected from each plant were submerged into deionized water in a shallow (2 cm) transparent bucket. The roots were well separated from each other and the bucket was scanned. The image was converted into .TIFF format with black and white appearance by the scanner software. The root length measurements were made by Rootedge software.

Results and Discussion

The SPAD readings of the treatments are given in Figure 1. Ammonium nitrate seems to be the best nitrogen fertilizer in terms of chlorophyll content. However, there is not an inoculation effect. There was not a treatment effect in terms of plant dry matter (Figure 2). Bacterial inoculation significantly (P<0.05) increased root length compared to non-inoculation in ammonium nitrate treatment (Figure 3). However, the bacterial inoculation significantly lowered root length in urea application.

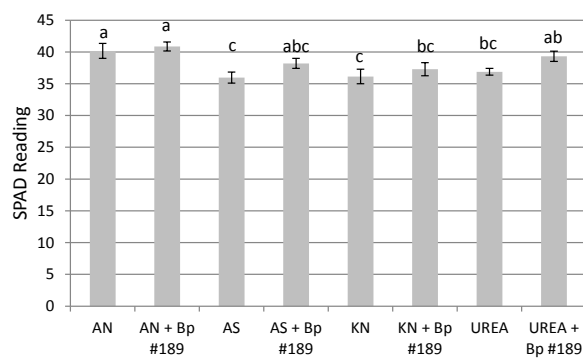


Figure 1 - The SPAD-readings in the treatments (AN: ammonium nitrate; AS: ammonium sulphate; KN: potassium nitrate; Bp #189: *Bacillus spp.* #189 inoculation)

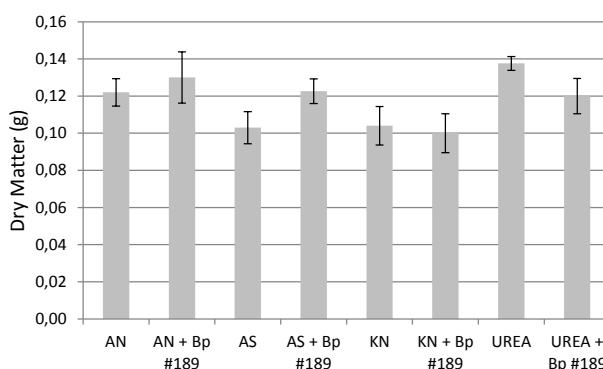


Figure 2 - Dry matter content of the treatments (AN: ammonium nitrate; AS: ammonium sulphate; KN: potassium nitrate; Bp #189: *Bacillus spp.* #189 inoculation)

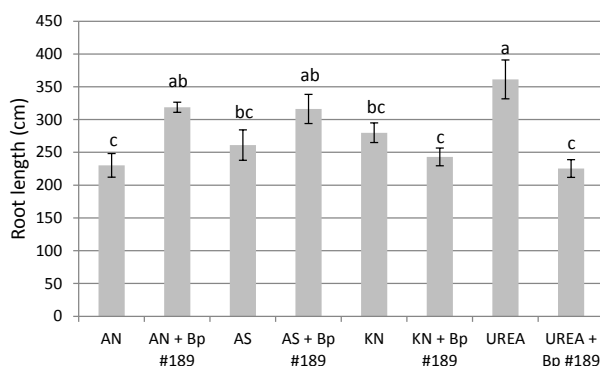


Figure 3 - Root length measurements in the treatments (AN: ammonium nitrate; AS: ammonium sulphate; KN: potassium nitrate; Bp #189: *Bacillus spp.* #189 inoculation)

References

1. Öğüt, M., F. Er, and G. Neumann. 2011. Increased proton extrusion of wheat roots by inoculation with phosphorus solubilising microorganisms. *Plant Soil* 339: 285-297.
2. Ström L, Owen AG, Godbold DL, Jones DL (2002) Organic acid mediated P mobilization in the rhizosphere and uptake by maize roots. *Soil Biol Biochem* 34:703–710.

EVALUATION OF PHYTOTOXIC ACTIVITY OF CIPROFLOXACIN TOWARDS COMMON DUCKWEED (*LEMNA MINOR* L.) AND YELLOW LUPIN (*LUPINUS LUTEUS* L.)Rydzynski D.¹, Margas M.¹, Żółkowska A.¹, Dobiesz M.¹, Adomas B.², Piotrowicz-Cieślak A.I.¹¹Department of Plant Physiology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury, Oczapowskiego 1A, Olsztyn, 10-722, Poland, E-mail: acieslak@uwm.edu.pl²Department of Environmental Toxicology, Faculty of Environmental Management and Agriculture, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Prawocheńskiego 24, Olsztyn, 10-718, Poland*ciprofloxacin, common duckweed, yellow lupin, morphological and biochemical plant characteristics, Lemna Test, Phytotoxkit***Introduction**

In the recent years, pharmaceuticals have been seen as an emerging environmental protection problem due to their presence in water and soil ecosystems. Active substances of pharmaceuticals occur not only in hospital waste or surface waters but also in rivers and seas [1,2].

Medicinal products commonly used may cause harmful effects to the environment. Some active ingredients or the major metabolites of medicines can be excreted in urine and faeces by animals or humans and spread in the environment, especially surface water or groundwater and soil. Active substances in excrement can enter arable land when they are used as fertilizers. Antibiotic contamination have repeatedly been demonstrated in habitats in Europe, North America and Asia. In the natural environment the excreted substances may remain active for some time, depending on environmental conditions, kind of soil, chemical and physical properties of substances [3]. The appearance of a drug in the environment, in particular in an aquatic environment attracted the interest of researchers in 1990, and since then it has been increasing [4].

Ciprofoxacin (1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-quinoline-3-carboxylic acid) is a fluoroquinolone antibiotic, prescribed for certain types of bacterial infections such as pneumonia, urinary tract or skin diseases and also used to treat gastrointestinal problems [5]. Between 1995 and 2002 in the United States prescribing fluoroquinolone became three times more frequent, from 7 million visits in 1995 to 22 million visits in 2002 [6]. It is also used in modern agriculture in order to increase productivity of fodder, and support and enhance growth of farm animals. Germs are increasingly more resistant to antibiotics and thus, unlike in the USA, their application as growth stimulators was forbidden in the European Union in 2006 [7]. Global surveillance studies demonstrate that fluoroquinolone resistance rates have increased in the past years in almost all bacterial species [8].

The aim of this study was to determine the phototoxicity of ciprofloxacin with the use of biological (Lemna Test, Phytotoxkit) and biochemical (biogenic amines) methods. The impact of contaminating fresh water reservoirs and soil on morphological and biochemical characteristics of common duckweed and yellow lupin were determined

Materials and Methods

Seed germination and root growth test. Seeds of yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) were germinated for seven days in PHYTOTOXKIT™ plates (MicroBio Test Inc., Belgium). Germination and seedling growth occurred at 8/16 hours photoperiod, and temperatures of 20°C at day and 16°C at night. Ninety ml of soil (sand, vermiculite, peat 1:0.3:1, v/v/v) were placed in plastic microbiotest plates. The soil was covered with Whatman No.1 filter-paper and watered with 27 ml distilled water supplemented with ciprofloxacin at final concentrations: 0, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 mM. The control plants were watered with pure distilled water. The root and shoot length and cotyledon area were estimated using Image Tool for Windows. Dry and fresh mass roots, shoots and biogenic amines were determined too.

Lemna minor (common duckweed) was grown in 10 ml Steinberg's (OECD 221) [9] solution at 8/16 hours photoperiod, and temperatures of 20°C at day and 16 at night. The response of *Lemna*

minor to ciprofloxacin concentrations (identical to lupin) was determined by the growth rate of frond, leaf area, dry and fresh mass of plants and biogenic amines.

Biogenic amines The polyamines were extracted from lyophilized plant material with cold 5% perchloric acid in accordance with by et al., [10]. The lyophilized plant material was shaken with 25 ml 5% HClO₄ solution for 30 min and then centrifuged at 16 000g for 30 min at 4°C. The supernatant was evaporated and the residue was re-dissolved in 3 ml 5% HClO₄. The extract was analyzed by using the AA 400 amino acid analyzer (Ingos, Praha, Czech Rep.). The polyamines were separated at 70°C on a 7.0 x 0.37 cm column filled with Ostion Lg ANS and then eluted from the ion-exchange column with two pH 5.65 sodium citrate buffers with addition 1.0 and 2.6 M sodium chloride. The quality and quantity of the polyamines were assayed with a spectrophotometric detector, following their reaction with ninhydrin, and expressed in μM x g⁻¹ fresh weight

Results and Discussion

Physiochemical and biological methods are commonly used to assess contaminants of the environment which lower its quality [11]. It was found that as concentration of ciprofloxacin grew, it impeded the development of morphological characteristics in both common duckweed and yellow lupin. In line with increasing concentration of the medicine, yellow lupin roots elongation and common duckweed fronds growth were inhibited (Fig. 1). The content of chlorophyll in tissues decreased with increasing concentrations of ciprofloxacin. In the control plants, its content was 0.67 and 0.00 mg/g of fresh mass in yellow lupin and common duckweed, respectively.

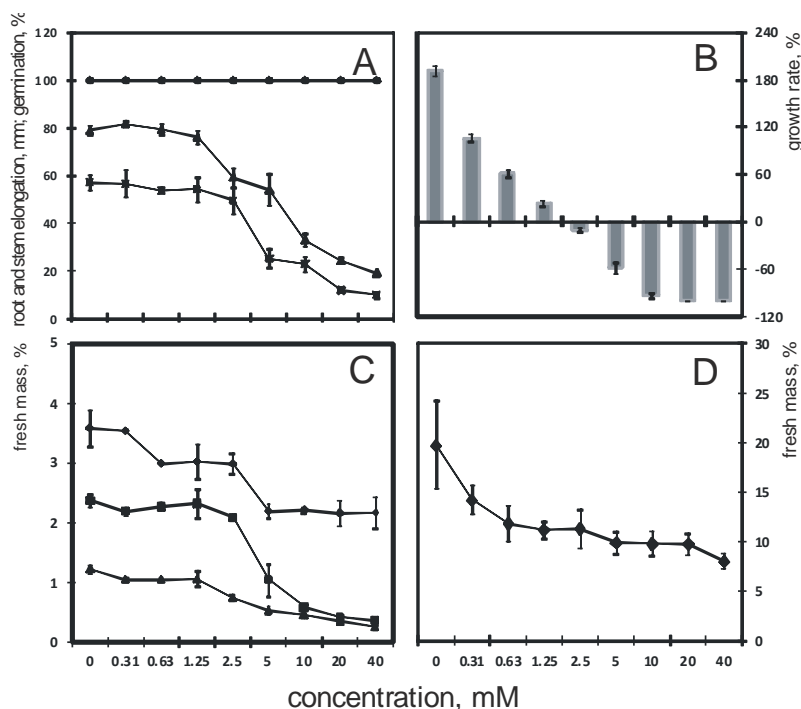


Figure 1. Root (▲) and stem (■) elongation, and germination (●) (panel A), fresh mass of cotyledon (●), root (▲), stem (■) of yellow lupin (panel C), and the growth rate (panel B) fresh mass (panel D) of common duckweed growing in soil or water supplemented with different ciprofloxacin concentrations. Data points represent the means ± SD for nine replicate samples.

In the highest concentrations of ciprofloxacin the content of chlorophyll decreased by 75% and 18% in yellow lupin and common duckweed, respectively (Table 1 and 2). Similar trends were observed for the content of biogenic amines, with the highest concentration decreasing its content by 75%. (Table 1 and 2). Ebert et al. showed [12] high sensitivity of lesser duckweed to fluoroquinolone. Analyzing the tested substance by inspecting the plant features (intensity of leaf and cotyledon colour, and osmotic potential in lupin), it was found that ciprofloxacin was more phytotoxic to common duckweed than to yellow lupin. Reduction of 50 % fresh mass of common duckweed and yellow lupin seedling appeared in 0.23 and 5.2 mM of ciprofloxacin, respectively. Spermine, spermidine and putrescine were detected in common duckweed and lupin seedlings. In common duckweed the level of biogenic amines was two times lower than in lupin seedlings.

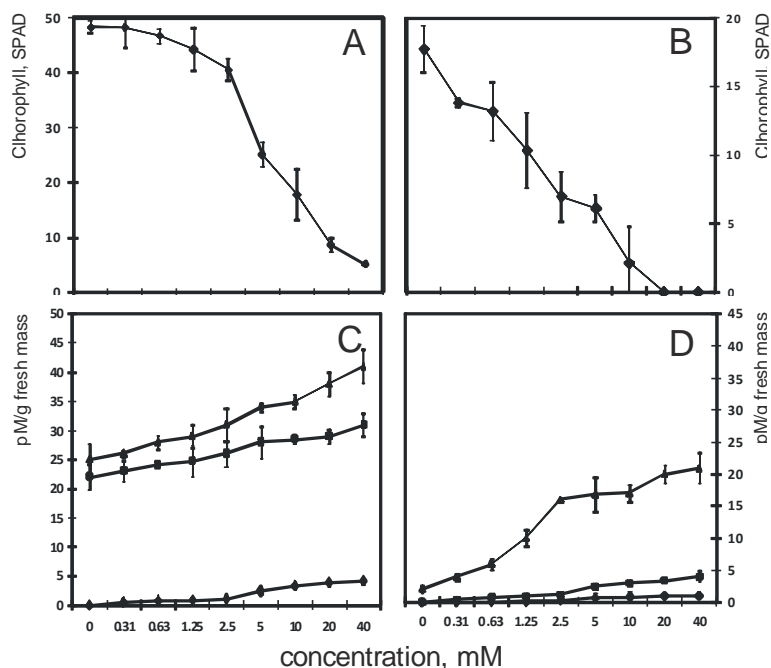


Figure 2. Chlorophyll (panel A) and biogenic amines (spermine ▲, spermidine ■ and putrescine● dry, panel C) of yellow lupin and chlorophyll (panel B) and biogenic amines (spermine ▲, spermidine ■, and putrescine●; panel D), of common duckweed growing in soil or water supplemented with different ciprofloxacin concentrations. Data points represent the means \pm SD for nine replicate samples.

Reduction of 50 % for root elongation, shoot elongation and fresh mass of root and stem, which are a quantitative measure of the phytotoxicity of ciprofloxacin in soil were 2.5 mM, 2.3 mM, 1.26mM and 0.63 mM for yellow lupin. Reduction of 50 % for growth rate and fresh mass of ciprofloxacin in water were 0.29mM, 0.22mM for common duckweed. These values can be used in the future to predict the risk level at which toxic effects will appear.

For the first time, the content of biogenic amines was determined in common duckweed tissues. The research proved that in order to assess contamination of fresh water reservoirs and soil with ciprofloxacin, one can successfully apply common duckweed (Lemna Test) and yellow lupin (Phytotoxkit) as bioindicators. Biological methods should be supplemented with biochemical methods to fully answer the question about contamination of the natural environment.

Acknowledgments

The present study was financially supported by project NCN UMO-2011/01/B/NZ9/02646

References

1. Kumar R. R., Lee J. T., Cho J. V. Fate, occurrence, and toxicity of veterinary antibiotics in environment. *J Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 55, 701–709, 2012.
2. Hillis D. G., Fletcher J., Solomon K. R., Sibley P. K. Effects of ten antibiotics on seed germination and root elongation in three plant species. *Arch Environ Contam. Toxicol.* 60, 220–232, 2011.
3. Dolliver H., Kumar K., Gupta S. Sulfametazine uptake by plants from manure-amended. *Soil. J. Environment. Qual.* 36, 1224, 2007.
4. Kümmerer K. Pharmaceuticals In the Environment. *Annu. Rev. Environ. 35*, 57–75, 2010.
5. DrugBank, DB 00537, <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00537>
6. Linder JA, Huang ES, Steinman MA, Gonzales R, Stafford RS 2005. Fluoroquinolone prescribing in the United States: 1995 to 2002. *Am J Med.* 118(3): 259-68
7. Allen HK, Looft T, Bayles DO, Humphrey S, Levine UY, Alt D, Stanton TB (2011) Antibiotics in feed induce prophages in swine fecal microbiomes. *MBio* 2(6): 1-9
8. Dalhoff A. (2012) Global Fluoroquinolone Resistance Epidemiology and Implications for Clinical Use. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.* Article ID 976273, 37 pages.
9. Steinberg's OECD 221 (2006). *Lemna sp.* Growth Inhibition Test. Guideline for the testing of chemicals. OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris,

10. Taibi G., Schiavo M.R. (1993). Simple high-performance liquid chromatographic assay for polyamines and their monoacetyl derivatives. *J. Chrom.*, 614(1), 153-158.
11. Piotrowicz-Cieślak A.I., Adomas B., Nałęcz-Jawecki G., Michalczyk D.J. (2010) Phytotoxicity of sulfamethazine soil pollutant to six legume plant species. *J Toxicol Environ Health – Part A* 73(17-18):1220–1222.
12. Ebert, I., Bachmann, J., Kühnen, U., Küster, A., Kussatz, C., Maletzki, D. and Schlüter, C. (2011) Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30 (12), 2786-2792.

**THE EFFECTS OF TETRACYCLINE CONCENTRATION ON PEA
(*PISUM SATIVUM* L.) AND LUPIN (*LUPINUS LUTEUS* L.) SEEDLINGS**Rydzynski D.¹, Margas M.¹, Ziolkowska A.¹, Dobiesz M.¹, Adomas B.², Piotrowicz-Cieslak A.I.¹¹Department of Plant Physiology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury,
Oczapowskiego 1A, Olsztyn, 10-722, Poland, E-mail: acieslak@uwm.edu.pl²Department of Environmental Toxicology, Faculty of Environmental Management and Agriculture,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Prawocheńskiego 24, Olsztyn, 10-718, Poland*lupin and pea seedlings, tetracycline, guaiacol peroxidase activity***Introduction**

Antibiotics are widespread both in human and veterinary medicine. Apart from a therapeutic application, they are also used as a preventive measure. Since 1928, when penicillin was accidentally discovered by Flemming, consumption of various antibiotics has gradually been increasing. Moreover, the use of antibiotics on a large scale in animal husbandry as growth promoters is important in terms of economy. For instance, in 1997 in Denmark, there was used about 150 000 kg of antibiotics, 70% of them were applied as growth promoters [1]. In 2006, the use of antibiotics as growth promoters in the European Union was prohibited, but since then the use of antibiotics as preventive and curative measures have increased. Medicines are delivered to animals by injections, as a component of fodder and water or ointments. Excreted with feces or urine, still active antibiotics or their bioactive metabolites enter the natural environment. For example, 21% of a oxytetracycline dose consumed by sheep is secreted into the environment, where it remains still active [2]. Feces used as fertilizer becomes a source of antibiotic contamination in fields and ground water. It was demonstrated that antibiotics can be absorbed by economically viable plants and therefore become an actual threat to customers' health. Vegetables such as lettuce, carrot roots, corn and onion absorb some groups of antibiotics from soil. The concentration of pharmaceuticals in vegetables depends proportionally on the amount of drugs in soil and type of medicine [3, 4, 5].

Tetracyclines, first discovered in 1945, are a broad-spectrum, low-toxic antimicrobial agents [6]. The use of tetracyclines is comparatively inexpensive, that is why this group of antibiotics is applied extensively, especially in veterinary medicine. In 2000 in UK there was used 8495 kg of oxytetracycline, 6256 kg of chlortetracycline and 1517 kg of tetracycline [3]. Tetracycline's bacteriostatic activity is related to blocking bacterial protein biosynthesis, via bacterial ribosomes modification [7]. Tetracyclines can exhibit a negative impact on plants which absorbed the antibiotic contamination from soil together with water. An increase of activity of some groups of enzymes can be an index of plant stress or physiology disorder. Peroxidases catalyse oxidoreduction [8]. In literature there are three different classes of peroxidases, the third class exhibits activity in response to biotic and abiotic stresses. Guaiacol peroxidase, which belongs to this class, reacts to stress, producing reactive oxygen species [9].

The conducted research was aimed to estimate the influence of tetracyclines on guaiacol peroxidase activity in lupin and pea seedlings. A few different concentrations of tetracycline in soil were used during the experiment to compare antibiotic absorption by plants and demonstrate consequences of distribution of antibiotic contamination for legume plants physiology. Moreover, the influence of tetracycline on elongation of roots and shoots of leguminous seedlings was examined.

Materials and Methods

Seeds of yellow lupin (*Lupinus luteus*) and pea (*Pisum sativum*) were germinated for nine days in PHYTOTOKIT™ plates (MicroBio Test, Inc., Belgium) [12]. The soil was supplemented with tetracycline (Sigma-Aldrich) at final concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 and 100 mM. Extracts to determine peroxidase activity were prepared in ice. The roots (500 mg) which grew in soil with water or with tetracycline, oxytetracycline or chlortetracycline were homogenized

for 30 minutes in the extraction buffer (0.1 M Tris/HCl, 8.75% polyvinylpyrrolidone, 0.1 M KCl, 0.28% Triton X-100). Samples were centrifuged for 30 minutes at 4000 x g at 4°C. The supernatant was passed through membrane filters 0.45 µm in diameter. The protein content in samples was determined in the Lowry protein assay. Peroxidase activity was determined based on spectrophotometric detection (CECLI, CE2021 2000 SERIES) in mixture containing 100 µl 1% guaiacol, 2 ml 0.1 M KH₂PO₄, 150 µl supernatant and 20 µl 0,18% H₂O₂. The absorption rate increase was measured in room temperature at the wave length of 470 nm. One unit of activity equals oxidation of 1 µM H₂O₂ during 1 minute.

Results

The effects of tetracycline concentration (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 mM) on roots and shoots elongation of pea (*Pisum sativum* L) and lupin (*Lupinus luteus* L) seedlings were compared. The measurements (roots and shoots elongation) were analyzed after seven days growth of the seedlings in soil contaminated with tetracycline (Fig. 1A, B). Roots of lupin and pea seedlings were longer than their shoots.

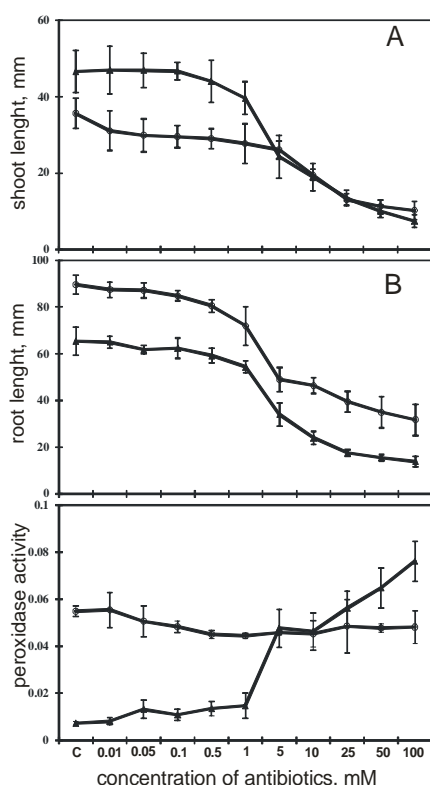


Figure 1 - Shoot (panel A) and root length (mm) (panel B) and peroxidase activity (panel C) of *Lupinus luteus* (▲) and *Pisum sativum* (○), after seven days on soil supplemented with tetracycline concentrations (c, control; 1 - 0.01 mM, 2 - 0.05 mM, 3 - 0.1 mM, 4 - 0.5 mM, 5 - 1 mM, 6 - 5 mM, 7 - 10 mM, 8 - 25 mM, 9 - 50 mM and 100 mM).

The length of seedlings was related to the antibiotic dose in tested plants. The longest roots were noted in pea (90 mm) and the shortest in lupin (65 mm) growing in the soil without tetracycline – the control soil (Fig. 1A). The growth of seedlings (elongation of roots and shoots) depended on the plant species and tetracycline concentration. An increase of antibiotic concentration in soil caused inhibited growth of the roots. The highest tetracycline concentration caused lower growth of roots, when compared to the roots of control seedlings. After seven days, roots elongation was reduced by between 65 and 80% for pea and lupin in comparison to roots of control seedlings. Lupin roots demonstrated higher sensitivity than pea roots (Fig. 1A). The increase of lupin roots was reduced by as much as 52% for the sixth concentration (5 mM). The same effect in lupin seedlings was induced by the seventh (10 mM) concentration of tetracycline, which was twice as high as the sixth one.

The inhibition of pea and lupin shoots growth, similarly to their roots, depended on the concentration of tetracycline in soil (Fig. 1B). In the control soil the seedlings of lupin had longer shoots (46 mm) than the pea seedlings (35 mm). Lupin shoots were more sensitive than pea shoots

(Fig. 1B). Similarly to seedling roots, the growth of shoots was more inhibited in the seedlings of lupin (85 %), whereas the elongation of pea shoots was suppressed in 72 %.

After seven days growth of the pea and lupin seedlings in soil contaminated with tetracycline, peroxidase activity was analyzed (Fig. 1C). Different results were obtained depending on the type of plant and tetracycline concentration. Increasing concentrations of tetracycline in soil caused an increase in the activity of peroxidase in roots. The seedlings of lupin initially demonstrated low activity of the enzyme, then there occurred its rapid rise in concentration ranging from 1 to 5 mM. The largest increase of activity occurred between the concentrations of 10 to 100 mM. The strongest peroxidase activity was observed at the highest concentration of the antibiotic. A completely different situation occurred in the case of pea plants. With increasing concentrations of the antibiotic, the activity of the enzyme decreased slightly, when compared to the values in the control roots. The seedlings of lupin which grew in soil contaminated with 100 mM concentration demonstrated ten times higher peroxidase activity when compared to control seedlings. The enzyme activity in pea roots in the same concentration increased by 20%.

Discussion

There is a proved risk of the occurrence of antibiotics and their metabolites in the habitat, due to the use of antibiotics on a large scale in the world. The amount of antibiotics used a year all over the world is about 200 000 tons. It is the reason behind antibiotic contamination ranging from <0.01 to $1,340 \mu\text{g L}^{-1}$ in the aquatic environment [10]. Another example is the occurrence of different antibiotics in Poudre River in Northern Colorado, USA, in the maximum amount of $0.18 \mu\text{g L}^{-1}$. An occurrence of different groups of antibiotics in the habitat and in animal tissues is often an object of study for many scientists, because of the increase to antibiotic resistance [11]. Little attention has so far been devoted to plants which – eaten by consumers - contribute to the drug resistance. It is assumed that antibiotic resistance is an effect of abusing antibiotics and their permeating into the environment. It seemed reasonable to analyze the risk associated with drugs absorption by seedlings.

It was demonstrated that plants had the ability to absorb antibiotics from contaminated soil. Sulfamethazine concentration in leguminous plants in Piotrowicz-Cieślak's research increases with the increase of antibiotic concentrations in soil. On the basis of the analysis, it can be concluded that tetracycline absorption took place because there observed such morphological symptoms as growth inhibition, characteristic for biochemical disruption as an effect of stress.

Plant sensitivity to antibiotics is dependent on the plant species. In the tests that were carried out for the purpose of the study, it was demonstrated that lupin seedlings were significantly more susceptible to toxicity of tetracycline than pea seedlings. The toxicity effect of tetracycline was exhibited by inhibition of elongation of roots and shoots both in lupin and pea. The growth of roots is often affected by many stressors, such as a water or nutrients deficiency. Another type of stressors, such as the presence of toxic compounds, causes a decrease of plants elongation, both roots and shoots [12]. Glyphosate is an example of a stressor causing reduction of plants growth [13]. During the experiment it was proved that the presence of tetracycline in soil caused reduction of lupin and pea roots elongation depending on tetracycline concentrations. Moreover, an increase of oxidative stress enzymes activity enhancing the generation of reactive oxygen species (ROS) was characteristic of legume plants. It was demonstrated in the research that tetracycline was a stress factor for plants which absorbed it. The largest toxic effects dependent on tetracycline concentration were observed for lupin and pea in the biggest concentration of tetracycline in soil (100mM), whereas the smallest reduction of growth was observed for the lowest concentration of tetracycline in soil (0.01 mM). Liu et al. [14] also reported phytotoxicity of sulfamethoxazole, sulfamethoazine and trimetoprim on some cultivated plants. Phytotoxicity caused by enrofloxacin for plants was also observed by Migliore et al [15].

Acknowledgments

The present study was financially supported by project NCN UMO-2011/01/B/NZ9/02646.

Reference

1. Jensen J. 2001. Veterinary medicines and soil quality: the Danish situation as an example. In: Daughton, C.G., Jones-Lepp, T. (Eds.), *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*, Symposium Series, vol. 791. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 282–302.
2. Montforts M.H.M.M. 1999. Environmental risk assessment for veterinary medicinal products. Part 1: Other than GMO-containing and immunological products National Institute of Public Health and the Environment, Bithoven, The Netherlands.
3. Boxall A.B.A., Johnson P., Smith E.J., Sinclair C.J., Stutt E., Levy L.S. 2006. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2288–2297.
4. Grote M., Schwake-Anduschus C., Michel R., Stevens H., Heyser W., Langenkämper G., Betsche T., Freitag M. 2007. Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil. *FAL Agric. Res.* 57, 25–32.
5. Kumar K., Gupta S.C., Baidoo S.K., Chander Y., Rosen C.J. 2005. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J. Environ. Qual.* 34, 2082–2085.
6. Duggar B.M. 1948. Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 177–181.
7. Sum P.E., Sum F.W., Projan S.J. 1998. Recent developments in tetracycline antibiotics. *Curr. Pharm. Des.* 4, 119–132.
8. Gaspar T., Penel C., Hagege D., Greppin H. 1991. Peroxidase in Plant Growth, Differentiation and Developmental Processes. In: *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Pennel, T. Gaspar (Eds.), Lublin, Poland and Geneva, Switzerland. 249–280.
9. Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase: a hydrogen scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.*, 85, 235–241.
10. Bradford S.A., Segal E., Zheng W., Wang Q., Hutchins S.R. 2008. Reuse of concentrated animal feeding operation wastewater on agricultural lands. *J. Environ. Qual.*, 37, 97–115.
11. Kumar R.R., Lee J.T., Cho J.Y. 2002. Fate, Occurrence, and Toxicity of Veterinary Antibiotics in Environment. *J Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 55, 701–709.
12. Merrill S.D., Tanaka D.L., Hanson J.D., 2012. Root length growth of eight crop species in haplustoll soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66,
13. Piotrowicz-Cieślak A.I., Adomas B., Michalczyk D.J. 2010. Different Glyphosate Phytotoxicity of Seeds and Seedlings of Selected Plant Species. *Polish J. Environ. Stud.* 19 (1), 123–129.
14. Liu F., Ying G.G., Tao R., Zhao J.L., Yang J.F., Zhao L.F. 2009. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environ. Pollut.*, 157, 1636–1642.
15. Migliore L., Cozzolino S., Fiori M. 2003. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere* 52, 1233–1244.

**PHYTOTOXICITY OF SULFONAMIDES SOIL POLLUTANT
TO LUPIN (*LUPINUS LUTEUS* L.) AND PEA (*PISUM SATIVUM* L.) PLANT**
Ziółkowska A.¹, Dobiesz M.¹, Rydzyński D.¹, Margas M.¹, Adomas B.², Piotrowicz-Cieślak A.I.¹

¹Department of Plant Physiology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury,
Oczapowskiego 1A, Olsztyn, 10-722, Poland, E-mail: acieslak@uwm.edu.pl

²Department of Environmental Toxicology, Faculty of Environmental Management and Agriculture,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Prawocheńskiego 24, Olsztyn, 10-718, Poland

lupin and pea seedlings, sulfamethazine, peroxidase activity

Introduction

Antibiotics are widely used in human and veterinary medicine as preventive and therapeutic measures. Moreover, this kind of medicines was used on a large scale as growth promoters in animals in EU countries until 2006. It was demonstrated that 13 288 tons of antibiotics were used in EU countries and Switzerland in 1999 [1]. Every year antibiotic consumption increases.

Sulfonamides are synthetic antibiotics used to treat infections in humans and animals. Sulfonamide activity involves inhibiting folic acid biosynthesis. The effect of folic acid deficiency results in DNA and RNA synthesis inhibition. Despite their toxicity (nephrotoxicity for humans and animals), sulfonamides are still popular in many countries because of low cost in comparison with other antibiotics [2]. Frequent incautious use of sulfonamides causes negative consequences in environment. For example, in Korea it was assessed that the level of concentration of sulfonamides was in water samples $14.85 \mu\text{g L}^{-1}$, $38.82 \mu\text{g kg}^{-1}$ in soil samples, $120.91 \mu\text{g kg}^{-1}$ in sediment samples [3]. The presence of sulfamethoxazole was shown even in drinking water [4].

It has been demonstrated that sulfonamides are light-sensitive and photodegradable in liquids, but they are not degraded by hydrolysis. Plants have unimpeded access to sulfonamides in soil due to low sorption of this group of antibiotics. It has been proved that sulfonamides are assimilated and accumulated in aquatic plants. Sulfamethazine has been detected in cultivated plants: corn, lettuce, potato, yellow lupin, pea, lentil, soybean, beans, alfalfa [1, 5, 6]. Sulfamethazine is one of the most phytotoxic antibiotics. Toxic effects to root and stem elongation have been observed in sweet oat, cucumber and rice. Plant species vary in sensitivity to individual groups of antibiotics [5]. Some plant's enzyme dysfunction or activation of another group of enzymes can be seen as a mark of a toxic effect of an antibiotic.

Peroxidases belong to an oxidoreductases family, which is necessary in germination process. They are involved in lignification and suberization, some biochemical reactions, catalysing the oxidoreduction [7]. The mass of secretory types of peroxidases ranges usually between 30kDa and 45kDa [8]. Three classes of peroxidases were described: intracellular from *prokaryota* (I class), fungal peroxidases (II class) and well-known, located in vacuole or extracellular (III class) [6, 9, 10]. This extracellular peroxidase plays a role in response to stress by increasing its activity and reactive oxygen species (ROS) production. Guaiacol peroxidase, originating from ascorbate peroxidase (class I), belongs to the III class of peroxidases family. A wide range of guaiacol peroxidase isoenzymes was found in vacuoles, the cell wall and cytosol [11].

The aim of the current study was to assess a sulfamethazine influence on peroxidase activity in legume seedlings. In laboratory analysis a few different concentrations of sulfamethazine were used. Also assimilation of this antibiotic by peas and lupin was demonstrated. Furthermore, the influence of sulfamethazine on elongation of roots and shoots of leguminous seedlings was examined.

Materials and Methods

Seeds of yellow lupin (*Lupinus luteus*) and pea (*Pisum sativum*) were germinated for nine days in PHYTOTOXKITTM plates (MicroBio Test, Inc., Belgium) [12]. The soil was supplemented with sulfamethazine (Sigma-Aldrich) at final concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 and 100 mM. Extracts to determine peroxidase activity were prepared in ice. The roots (500 mg)

which grew in soil with water or with tetracycline, oxytetracycline or chlortetracycline were homogenized for 30 minutes in the extraction buffer (0.1 M Tris/HCl, 8.75% polyvinylpyrrolidone, 0.1 M KCl, 0.28% Triton X-100). Samples were centrifuged for 30 minutes at 4000 x g at 4°C. The supernatant was passed through membrane filters 0.45 µm in diameter. The protein content in samples was determined in the Lowry protein assay. Peroxidase activity was determined based on spectrophotometric detection (CECLI, CE2021 2000 SERIES) in mixture containing 100 µl 1% guaiacol, 2 ml 0.1 M KH₂PO₄, 150 µl supernatant and 20 µl 0,18% H₂O₂. The absorption rate increase was measured in room temperature at the wave length of 470 nm. One unit of activity equals oxidation of 1 µM H₂O₂ during 1 minute.

Results

The growth of seedlings of lupin (*Lupinus luteus* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) was analyzed after applying different concentrations of sulfamethazine. Measurement of roots and shoots was performed after seven days from sulfamethazine application (Fig 1A, 1B). Different results were obtained depending on the type of plant. With increasing sulfamethazine concentration, a smaller growth of seedlings, both in pea and lupin, was noticed.

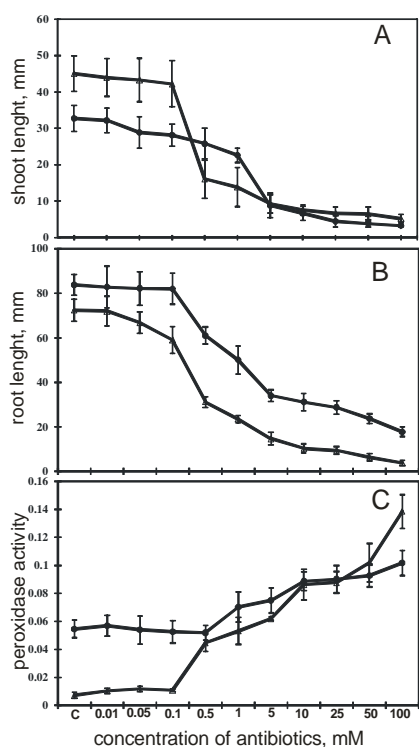


Figure 1 - Shoot (panel A) and root length (mm) (panel B) and peroxidase activity (panel C) of *Lupinus luteus* (Δ) and *Pisum sativum* (\bullet), after seven days on soil supplemented with sulfamethazine concentrations (c, control; 1 - 0.01 mM, 2 - 0.05 mM, 3 - 0.1 mM, 4 - 0.5 mM, 5 - 1 mM, 6 - 5 mM, 7 - 10 mM, 8 - 25 mM, 9 - 50 mM and 100 mM)

For the seedlings which grew in the soil without sulfamethazine (control soil) the shortest roots were observed in lupin (72 mm). The longest pea roots were also observed in the control soil. The root growth was inhibited with increasing concentration of sulfamethazine. The highest sulfamethazine concentration caused reduction of root growth in comparison to roots of control seedlings to 94 and 79%. A high level of sensitivity and a considerable growth inhibition were observed for lupin roots in the fourth concentration (0.5mM) (Fig.1A) and it was 43%. To compare, a decrease in the growth of pea seedlings in the same concentration was 28%.

A similar sensitivity to increasing sulfamethazine concentrations was observed in lupin shoots (Fig. 1B). In soil without sulfamethazine the seedlings were longer and amounted to 45 and 32 mm respectively for lupin and pea. Pea shoots were more sensitive to sulfamethazine than lupin shoots. In the highest of the tested sulfamethazine concentrations lupin and pea shoots elongation was suppressed respectively by 90 and 91%.

The peroxidase enzyme activity was studied by spectrophotometry after seven days in lupin and pea seedlings treated with increasing concentrations of sulfamethazine. A rise in peroxidase activity was observed with increasing concentrations of the antibiotic in samples from both plants.

Peroxidase isolated from pea had higher activity than the lupin peroxidase in the control. In the highest concentration of sulfamethazine, peroxidase activity was more comparable to the activity of this enzyme in control roots. The seedlings of lupin which grew in soil contaminated with 100 mM sulfamethazine concentration demonstrated nineteen times higher peroxidase activity compared to control seedlings. The enzyme activity in pea roots in the same concentration increased by 60%. In lupin, an increased enzyme activity occurred at a 0.5 mM concentration of sulfamethazine, while in peas at a concentration of 1 mM.

Discussion

Drugs used in human and veterinary medicine belong to a new class of pollutants. A large group of these agents are antibiotics. Antibiotics are designed to induce a pharmaceutical effect at very low concentrations. After treatment, most antibiotics are excreted from the treated organism, some of them unchanged or as metabolites. Long-term exposure of bacteria to low doses of antibiotics increases bacterial resistance [13, 14].

Despite the confirmation of the presence of antibiotics in the environment, little is known about their effects on plants. It was found that tests of germination and growth of plants were a good indicator of pharmaceuticals' phytotoxicity. Of these two parameters, tests of the plant growth are better. Antibiotics have a negative effect on germination, but different plant species differ in their sensitivity [15]. The study showed a negative effect of sulfamethazine on the growth of pea and lupin seedlings. The drug has a negative effect on the elongation of both shoots and roots. In the highest concentration of the antibiotic the root length was reduced in comparison to the control soil by 94% (lupin) and 79% (pea). Similar results were observed in the case of shoots. The highest antibiotic concentration resulted in a decrease of the lupin shoot length of 90% and pea of 91%. In the literature, we can find growth assays performed on other plants: cucumber and rice. Sulfamethoxazole showed a reduction in the length of the rice seedlings by 50% at a concentration of 38 mg / kg of dry soil. A fifty percent reduction in root length was observed at a concentration of 13 mg / kg. It was also investigated how sulfamethazine affects the growth of rice seedlings. EC50 for seedlings growth test and root elongation test for sulfamethazine was accordingly 220 and 43 mg/kg of dry soil weight [16]. The research conducted by Piotrowicz-Cieślak et al. [12] on lupins, peas, soy beans and lentils treated with sulfamethazine at concentrations of 0.01, 0.1, 0.25, 1, 5, 15, and 20 mM showed a reduction in root length. A fifty percent reduction in root length after three, seven and nine days was observed at a concentration of 10 μ M. For soybean EC50 was higher, after 3 and 6 days it was 0.25 mM, and after nine days 1 mM [12].

Peroxidases are included in the group of enzymes that use hydrogen peroxide and other organic peroxides as reactants. The peroxidase takes part in hypersensitivity reactions involved in formation of reactive oxygen species (ROS). Production of free radicals is a response of plants to stress factors such as pathogens or chemicals [17]. An activity of peroxidase isolated from seedlings treated with increasing concentrations of the antibiotic was tested. In the control soil, the pea peroxidase activity was higher than the peroxidase activity in lupin. For both plants peroxidase activity increased significantly with rising antibiotic concentrations. This suggests that the antibiotic is a stress factor for plants and that it is drawn from the soil.

Acknowledgments

The present study was financially supported by project N N305 275440.

References

1. European Federation of Animal Health (FEDESA), 2001. Antibiotic use in farm animals does not threaten human health.
2. Suzuki S., Hoa P.T.P. 2012. Distribution of quinolones, sulfonamides, tetracyclines in aquatic environment and antibiotic resistance in Indochina. *Frontiers in Microbiology*, 3, 67.
3. Ok Y.S., Kim S.C., Kim K.R., Lee S.S., Moon D.H., Lim K.J. 2011. Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province. *Environ Monit Assess*, 174, 1–4.

4. Muckter. Antibiotika-Rückstände im Trinkwasser. 47. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets, 2006.
5. Liu F., Ying G.-G., Tao R., Zhao J-L, Yang J-F, Zhao L-F. 2009. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environ. Pollut.*, 157, 1636–1642.
6. Mika A., Lüthje S. 2003. Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiol.*, 132, 1489- 1498.
7. Gaspar Th, Penel C., Hagège D, Greppin H. 1991. Peroxidase in plant growth, differentiation and developmental processes. In: Lobarzewski J., Greppin H., Penel C., Gaspar Th., eds. *Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. 249–280.
8. Almagro L., Gómez Ros L.V., Belchi-Navarro I S., Bru R., Ros Barceló A., Pedreñ M.A. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Bot.*, 60(2), 377–390,
9. Csiszár J., Gallé Á., Horváth E., Dancsó P., Gombos M., Váry Z., Erdei L., Györgyey J., Tari I. 2012. Different and expression of abiotic stress-related peroxidases in apical root segments of wheat genotypes with different drought stress tolerance under osmotic stress. *Plant Physiol. Bioch.*, 52, 119-129.
10. Welinder K.G. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2, 388- 393.
11. Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase: a hydrogen scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.*, 85, 235- 241.
12. Piotrowicz-Cieślak A.I., Adomas B., Nałęcz-Jawecki G., Michalczyk D.J. 2010. Phytotoxicity of sulfamethazine soil pollutant to six legume plant species. *J. Environ. Sci. Health, Part A*, 73, 1220-1229.
13. Al-Ahmad A., Daschner F.D. and Kümmerer K. 1999. Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 158-63.
14. Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725–759.
15. Martí, E., Sierra, J., Sañchez, M., Cruaños, R., Garau, M.A. Ecotoxicological tests assessment of soils polluted by chromium (VI) or pentachlorophenol. *Science of the Total Environment*, 378: 53–57, 2007.
16. Migliore L., Civitareale C., Cozzolino S., Casoria P., Brambilla G., Gaudio L. 1998. Laboratory models to evaluate phytotoxicity of sulphadimethoxine on terrestrial plants. *Chemosphere*, 37: 2957–2961.
17. Jebara S., Jebara M., Limam F., Aouani M. E. 2005. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress, *J. Plant Physiol.*, 162, 929-936.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ ЧАСТИ I

A - Z			
Adomas B.	388,396,400,404	Беляев Д.В.	264
Ahmet Sami Erol.	390	Бердичивец И.Н.	126
Caus M.	385	Берников Л.Р.	315
Dascaliuc A.	385	Бинюков В.И.	221
Dobiesz M.	388,396,400,404	Бободжанова Х.И.	172
Fatih Er	392	Богданова Е.С.	175
Gieczewska K.	149	Бойкова Н.В.	178
Margas M.	388,396,400,404	Борисова Е.В.	291
Mehmet Ögüt.	394	Боровик О.А.	42
Piotrowicz-Cieślak A.I.	388,396,400,404	Брейгина М.А.	81
Rydzyski D.	388,396,400,404	Брилкина А.А.	160
Serkin N.V.	153	Букарева И.В.	99
Vashchenko V.F.	153	Бурыгин Г.Л.	178
Vedenicheva N.P.	156	Бурьянов Я.И.	249
Ziółkowska A.	388,396,400,404	Буткин А.В.	203
A		Буценко Е.С.	294
Абдулалишоева С.Ф.	172	Буянкин Н.И.	181
Авдеева Е.С.	178	Быкова Е.А.	28
Агеева М.Н.	160	Быстрова Е.И.	31
Азизов И.В.	232	B	
Албантова А.А.	221	Вагапова Т.И.	184
Алейнова О.А.	55	Валеева (Иванчина) Н.В.	39
Алексеева В.В.	249	Валледор Л.	108
Алиева З.М.	165	Васько П.П.	252
Али-заде А.М.	162	Велегжанинов И.О.	42
Алирзаева Э.Г.	162	Великсар С.Г.	194
Алтаева Н.А.	368	Ветошкина Д.В.	99
Андреев И.М.	16	Викторова Л.В.	132
Андрюшечкина Г.В.	168, 363	Виноградов Н.С.	33
Аникеева А.Э.	279	Винокурова Р.И.	333
Архипов Д.В.	277	Владимиров В.П.	297
Асадова С.Ш.	232	Владимиров К.В.	297
Афанасьева К.С.	208	Войников В.К.	42
Ахатова А.Р.	19	Войтенко Л.В.	36
Ахметова Д.Ш.	285	Володина Н.А.	187
B		Волотовский И.Д.	25
Бабаева С.Х.	172	Воробей Н.А.	360
Баик А.С.	22	Воробьев Н.В.	189
Бакакина Ю.С.	25	Воротников Б.Ю.	192
Балмуш Г.Т.	318	Вульфферт Е.А.	344
Баранова Е.Н.	170, 211	Высоцкая Л.Б.	118, 200
Баташева С.Н.	137	Высоцкая О.Н.	197, 346
Бедбенов В.С.	58	Г	
		Габбасова И.М.	200

Гаджимустапаева Е.Г.	230	Зартдинова Р.Ф.	16
Гаевский Н.А.	349	Захарова Е.В.	72
Гарипова С.Р.	39	Захожий И.Г.	203
Гармаш Е.В.	42	Зинатуллина А.Е.	267
Генерозова И.П.	221	Зобова Н.В.	349
Гетман И.А.	249	Зорина А.А.	58
Глухова Л.Б.	339	Ибрагимова Р.С.	291
Голденкова-Павлова И.В.	126	И	
Голденкова-Павлова И.Н.	312	Иваницкий А.Е.	294
Головацкая И.Ф.	45, 47, 113, 187	Иванов Б.Н.	99
Головки Т.К.	42, 203	Иванов В.Б.	31
Грабельных О.И.	42	Игнатова Л.К.	99
Гребенкина Т.М.	175	Измайлов С.Ф.	16, 86, 84
Гречкин А.Н.	91	Ильинова М.К.	143
Григорай Е.Е.	203	Искакова А.Б.	368
Григорович Л.М.	206, 247, 321	Истомина Е.А.	336
Грушевская М.С.	49	К	
Гулевич А.А.	170, 211	Кабашникова Л.Ф.	218
Гуревич А.С.	208	Казанцева В.В.	224
Гущина Е.В.	129	Казахмедов Р.Э.	60, 227, 230
Д		Караева А.В.	66
Далькэ И.В.	42, 203	Карагезов Т.Г.	231
Данилова М.В.	33	Караушу Е.В.	360
Данилова М.Н.	52	Карначук О.В.	339
Данилова С.А.	170, 211	Карначук Р.А.	339
Дейнеко Е.В.	214	Карпенюк Т.А.	285
Деревягина М.Н.	310	Касимова Р.И.	19
Джафарова А.Б.	162	Каташов Д.А.	235
Долгих Ю.И.	216, 346	Катичева Л.А.	129
Долгов С.В.	184, 244, 354	Киризий Д.А.	238
Долинина В.В.	306, 309	Кириченко Е.В.	241
Дорошенко А.С.	52	Киселев К.В.	55, 63
Дубовская Л.В.	25	Киселева Г.К.	66
Дубровина А.С.	55, 63	Клаус А.А.	78
Е		Клементьева А.А.	244
Евдокимова О.В.	218	Клименко (Сидоренко) Е.С.	69
Евсеева Н.В.	178	Ковалев В.С.	189
Емельянов В.В.	135	Ковалева Л.В.	72
Ермаков И.П.	81	Козаченко И.С.	247
Есенбаева Г.Л.	282, 285	Коковкина Е.В.	42
Ж		Колачевская О.О.	249
Жигачева И.В.	221	Колеснева Е.В.	25
Жуковская Н.В.	31	Комарова У.А.	47
З		Кондрацкая И.П.	252
Завадский В.А.	282	Коростылева Т.В.	336
Загоскина Н.В.	224, 312, 380	Костюкова Ю.А.	255
Зайцев Д.Ю.	105	Костяновский Р.Г.	380

Котова З.П.	377	Миль Е.М.	221
Коць С.Я.	361	Минич А.С.	294
Кочетов А.А.	258	Минич И.Б.	294
Кравец А.В.	261	Миннибаева Ф.В.	132
Краснопёров А.Г.	181	Миронов К.С.	22
Кривошеев Д.М.	276	Митюшкина Т.Ю.	354
Кривошеева А.Б.	264	Мокшин Е.В.	168, 363
Круглова Н.Н.	105, 267	Мостякова А.А.	297
Крутиус О.Н.	380	Мурсалиева В.К.	285
Крылова В.В.	16	Мусатенко Л.И.	36
Кудоярова Г.Р.	118	Муслимова З.Г.	300
Кудрякова Н.В.	33, 52	Мустафаев О.	126
Кузнецов В.В.	33, 52, 78	Мухитова Ф.К.	91
Кузьмина Л.Ю.	200	Н	
Кулаева О.Н.	33, 52	Нам И.Я.	252
Кунакова Е.А.	211	Недбал Л.	108
Куренина Л.В.	170	Ненько Н.И.	66
Курылев М.В.	270	Нестеров В.Н.	175
Курылева А.Г.	270	Никитин А.В.	86
Кустова Т.А.	285	Николаева Д.Л.	261
Л		Новикова Г.В.	58, 89
Лабунская Е.А.	28	О	
Ладыгин В.Г.	273	Обручева Н.В.	110
Лапшин П.В.	380	Оганнисян В.Г.	303
Ларская И.А.	75, 120	Огнева З.В.	63
Леманова Н.Б.	192	Огородникова А.В.	91
Литягина С.В.	110	Одинцова Т.И.	336
Ломин С.Н.	249, 276	П	
Лось Д.А.	58	Павленко О.С.	126
Лукаткин А.С.	168, 324, 363	Панасин В.И.	306, 309
Лысенко Е.А.	78	Паничкин В.Б.	58
М		Пермякова Н.Л.	294
Макеева И.Ю.	279	Плотников Е.В.	339
Максимов Н.М.	81	Подмарьков В. Г.	94
Мальцева Е.Ю.	371	Пожидаева. Е.С.	22
Мамедли С.А.	300	Полтавская Р.Л.	371
Мамедова М.Г.	232	Проворова О.Н.	206
Мамонов Л.К.	282, 285	Прокопьева Ю.П.	135
Маркелова А.Г.	108	Прохорчик И.П.	303
Масленников П.В.	371	Прядехина Е.В.	312
Матвеева Е.М.	377	Пулатова К.Д.	230
Матора Л.Ю.	178	Пухальский В.А.	336
Мацай Н.Ю.	288	Пушин А.С.	244
Мащенко И.Е.	318	Пшеницына Т.С.	189
Медведев С.С.	84	Пшибытко Н.Л.	78
Меледина Т.В.	291, 303	Р	
Мелентьев А.И.	200	Ракитин В.Ю.	31, 72

Ралдугина Г.Н.	170, 211	Столепченко В.А.	252
Рейтер А.Е.	315	Стрзалка К.	146
Репкина Н.С.	97	Стриж И.Г.	49
Рогожин Е.А.	336	Ступко В.Ю.	349
Розенцвет Ю.Е.	175	Сурова Л.М.	129
Романов Г.А.	249, 276	Сухов В.С.	129
Роньжина Е.С.	315	Т	
Руденко Н.Н.	99	Табаленкова Г.Н.	203
Рукавцова Е.Б.	249	Таланова В.В.	97
Румянцева Н.И.	255	Танкелюн О.В.	84
Русу М.М.	318	Тараканов И.Г.	352
Рут Г.Р.	146	Таран Н.Ю.	360
Рыбкина А.В.	321	Тарасова О.В.	84
Рымаренко Д.А.	306, 309	Терешонок Д.В.	216
Рябова А.С.	200	Терещенко С.А.	341
С		Терлецкая Н.В.	368
Савченко Г.Е.	218	Тимербаев В.Р.	244
Садовская Н.С.	126	Тимофеева Г.В.	72
Салмин С.А.	102	Титов А.Ф.	97
Сарсенбаев Б.А.	285	Титова Н.В.	357
Сахабутдинова А.Р.	39	Титова С.М.	354
Седов К.А.	216	Ткаченко О.В.	178
Сельдиминова О.А.	105, 267	Трекозова А.В.	118
Семенова А.С.	324	Третьяков В.О.	360
Сергеева Л.И.	249	Тропин И. В.	115
Серпунина Л.Т.	327	Трофимова О.И.	120
Сечко Н.В.	327	Трутнев А.Ф.	123
Сивцева С.В.	330	Тудораке Г.Ф.	194
Сидачева Е.А.	341	Туркин Н.И.	344
Сидорова Т.Н.	184	Туркина О.Н.	344
Силкина О.В.	333	Тюнин А.П.	63
Синетова М.А.	22, 108	Тюрин А.А.	126
Синькевич И.А.	110	У	
Скаженник М.А.	189	Ульяновская Е.В.	66
Скачовски А.М.	146	Ф	
Скляр Ю.А.	244	Фадеев В.С.	126
Скрыпник Л.Н.	365, 371	Фараджов М.Ф.	300
Славохотова А.А.	336	Фатеева Е.В.	168, 363
Слезина М.П.	336	Федорчук Т.П.	99
Содель Д.Л.	25	Федураев П.В.	365, 371
Соколянская Л.О.	339	Фесенко А.Н.	224
Соловьева А.Е.	258	Фирсов А.П.	354
Соловьева А.И.	216, 346	Фоменко Т.И.	252
Соловьева Е.В.	47, 113	Х	
Стадничук И.Н.	115	Хайленко Н.А.	368
Стасик О.О.	238	Хайруллин Р.М.	39
Стеклов М.Ю.	276	Халилуев М.Р.	170

Харитонашвили Е.В.	69	Ширвани Т.С.	162
Холодова В.П.	264	Широких И.Г.	382
Христенко В.С.	55	Широкова А.В.	380
Хрянин В.Н.	235	Шишкану Г.В.	318, 357
Ч		Шишова М.Ф.	135, 140
Часов А.В.	132	Шмюллинг Т.	276
Чень Т.	135	Шукюров Э.С.	162
Червены Я.	108	Шуляковская Т.А.	143
Чиков В.И.	137	Шуплецова О.Н.	382
Чуб В.В.	28	Щеголев С.Ю.	178
Чупахина Г.Н.	365, 371	Ю	
Чупахина Н.Ю.	371	Юрьева Н.О.	170, 266, 312
Ш		Я	
Шейко Е.А.	374	Якушенкова Т.П.	146
Шерман Л.	108	Яруллина Л.Г.	19
Шерстнева О.Н.	129	Ясаулова Ш.К.	172
Шерудило Е.Г.	377		

Научное издание

**Материалы Международной научной конференции
и школы молодых ученых**

**«Физиология растений – теоретическая основа
инновационных агро- и фитобиотехнологий»**

Часть I

Ответственный редактор Роньжина Елена Степановна

**Proceedings of the International scientific conference
and School for young scientists**

**«Plant Physiology as a Theoretical Basis for
Innovative Agriculture and Phytobiotechnologies»**

Volume I

Editor Ron'zhina Elena S.

Для оформления стр. 15 и 159 использованы рисунки из кн.: Кефели В.И., Прусакова Л.Д. Химические регуляторы растений / Новое в жизни, науке, технике. – Сер. биология. - № 7. – М.: Знание, 1985. – 64 с.

Подписано в печать 15.05.2014 г. Формат 60×84 (1/16). Печ. л. 26. Тираж 100 экз.

