II МЕЖДУНАРОДНЫЙ СИМПОЗИУМ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ РЕДОКС-МЕТАБОЛИЗМА РАСТЕНИЙ

МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНАЯ ШКОЛА

РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЖИЗНИ РАСТЕНИЙ

Уфа, 26 июня – 1 июля 2017 г.



THE SECOND INTERNATIONAL SYMPOSIUM

MOLECULAR ASPECTS OF PLANT REDOX METABOLISM

THE INTERNATIONAL SCIENTIFIC SCHOOL

THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN PLANT LIFE

Ufa, June 26 – July 1, 2017

Федеральное агентство научных организаций
Отделение биологических наук РАН
Общество физиологов растений России
Уфимский научный центр РАН
Институт биохимии и генетики УНЦ РАН
Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН
Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН

МАТЕРИАЛЫ II МЕЖДУНАРОДНОГО СИМПОЗИУМА «МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ РЕДОКС-МЕТАБОЛИЗМА РАСТЕНИЙ» И МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ ШКОЛЫ «РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЖИЗНИ РАСТЕНИЙ»

Уфа, 26 июня – 1 июля 2017 г.



PROCEEDINGS OF THE SECOND INTERNATIONAL SYMPOSIUM MOLECULAR ASPECTS OF PLANT REDOX METABOLISM AND THE INTERNATIONAL SCIENTIFIC SCHOOL THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN PLANT LIFE

Ufa, June 26 – July 1, 2017

Уфа
«Первая типография»
2017

УДК 581.1:57(063)
ББК 28.57
М34

Редакционная коллегия:
Максимов И.В., Минибаева Ф.В., Веселова С.В.,
Бурханова Г.Ф., Сорокань А.В.

Симпозиум и Школа молодых ученых проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований проект № 17-04-20237 и Российского научного фонда проект № 15-14-30008.

М34 **Материалы II Международного симпозиума** «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и Международной научной школы «Роль активных форм кислорода в жизни растений» (Уфа, 26 июня – 1 июля 2017 г.) / ред. И.В. Максимов и др. Уфа : ООО «Первая типография», 2017. 446 с.

Знак информационной продукции **12+**

ISBN 978-5-9909523-9-3

В сборнике представлены материалы II Международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и Международной научной школы «Роль активных форм кислорода в жизни растений». Рассмотрены современные тенденции и достижения в области окислительного метаболизма растений, роли активных форм кислорода в процессах роста, развития и адаптации к биотическим и абиотическим стрессовым факторам, взаимодействии с эндофитными микроорганизмами.

Книга предназначена для научных работников, преподавателей, аспирантов, магистрантов и студентов вузов.

УДК 581.1:57(063)
ББК 28.57

ISBN 978-5-9909523-9-3 ©авторы статей, 2017

Второй международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» посвящен фундаментальным проблемам, связанным с регуляцией редокс-метаболизма растений на молекулярном, биохимическом и физиологическом уровне. Знание о молекулярных механизмах и физиологических последствиях окислительно-восстановительных превращений высокомолекулярных соединений растительной клетки является фундаментальной основной для направленного изменения процессов роста и иммунитета растений, а также понимания детерминирования генетического разнообразия флоры. Окислительно-восстановительные сигнальные системы, контролирующие рецепцию, трансдукцию и амплификацию сигналов различной природы, играют ключевую роль в регуляции важнейших процессов жизнедеятельности растений. Среди метаболических процессов, контролируемых АФК, рост, дифференциация, развитие, стрессовые ответы и клеточная смерть привлекают особое внимание исследователей. Представленные на форуме результаты научных исследований будут способствовать решению многих фундаментальных проблем, связанных с молекулярными механизмами и физиологическими последствиями окислительно-восстановительных превращений высокомолекулярных соединений растительной клетки, с фундаментальными основами направленного изменения процессов роста и иммунитета растений, понимания детерминирования генетического разнообразия флоры и стимулировать развитие регионального и международного научного сотрудничества.

В рамках симпозиума в качестве сателлитного мероприятия планируется Школа молодых ученых «Роль активных форм кислорода в жизни растений».

The second international Symposium "Molecular aspects of plant redox metabolism" is dedicated to fundamental problems of the regulation of plant redox metabolism on the molecular, biochemical and physiological levels. Knowledge of the molecular mechanisms and physiological consequences of redox transformations of high-molecular compounds of a plant cell is fundamental basis for directional changes of plant growth and immunity processes, as well as for understanding the determinants of the genetic diversity of flora. Redox signaling systems that control the reception, transduction and amplification of signals of a different nature play a key role in the regulation of vital processes in plants. Among the metabolic processes controlled by ROS, growth, differentiation, development, stress responses and cell death attract particular attention of researchers. The results of scientific research presented at the forum will contribute to the solution of many fundamental problems associated with the molecular mechanisms and physiological consequences of redox transformations of high-molecular compounds of plant cells, with the fundamental principles of directed changes in plant growth and immunity processes, understanding the determinants of the genetic diversity of flora and stimulating the development of regional and International scientific cooperation.

Within the framework of the symposium, the School of Young Scientists "The Role of Reactive Oxygen Forms in Plant Life" is planned as a satellite event.

СО-ПРЕДСЕДАТЕЛИ

Ф.В. Минибаева (д.б.н., проф., Казанский институт биохимии и биофизики, КазНЦ РАН, Казань)

И.В. Максимов (д.б.н., проф., Институт биохимии и генетики, УНЦ РАН, Уфа)

УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ

С.В. Веселова (к.б.н., Институт биохимии и генетики, УНЦ РАН, Уфа)

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ

И.А. Тарчевский, (д.б.н., академик РАН, Казанский институт биохимии и биофизики, Казань, Россия)

Ф.В. Минибаева (д.б.н., зав. лаб. окислительно-восстановительного метаболизма Казанский институт биохимии и биофизики, Казань, Россия)

И.В. Максимов (д.б.н., профессор, зав. лаб. биохимии иммунитета растений Институт биохимии и генетики, Уфа, Россия)

R.P. Beckett (профессор, Университет КваЗулу-Натал, ЮАР)

Г.В. Новикова (д.б.н., в.н.с. лаборатории клеточной регуляции Институт физиологии растений им. Тимирязева, Москва, Россия)

В.В. Демидчик (д.б.н., доцент, зав. каф. клеточной биологии и биоинженерии Белорусский госуниверситет, Минск, Беларусь; Ботанический Институт им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург, Россия)

Б.Н. Иванов (д.б.н., профессор, зав. лаб. фотосинтетического электронного транспорта Институт фундаментальных проблем биологии, Пущино, Россия)

Ф.М. Шакирова (д.б.н., профессор, зав. лаб. молекулярных механизмов устойчивости растений к стрессам Институт биохимии и генетики, Уфа, Россия)

Г.Р. Кудоярова, д.б.н., профессор, зав. лаб. физиологии растений, Уфимский институт биологии, Уфа, Россия)

О.В. Войцеховская, к.б.н., зав. лаб. (Ботанический Институт им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург)

Ю.Е. Колупаев (д.б.н., профессор, зав. каф. ботаники и физиологии растений Харьковский национальный агроуниверситет, Харьков, Украина)

А. Yili (д.б.н. Синзянский технический институт, Урумчи, КНР)
А.А. Ахунов (д.б.н., проф., зав. лаб. химии ферментов Институт биоорганической химии, Ташкент, Узбекистан)
М.Ф. Шишова (д.б.н., проф., Санкт-Петербургский госуниверситет, Санкт-Петербург)

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ

В.В. Демидчик (д.б.н., проф., Белорусский госуниверситет, Минск; Ботанический Институт им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург)
О.В. Войцеховская (к.б.н., Ботанический Институт им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург)
Сотрудники Института биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа:
д.б.н., проф., В.А. Вахитов, д.б.н., Ф.Р. Гималов, д.б.н., проф., Ф.М. Шакирова, д.б.н., Л.Г. Яруллина, д.б.н., проф. Р.М. Хайруллин, к.б.н., А.В. Сорокань, к.б.н., Г.Ф. Бурханова, к.б.н., Е.А. Черепанова, к.б.н., Д.К. Благова, к.б.н. Безрукова М.Н., к.б.н., Р.А. Юлдашев, к.б.н., А.М. Авальбаев, к.б.н., Ч.Р. Аллагулова, к.б.н., Д.Р. Масленникова, к.б.н., А.Р. Лубянова, к.б.н., Р.Р. Гарафутдинов, к.б.н., А.Р. Сахабутдинова, к.б.н., А.Ш. Валеев.

СОДЕРЖАНИЕ

МАТЕРИАЛЫ СИМПОЗИУМА	21
In vivo **imaging of mitochondrial ROS flashes and chondriome dynamics in the wheat non-green organ cells** Y. R. Abdrakhimova , F. A. Abdrakhimov	21
Redox metabolism in the apoplast of lichenized fungi: mechanisms and roles in lichen biology R.P. Beckett and F.V. Minibayeva	24
Environmental stress promotes glycation of plant proteins T.E. Bilova, E.M. Lukasheva, G. Paudel, D. Brauch, E.R Tarakhovskaya, A. Kim, T. Vogt, G.U. Balcke, C. Birkemeyer, L.A. Wessjohann, A.A. Frolom	26
Re-arrangement of TCA cycle in Arabidopsis under hypoxic stress relies on enhanced phytoglobin expression and GABA shunt activation O. Blokhina, P. Törönen, P. Lackman, S. Sutela, B. Li, H. Rischer, P.Auvinen, H. Maaheimo, P.T. Kallio, H. Häggman, K.V. Fagerstedt	28
Ion channels play the role of sensors FOR reactive oxygen species in plants Demidchik V.	32
Genetic approaches to understand how plants cope with genotoxic stress and maintain genome stability J.H. Doonan, C. Nibau, Fiona Corke, R. Mathews, D. Thorogood, J.Macduff, A. Talalaiev, L. Kashparova, V. Mackievic, S. Zvanarou, M.Makavitskaya, V. Demidchik, G. Shevchenko	33
The nature of photosynthetic excitations: ideas and on-going challenges A.Freiberg	36
Impact of plant protein glycation in ageing and stress response: potential mechanisms, biochemistry and biological role A.A. Frolov, T.E. Bilova, G. Paudel, U.M. Herfurth, N.E. Shilyaev, E.M. Lukasheva, D. Brauch, E.R Tarakhovskaya, N.V. Frolova, N.G. Osmolovskaya, T. Vogt, G.U. Balcke, A. Tissier, C. Milkowski, C.Birkemeyer, L.A. Wessjohann	38

ROS participation in heat resistance induction in plant cells by hydrogen silfide donor Yu. E. Kolupaev, E. N. Firsova, T. O. Yastreb	40
Влияние солей тяжелых металлов на физиолого-биохимические показатели проростков пшеницы Г.А. Абилова, П.Ш. Шагрудинова	43
Влияние метилжасмоната на содержание и тирозиновое фосфорилирование антиоксидантных ферментов у проростков пшеницы в условиях дефицита влаги А.М. Авальбаев, Р.А. Юлдашев, К.А. Федорова, Д.Р. Масленникова, Ч.Р. Аллагулова, Р.И. Гильманова, Н.В. Петрова, Е.О. Федина, Ф.Г. Каримова, Ф.М. Шакирова	46
Вклад дегидринов в антиоксидантную защиту растений Ч.Р. Аллагулова, Ф.М. Шакирова	48
Роль активных форм кислорода в действии абсцизовой кислоты на гидравлическую проводимость и аквапорины растений ячменя Г.Р. Ахиярова, Г.В. Шарипова, С.Ю. Веселов, Д.С. Веселов	52
Содержание гормонов в клетках зародыша и влияние перекиси водорода и абсцизовой кислоты на прорастание зерновок пшеницы и ячменя Г.Р. Ахиярова, Г.В. Шарипова, С.Ю. Веселов, Д.С. Веселов	56
Влияние глицирризинатов как индукторов устойчивости хлопчатника к фитопатогенам *Fusarium oxysporum* и *Verticillium dahlia* А.А. Ахунов, Н.Р. Хашимова, М.А. Мамасолиева, С.Б. Наврузов	59
Клеточные мишени абиотических стрессовых факторов на уровне ультраструктуры Е.Н. Баранова, И.Г. Широких, Л.В Куренина, А.А. Гулевич	62
Повышение уровня активных форм кислорода, вызванное засолением, вызывает реорганизацию цитоскелета в клетках корней томата Е.Н. Баранова, Е.М. Лазарева, И.А. Чабан, Н.В. Кононенко, Е.А. Смирнова	66

Гистохимический анализ состояния редокс-систем в связи с устойчивостью пшеницы к кадмию М.В. Безрукова, А.Р. Лубянова, Ф.М. Шакирова	70
Влияние эндофитных микроорганизмов на генерацию в растениях активных форм кислорода Д. К. Благова, Е. Р. Сарварова, Р.М.Хайруллин, И.В. Максимов	74
Влияние мелатонина на редокс-процессы в растениях Е.В. Бойко, А.Н. Видершпан, Е.В. Симон, И.Ф. Головацкая	78
Влияние многослойных углеродных нанотрубок на уровень активных форм кислорода в клетках растений К.П. Бурая, Л.Н. Скрыпник, Н.Н. Шушарина	80
Участие редокс-чувствительных транскрипционных факторов в защите растений пшеницы при развитии септориоза Г.Ф. Бурханова, С.В. Веселова, Т.В. Нужная, И.В. Максимов	83
Влияние эффектора *Tox3* фитопатогенного гриба *Septoria nodorum* на про-/антиоксидантный статус растений пшеницы С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов	87
Роль редокс-процессов и селена в регуляции роста каллусной культуры клеток *Saussurea orgaadayi* И.Ф. Головацкая, А.В. Чигинцова, Е.В. Бойко, А.Н. Видершпан, Ю.В. Медведева	93
Оценка антиоксидантного статуса как модель при исследовании устойчивости хлопчатника к хлоридному засолению З. Голубенко, А.А. Ахунов, К.М. Кулдошева, С.Б. Наврузов, Г.А. Акбарова	95
5-Аминоурацил и его производные в реакции с пероксильными радикалами С.А. Грабовский, Н.М. Андрияшина, Ю.С. Грабовская, А.В.Антипин, Н.Н. Кабальнова	99
Регуляция фитогормонами свободнорадикальных процессов растений кукурузы в условиях дефицита кислорода и CO_2-среды А.Н. Ершова, О.С. Бердникова	101
Антиоксиданты в качестве регуляторов роста растений И.В. Жигачева, Т.А. Мишарина	104

О возможности использования экзогенных фенольных соединений в качестве редокс-регуляторов для растений Н.В. Загоскина, Т.Н. Николаева, Т.Л. Нечаева, П.В. Лапшин, В.В. Казанцева, Е.А. Гончарук	108
Окислительная ступень пентозо-фосфатного цикла в условиях солевого и медного стрессов у растений вейгелы цветущей в культуре *in vitro* О.А.Землянухина, В.Н.Калаев, В.С.Воронина	111
Активные формы кислорода в хлоропласте: продукция, детоксикация и сигнальная функция Б.Н. Иванов, Д.В. Ветошкина, М.А. Козулева, М.М. Борисова-Мубаракшина	115
Точки изменения активности аскорбат-глутатионового цикла в процессе прорастания семян и роста проростков озимого ячменя А.С. Казакова	119
О роли антиоксидантных ферментов в адаптации ячменя к низкой положительной температуре Н. М. Казнина, Ю. В. Батова, Н. С. Репкина, Г. Ф. Лайдинен, А. Ф. Титов	121
Роль NO в развитии теплоустойчивости клеток колеоптилей пшеницы при действии брассиностероида Ю.В. Карпец, Ю.Е. Колупаев, В.А. Хрипач	125
Реакция антиоксидантной системы растения картофеля на совместное действие регуляторов роста мелафена и микроэлементов меди и селена И.Г. Кириллова	129
Функционирование антиоксидантной системы защиты растений яблони в период воздействия высокотемпературного стресса Г.К. Киселева, Н.И. Ненько, В.В. Шестакова, А.В. Караваева, Е.В. Ульяновская	133
Взаимодействие гормонов и активных форм кислорода в регуляции адаптивных реакций растений Г.Р. Кудоярова	136

Влияние рост стимулирующих и гормон продуцирующих бактерий на уровень оксидативного стресса у растений пшеницы при засолении Г.Р. Кудоярова, Т.Н. Архипова, Л.Ю Кузьмина, С.Ю. Веселов	137
Влияние дефицита фосфора на рост корней, продукцию активных форм кислорода и содержание гормонов у растений ячменя Г.Р. Кудоярова, Л.Б. Высоцкая, А.В. Феоктистова, И.И. Иванов, Д.Ю. Зайцев, З.А. Ахтямова, С.Ю. Веселов	141
Роль пероксидаз и изофлавонов в адаптации сои к окислительному стрессу В.А. Кузнецова, М.П. Михайлова, Л.Е. Иваченко	145
Влияние эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* на оксислительный стресс растений, вызванный тяжелыми металлами З. М. Курамшина, Ю. В. Смирнова, Р. М. Хайруллин	147
Эффект обработки проростков пшеницы цитокинином и метилжасмонатом на содержание пролина в условиях дефицита влаги А.Р. Лубянова, А. Плотников, Ф.М. Шакирова	150
Роль АФК в сигнальной регуляции фитоиммунитета И.В. Максимов	154
Участие АФК в регуляции прорастания пыльцевого зерна голосеменных и покрытосеменных растений Н.М. Максимов, Д.В. Абрамочкин, М. А. Брейгина	158
Редокс-реакции в листьях *Ceratophyllum demersum* L. при действии мочевины и тяжелых металлов (Ni^{2+} и Cu^{2+}) М.Г. Малева, Н.В. Чукина, Г.Г. Борисова	162
Роль компонентов аскорбат-глутатионового цикла в проявлении защитного действия салициловой кислоты на растения пшеницы при засолении Д.Р. Масленникова, Ф.М. Шакирова	166
АФК, аутофагия и энергетические сенсоры в клетках растений при стрессе Ф.В. Минибаева	169

Действие стевиозида на окислительный статус клеток растений пшеницы А.Л. Михайлов, Ю.Ю. Невмержицкая, О.А. Тимофеева	171
Возможные пути образования активных форм кислорода на комплексах Cu(II) с пиримидиновыми основаниями нуклеиновых кислот В.Ю. Мишинкин, Т.Р. Нугуманов, О.В. Акчурина, С.П. Иванов, С.А. Грабовский, Н.Н. Кабальнова, Ю.И. Муринов	175
Участие компонентов антиоксидантной системы в регуляции фуллеренолом физиолого-биохимических процессов в проростках злаковых культур О.В. Молчан, Д.С. Мороз, Т.А. Скуратович, П.А. Драгун	178
Влияние стевиозида на про- и антиоксидантный статус растений пшеницы, инфицированных фитопатогенами Ю.Ю. Невмержицкая, Г.Х. Шаймуллина, О.А. Тимофеева	182
Влияние засухи на редокс-реакции в растениях винограда Н.И. Ненько, И.А. Ильина, Г.К. Киселева, Т.В. Схаляхо	185
Ферменты антиоксидантной системы в разных сценариях ксилогенеза К.М. Никерова, Н.А. Галибина, Ю.Л. Мощенская, Л.Л. Новицкая	188
Редокс регуляция клеточного цикла у растений Г.В. Новикова, К.С. Миронов, А.В. Носов, А.А. Фоменков	192
Участие редокс-процессов в старении лепестков и время жизни цветов в вазе О.Ф. Панфилова, Н.В. Пильщикова	196
Хелатные микроудобрения с антиоксидантным эффектом В.М. Пахомова, А.И. Даминова, И.А. Гайсин	199
Связана ли редокс-модуляция осмотической водной проницаемости плазмалеммы с изменением редокс-статуса PIP-аквапоринов? М.С. Пиотровский, Н.К. Лапшин, М.С. Трофимова	203
Роль активных форм кислорода в защите пшеницы с чужеродными генами от биотрофного ржавчинного гриба *Puccinia triticina* ERIKSS. Л.Я. Плотникова, В.Е. Пожерукова	205

Редокс-зависимая реорганизация цитоскелета клеток корня под действием стрессовых и регуляторных воздействий Г.А. Пожванов, С.С. Медведев, К. Виссенберг, В.В. Демидчик	208
Изменеия ультраструктуры хлоропластов растений табака в процессе защиты от окислительного стресса при гипотермии В.Н. Попов, О.В. Антипина, Н.В. Астахова	211
Редокс-активные низкомолекулярные соединения вакуолей Е.В. Прадедова, О.Д. Нимаева, А.Б. Карпова, Р.К. Саляев	213
Влияние селенит-йонов и кофейной кислоты на показатели водообмена *Solanum tuberosum* в условиях декструкции микротрубочек Т.И. Пузина, И.Ю. Макеева, Н.С. Власова	217
Генерация АФК, редокс-состояние пластохинонов и тиоредоксина и функционирование альтернативных путей транспорта электронов в хлоропластах в норме и при тпловом стрессе Н.Л. Пшибытко	221
Влияние нитрата свинца на активность растительной каталазы прорастающих семян пшеницы Г.В.Решетник, Н.С.Задиранова	222
Окислительно-восстановительный гомеостаз *Artemisia santonica* в условиях Приэльтонья О.А. Розенцвет, В.Н. Нестеров, Е.С. Богданова	226
Аутофагические белки *Triticum aestivum*: *in silico* идентификация и взаимодействие с ATG8 В.В. Рябовол, Ф.В. Минибаева	230
Влияние *Fusarium solani* на ключевые компоненты аскорбат-глутатионового цикла суспензионных клеток картофеля О.А. Сапко, О.В. Чебоненко, А.К. Турсунова, А.Ж. Амиркулова, А.О. Абайлдаев, А.Ш. Утарбаева	233
Влияние метаболитов *Fusarium solani* на формирование редокс-статуса клеток и тканей картофеля О.А. Сапко, О.В. Чебоненко, А.К. Турсунова, А.Ж. Амиркулова, А.О. Абайлдаев, А.Ш. Утарбаева	235

Редокс статус растений при воздействии переменного магнитного поля, гипертермии и их сочетании Я.В. Середнева, А.П. Веселов, Ю.В. Синицына	238
Регуляция активности окислительных ферментов *Zea mays* L. в условиях осмотического стресса Н.А. Собчук, С.И. Чмелёва	242
Окислительные процессы и антиоксидантные ответы у винограда при заражении грибными патогенами М.А. Сундырева	246
Регуляция автофагии у растений при стрессовых воздействиях Е.В.Тютерева, К.К. Рабаданова, А.Н. Иванова, К.С. Добрякова, В.В. Демидчик, О.В. Войцеховская	248
Текучесть мембран и редокс-контроль стрессовых ответов у цианобактерий П.В. Федураев, Е.Г. Максимов, К.С. Миронов, М.А. Синетова, А.А. Зорина, Д.А. Лось	251
Роль протеиногенных аминокислот ароматического ряда в регуляции синтеза полифенолов высших растений П.В. Федураев, Л.Н. Скрыпник, Г.Н. Чупахина	254
Синтетические пептидные элиситоры как редокс-регуляторы в растениях Г.Г. Филипцова, В.М. Юрин	256
Исследование активных форм кислорода во взаимоотношении трансгенных растений, экспрессирующих гены антимикробных пептидов цекропина Р1 и бомбинина, с ассоциативными микроорганизмами О.В. Фурс, Н.С. Захарченко, С.В. Пиголева, Т.В. Шевчук, О.В. Дьяченко, Я.И. Бурьянов	260
Устойчивость растений к грибным патогенам: «обратные стороны медалей» АФК и перспективный балансир «редокс-качелей» Р.М. Хайруллин	263

Влияние обработки семян хлопчатника супрамолекулярным комплексом глицирризиновой и салициловой кислот на содержание салициловой кислоты и антиоксидантный баланс Н.Р. Хашимова, А.А. Ахунов, М.А. Мамасолиева	267
Метаболомный анализ экстраклеточных субстратов пероксидазы в корнях пшеницы А.В. Часов, О.П. Гурьянов, Ф.В. Минибаева	270
Пероксидаза как источник активных форм кислорода в растениях А.В. Часов, Ф.В. Минибаева	273
Влияние липопептидов *Bacillus subtilis* 11 ВМ на компоненты про-/антиоксидантной системы растений пшеницы в норме и при инфицировании *Septoria nodorum* Berk. Е.А. Черепанова, Д.К. Благова, И.В. Максимов	277
Опыт использования проточного цитрометра Attune® NxT в изучении терапевтического эффекта моноклональных антител к трансмембранным белкам человека hPD-L1 Чухряева М.И., Смольянинова Л.В.	279
Активность пероксидазы в проростках злаковых культур при засолении и действии гербицидов О.Г. Яковец, В.В. Ивановский, А.С. Мороз	281
Активность антиоксидантных ферментов при действии *Trichoderma harzianum 203* Т.П. Якушенкова, М. Хади	285
АФК в регуляции активности PR-белков при индуцированной устойчивости растений Л.Г. Яруллина, Р.И. Касимова, Г.Ф., Бурханова, М.В. Муратова, Е.А. Черепанова	288
Влияние пероксида водорода на солеустойчивость салицилат-дефицитных трансформантов арабидопсиса *NahG* Т.О. Ястреб, Ю.Е. Колупаев, А.П. Дмитриев	292

МАТЕРИАЛЫ ШКОЛЫ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ	297
Polyamines modify stress-induced signaling reactions and trigger programmed cell death in Arabidopsis roots A.A. Chychko, V. Mackievic, G. Pozhvanov, D. Svistunenko, S. Subramaniam, V. Samohina, E.A. Klimova, E.V. Tyutereva, Ю.В. Кирисюк, S. Medvedev, O.V. Voitsekhovskaja, V. Demidchik	297
Role of redox-active metabolites upon light and mechanical local stimuli in *Chara corallina* A. Komarova, P. Gorelkin, A. Erofeev, T. Bibikova, A. Bulychev	301
Exogenous L-ascorbic acid acts as a signaling agent in plant cells M. Makavitskaya, I. Navaselsky, D. Svistunenko, K. Rabadanova, O. Voitsekhovskaja, E. Tyutereva, P. Chikun, V. Mackievic, V. Samohina, D. Straltsova, A. Sokolik, V. Demidchik	305
Peroxidase isoforms from *Dicranum scoparium* HEDW.: pro- and antioxidative activities A.O. Onele, A.V. Chasov, L.V. Viktorova, F.V. Minibayeva	307
Regulatory properties of brassinosteroids in artificially induced oxidative stress in E.coli and P. auraginosa S. Stanisheuski, M. Shapiro	309
Mass spectrometric analysis of plant glycation and oxidation products M.V. Vikhnina, A.V. Soboleva, T. Mehmood, E.V. Romanovskaya, G.N. Smolikova, S.S. Medvedev, A.A. Frolov	311
Antioxidant activity of peroxidase system in cell fractions and nuclear suprastructures during germination of etiolated wheat germs G.H. Vafina, R.S. Ivanov, E.A. Ivanova	313
Salt stress induces generation of ROS and single- and double-strand DNA breaks in *Physcomitrella* S. Zvanarou, V. Mackievic, K.J. Angelis, V. Demidchik	317
Влияние бактерий рода *Pseudomonas* на редокс-активность плазмаллемы фотосинтезирующих клеток пшеницы в модельных экспериментах М.В. Апёнышева, О.М. Минаева, Е.Е. Акимова, Т.И.Зюбанова	320
Окислительный стресс у ряски малой при воздействии тяжелых металлов И.С. Боднарь, Е.В. Чебан, В.Г. Зайнуллин	324

Влияние холодового закаливания на содержание пероксида водорода в митохондриях из листьев озимой пшеницы О.А. Боровик, О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова	327
Изменения стеринового компонента и редокс-статуса корней пшеницы в условиях гипотермии Ю.Н. Валитова, А.Г. Сулкарнаева, А.В. Белкина, С.А. Дмитриева, Ф.К. Мухитова, Ф.В. Минибаева	330
Продукция синглетного кислорода и формирование плазмодесм в листьях и апикальных меристемах побега мутанта ячменя *CHLORINA- f2*^{3613} В.А. Дмитриева, А.Н. Иванова, А.И. Евкайкина, Е.А. Климова, Е.В. Тютерева, О.В. Войцеховская	333
Значение активных форм кислорода для прорастания пыльцевых зерен *Picea pungens* ENGELM А. А. Евменьева, М. А. Брейгина	336
Влияние низкотемпературного закаливания на антиоксидантную систему озимой пшеницы А. А. Игнатенко, В. В. Таланова, А. Ф. Титов, Н. С. Репкина, Ю. В. Венжик, К. М. Панфилова	340
Воздействие импульсного магнитного поля на содержание продуктов перекисного окисления липидов в тилакоидах гороха сортов Альбумен и Шустрик Е.А. Кальясова, Ю.В. Синицына, А.П. Веселов	343
Рост трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена глутатион-S-трансферазы *Arabidopsis thaliana* при норме и действии стрессовых факторов Б.Р. Кулуев, З.А. Бережнева, Б.Н. Постригань, Э.А. Баймухаметова	346
Индукция антиоксидантной системы *Triticum aestivum* L. бактериями *Bacillus subtilis* 10-4 в условиях дефицита влаги О.В. Ласточкина, Р.А. Юлдашев, Л.И. Пусенкова	348
Доноры оксида азота как индукторы аутофагии в клетках пшеницы А.Б. Мазина, С.А. Дмитриева, Ф.В. Минибаева	351

Роль взаимодействия никеля с гистидином в первичном ответе корня высших растений на «никелевый стресс» В.С. Мацкевич, Д.А. Свистуненко, А.А. Чичко, Ю.В. Кирисюк, О.В. Войцеховская, Е.В. Тютерева, А.И. Соколик, В.В. Демидчик	354
Редокс-регуляция генов стрессовых ответов у цианобактерий К. С. Миронов, П. В. Федураев, А. А. Зорина, Д. А. Лось	359
Влияние серосодержащих фунгицидных препаратов на состояние про-/антиоксидантной системы растений пшеницы Р.А. Набеева, И.А. Ярмухаметова, А.А. Ишмухаметов	363
Фентотипическая изменчивость морфофизиологических показателей растений под влиянием бактерий, выделенных из многолетнемерзлых пород М.В. Нарушко, А.М. Субботин, С.А. Петров	368
Влияние высоких температур на генерацию активных форм кислорода и активность супероксиддисмутазы в листьях пшеницы И. А. Нилова, Л. В. Топчиева, А. Ф. Титов	371
Модификация АФК-сенсора в K^+-канале GORK подавляет активацию наружу-направленной K^+-проводимости под действием гидроксил-генерирующих смесей И.Ю. Новосельский, П.В. Гриусевич, Д.Е. Стрельцова, В.В. Самохина, В.С. Мацкевич, К.С. Добрякова, Е.В. Тютерева, А.М. Малышева, А.И. Соколик, О.В. Войцеховская, В.В. Демидчик	374
Новое направление окислительного метаболизма линолевой и линоленовой кислот в корнях злаков А. В. Огородникова, Т. М. Ильина, Ф. К. Мухитова, А. Н. Гречкин	377
Брассиностероиды и уровень активных форм кислорода в раковых клетках О.В. Панибрат	382
Роль супероксид-аниона в защите пшеницы тимофеева и интрогрессивных линий с ее генами от бурой ржавчины Л.Я. Плотникова, А.И. Дегтярев, В.Е. Пожерукова	386

Участие калия в регуляции автофагии у *Arabidopsis thaliana* в норме и при солевом стрессе К.К. Рабаданова, Е.В. Тютерева, К.С. Добрякова, В.В. Демидчик, О.В. Войцеховская.	390
Влияние салициловой кислоты на активность супероксид-дисмутазы и экспрессию кодирующих ее генов у растений огурца при действии низких температур Н.С. Репкина, В.В. Таланова, А.А. Игнатенко	394
Роль АФК и ферментов про-/антиоксидантной системы в развитии устойчивости растений пшеницы к злаковой тле *Schizaphis graminum* С.Д. Румянцев, Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В.	397
Замена аминокислоты Цистеин-151 в K^+-канале GORK подавляет выход K^+ при окислительном стрессе и снижает чувствительность *Arabidopsis thaliana* к H_2O_2 В.В. Самохина, В.С. Мацкевич, К.С. Добрякова, Е.В. Тютерева, П.В.Чикун, И.Ю. Новосельский, А.М. Малышева, А.И. Соколик, О.В.Войцеховская, В.В. Демидчик	402
Экспрессия генов ацил-липидных десатураз у растений *Arabidopsis thaliana* при низкотемпературном закаливании А.А. Селиванов, О.В. Антипина, В.Н. Попов, И.Е. Мошков	407
Участие NO и АФК в регуляции экспрессии гена *CYCD3;1* в каллусах гречихи, различающихся по гормонозависимости Г.В. Сибгатуллина, А.Н. Акулов, Н.И. Румянцева	409
Повышение устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды под влиянием бактерий из многолетнемерзлых пород Е.О. Симонова, А.М. Субботин, С.А. Петров	413
Антиоксидантная система холодостойких растений при закаливании к холоду М.С. Синькевич	416
Влияние микросимбионтов на содержание перекиси водорода в растениях картофеля при повреждении колорадским жуком А.В. Сорокань, Г.А. Беньковская, Д.К. Благова, Т.И. Максимова	419
Активность лакказы в лищайнике *Cladonia mitis* Д.А. Степанкова, Л.В. Викторова, Ф.В. Минибаева	423

Динамика развития окислительного стресса в проростках озимой и яровой пшеницы под действием холода С.И. Ступак	426
Изменения латеральной подвижности компонентов тилакоидной мембраны и редокс-динамика пластохинонового пула у *Chlorina* мутантов ячменя и арабидопсиса Е.В. Тютерева, А.И. Евкайкина, А.Н. Иванова, О.В. Войцеховская	428
Содержание антоцианов, активность антиоксидантной и энергодиссипирующих систем в листьях *Hylotelephium triphyllum* (HAW.) holub – представителя сем. Толстянковые на севере М.А. Шелякин, И.Г. Захожий, Г.Н. Табаленкова, О.В. Дымова, Р.В. Малышев, И.В. Далькэ, Т.К. Головко	432
Перекисное окисление липидов и карбонилирование белков растений под действием аноксии и оксилительного стресса А.Е. Шиков, В.В. Ласточкин, Т.В. Чиркова, В.В. Емельянов	435
Модуляция активности супероксиддисмутазы красной водоросли *Gracilaria vermiculophylla* при адаптации к солености: роль в стресс-устойчивости И. М. Яковлева, Л. А. Несмелова	438

IN VIVO IMAGING OF MITOCHONDRIAL ROS FLASHES AND CHONDRIOME DYNAMICS IN THE WHEAT NON-GREEN ORGAN CELLS

Y. R. Abdrakhimova [1], F. A. Abdrakhimov [2]

[1] Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia; e-mail: yoldez.abdrahimova@kpfu.ru

[2] Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

IN VIVO ИМИДЖИНГ 'ВСПЫШЕК' МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ АФК И ДИНАМИКИ ХОНДРИОМА В КЛЕТКАХ НЕФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНОВ ПШЕНИЦЫ

Й.Р.Абдрахимова [1], Ф.А.Абдрахимов [2]

[1] ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия, e-mail: yoldez.abdrahimova@kpfu.ru

[2] ФГБУН Институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия

The fundamental feature of respiratory machinery is to generate mitochondrial inner membrane potential ($\Delta\Psi_m$) by extrusion of protons from the matrix coupled with electron flux through the electron transport chain, and constitutive, single-electron leakage from the respiratory chain gives by-products, such as reactive oxygen species (ROS). For a long time, stress-induced ROS elevation has been interpreted as a prevailing sign of oxidative stress caused by mostly antioxidant inefficiency and resulted in cell damage and even death. To date, ROS are assigned a dual part, not only harmful one, but also as stress signalling molecules necessary for successful adaptation to variable environmental conditions. However, subcellular regulation of ROS production and vice versa ROS-dependent regulation of organellar morphofunction remains largely obscure [1]. Striking discrete events of high-located mitochondrial ROS overproduction are ROS flashes, the so-called mitoflashes [2, 3]. Contrary to the basal flashless ROS generation, a bursting mode is discrete and very brief in order to

be detectable by using the routine methods and therefore it requires the application of high-resolution live-imaging at the single-organelle level. At the same time, the existence of these mitoflashes described in animal mitochondria by means of circularly permuted yellow fluorescent protein [3] are still disputed because of their high pH sensitivity hence dramatically bursts of its fluorescence seem to reflect rather transient matrix alkalinisation than changes in ROS overproduction [4]. Although mitoflashes were initially described in cardiac myocyte mitochondria by using the synthetic ROS indicator, such as 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF) [2] which has relative insensitivity to pH ranging from 6.0 to 9.5.

Another dynamic phenomenon, transmembrane potential pulsing, was detected by means of tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) because their accumulation is directly $\Delta\Psi_m$ - dependent. In opposite to mitoflashes [4], pulsing were unambiguously characterised for plant cells as abrupt short-term (typically ~ 20 s) and stress-induced fluctuation of $\Delta\Psi_m$, though merely for Arabidopsis [5].

In our experiments, wheat (*Triticum aestivum* L., winter cv. Mironovskaya 808) seedlings were grown hydroponically on a tap water at 23-25°C for 3d in the dark. Field wheat plants were grown under natural conditions and had well-developed tillering nots responsible for plant winter survival. To establish whether these dynamic phenomena are intrinsic properties of plant mitochondria, we applied multi-tracking analysis for double-loaded samples by incubation in 0.5 μM TMRM and 10 μM DCF for 30 min. Live-cell imaging in a real-time manner allowed us to visualise coordinated flickerings of $\Delta\Psi_m$ and ROS production having been similar for mitochondria of wheat etiolated seedling coleoptile cells (Fig.) as well as the tillering nods cells. Typical curve of pulses had 3 distinct phases, such as abrupt decrease in fluorescent intensity (FI) to background fluorescence, then the delay phase with different durations depending on variety of experimental manipulations, and - finally - the recovery phase with reversion to the baseline (Fig.).

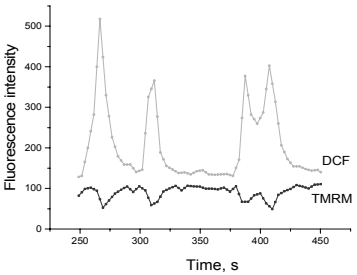


Figure The temporal relationship between changes in fluorescent intensities of TMRM and DCF in a single mitochondrion in the wheat coleoptile cell during monitoring in a real-time manner.

We confirmed that relatively short-term (30-50 s) changes in DCF FI were abrupt and transient, with more than 3-5-folds rise from the basal level and had inverse mirror relationship with pulsing dynamics (Fig.). Thus, high reliable negative Pearson's correlation coefficients between changes in FI of DCF and TMRM suggest the close functional interrelation between observed dynamic events both before and after cold treatment (Fig.). In contrast to mostly irreversible mode of DCF oxidation in animal mitochondria [2, 3], we detected a periodic character of fast cyclic oscillations of DCF FI (Fig.). Notably, the flickering activity was more inherent for immobile mitochondria, frequently physically contacted with the plasma membrane, than for mobile ones. From our results obtained by means of *in vivo* imaging approaches, cold acclimation evoked both a decrease in the dynamic activity and an increase in chondriome heterogeneity via the occurrence of mobile vermiform or disc-shaped organelles with a reduced ability to produce ROS in a flash manner. Previously, using transmission electron microscopy, we described *in situ* dramatic chondriome heterogeneity owing to expanded and unusual forms of mitochondria occurred in the tillering node cells of the field wheat plants during autumn adaptation [6].

To summarise, through living-cell imaging of mitochondrial morphological and functional dynamics in the wheat different non-green organ cells, we first have obtained significant experimental evidence of the periodic and mitochondria-originating dynamic phenomena of membrane potential pulsing - ROS flashing which depended on mitochondrial behaviour. In our report, it will be discussed the possible physiological meaning of the chondriome morphofunctional alterations as well as some challenges and limitations of using fluorescent probes to detect ROS production of mitochondrial origin, including *in vitro* [7].

1. Dietz, K.-J., Mittler, R. and Noctor, G. (2016). Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling. *Plant Physiology.* 171, 1535-1539.

2. Zorov, D.B., Filburn, C.R., Klotz, L.O. et al. (2000). Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J. Exp. Med.* 192**,** 1001–1014.

3. Wang, W., Fang, H., Groom, L.et al. (2008). Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 134, 279–290.

4. Schwarzländer, M., Logan, D.C., Fricker, M.D. et al. (2011).The circularly permuted yellow fluorescent protein cpYFP that has been used as a superoxide probe is highly responsive to pH but not superoxide in mitochondria: implications for the existence of superoxide 'flashes'. *Biochem. J.* 437, 381–387.

5. Schwarzländer, M., Logan, D.C., Johnston, I.G. et al. (2012). Pulsing of membrane potential in individual mitochondria: a stress-induced mechanism to regulate respiratory bioenergetics in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 1188–1201.

6. Abdrakhimova, I.R., Khokhlova, L.P. and Abdrakhimov, F.A. (1998). Respiration and morphology of mitochondria in the crowns of winter wheat plants exposed to low temperatures and cartolin. *Russ. J. Plant Physiol*. 45, 253-261.

7. Abdrakhimova, Y. R., Andreev, I. M. and Shugaev, A. G. (2015). Determination of ROS Generation Rates in Plant Mitochondria *in vitro* Using Fluorescent Indicators: Non-Specific Effects of Inhibitors of Terminal Oxidases. *Russ. J. Plant Physiol*. 62, 136–141.

REDOX METABOLISM IN THE APOPLAST OF LICHENIZED FUNGI: MECHANISMS AND ROLES IN LICHEN BIOLOGY

R.P. Beckett [1] and F.V. Minibayeva [2]

[1] *School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, Private Bag X01, Scottsville 3209, South Africa; e-mail: rpbeckett@gmail.com*

[2]*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences, PO Box 30, Kazan, Russia*

Lichens are a symbiosis between an ascomycete and one or more photosynthesizing algae or cyanobacteria, often with small amounts of basidiomycete yeasts. They are important components of many vegetation types, in particular in cold high latitude boreal and artic ecosystems. Lichens stabilize soils and fix nitrogen, and in addition are important winter grazing for reindeer. Their natural habitats are places are characterized by severe abiotic stresses such as desiccation, temperature extremes and high light intensities. Arguably, what makes lichens special, and what separates them from other eukaryotic organisms, is their ability to tolerate extreme stresses. Evidence is accumulating that cell wall redox enzymes play key roles in tolerance. The three main extracellular redox enzymes in lichens are laccases, peroxidases and tyrosinases. Progress is slowly being made in characterizing these enzymes, and elucidating their roles in lichen biology. Laccases and tyrosinases are multicopper oxidase proteins that use molecular oxygen for oxidizing a variety of substrates. Lichen laccases, unlike those from free-living fungi, appear rather large, oligomeric proteins. Conversely, lichen tyrosinases closely resemble these enzymes from free-living fungi. Peroxidases are haem-containing proteins that catalyze the oxidation of diverse substrates in the presence hydrogen peroxide. While the substrate specificity and catalytic properties of lichen peroxidases are like those of fungal DyPs-type peroxidases, sequence analysis suggests that they have a different phylogenetic origin. Both laccases and tyrosinases can detoxify harmful phenolic molecules in the soil. In addition, tyrosinases probably play roles in melanin biosynthesis which protects both photobionts and mycobionts from high light intensities and UV. Lichen peroxidases can both metabolize and synthesize reactive oxygen species. Production of reactive oxygen species can form an “oxidative burst” of may assist wound healing, and deter potential pathogens. Finally, most lichens possess surface quinone reductases that facilitate extracellular redox cycling, which produces hydroxyl radicals. Potential roles of hydroxyl radicals produced by lichens include the breakdown of lignocellulosic residues in the soil which may allow lichens to live a partially saprotrophic existence, and the breakdown of toxic soil compounds. Cell wall redox enzymes are therefore key components of a lichen’s armory of defence mechanisms against stress.

ENVIRONMENTAL STRESS PROMOTES GLYCATION OF PLANT PROTEINS

T.E. Bilova,[1,2] E.M. Lukasheva,[3] G. Paudel,[2,4] D. Brauch,[4] E.R. Tarakhovskaya,[1] A. Kim,[1,4] T. Vogt,[5] G.U. Balcke,[5] C. Birkemeyer,[4] L.A. Wessjohann,[2] A.A. Frolov[2,3]

[1]Department of Plant Physiology and Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, e-mail: bilova.tatiana@gmail.com

[2]Department of Bioorganic Chemistry, Institute of Plant Biochemistry, Halle/Saale, Germany,

[3]Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

[4]Faculty of Chemistry and Mineralogy, Leipzig University, Leipzig, Germany,

[5]Department of Cell and Metabolic Biology, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle/Saale, Germany

In nature, plants are often subjected to enhanced sun irradiation, heat, weak or moderate drought for relatively long periods of time. The plant response to such environmental stress is manifested with simultaneous enhancement of ROS generation and up-regulation of carbohydrate biosynthesis. This might enhance protein glycation, i.e. interaction of carbonyl compounds (carbohydrates and α-dicarbonyls) with lysyl and arginyl side-chains yielding early and advanced glycation end-products (AGEs). AGEs are known to modulate protein structures and functions, and, therefore, might contribute to stress-related protein damage. They are known to be toxic due to their pro-inflammatory properties, clearly exposed in mammals. Generation of AGEs is well-characterized in animal, but not in plant cells. Recently, accumulation of AGE-modified amino acids was demonstrated in the protein extracts of *Arabidopsis thaliana* plants subjected to environmental stress [1]. Later, we characterized plant glycation patterns on a proteome level [2]. Recently, we demonstrated, that even weak drought resulted in enhanced glycation at specific protein sites [3]. Here we report the changes in *Arabidopsis* glycated proteome, induced by high light.

Seven week-old *A. thaliana* plants, grown under short day (8h light /16h darkness) conditions, were subjected to high light (700 μmol photons m^{-2} s^{-1}) in parallel to normally irradiated controls (150 μmol photons m^{-2} s^{-1}). After this period, the treated plants were transferred to the normal light conditions for further three weeks (recovery). The plant stress response was characterized by a panel of biochemical stress markers. Direct and delayed (i.e. observed during the recovery period) effects of high light stress on plant proteome and metabolome were assessed by bottom-up proteomics (LCxLC-ESI-Orbitrap-LIT-MS/MS data-dependent acquisition experiments) and metabolomics (GC-EI-Q-MS).

The high light-treated plants showed signs of oxidative stress, as could be judged from increased levels of H_2O_2, lipid hydroperoxides and thiobarbiturate (TBA)-reactive compounds. However, the contents of α-dicarbonyl contents and GSH/GSSG ratio were increased, whereas the ascorbate/dehydroascorbate ratio was not changed. During the recovery phase, all mentioned stress markers recovered to the initial levels, while α-dicarbonyls restored their originally high levels. This period was also accompanied with ascorbic acid depletion and pronounced accumulation of carbohydrates. The proteomic analysis revealed only negligible qualitative alterations in *Arabidopsis* glycated proteome: only 12 and 8 proteins comprising 14 and 8 AGE modifications were found to be specific for light stress and recovery periods, respectively. Moreover, the total number of glycated proteins was not changed under enhanced irradiation and was even lower at the end of the recovery time (641 AGE-modified proteins vs 714 in control). This decrease in the number of glycated proteins could be explained by activation of some enzymatic systems eliminating either AGE precursors, or AGE-modified proteins. Further reactions of AGEs to form new unknown products also can be considered. In contrast, the quantitative stress -related changes in glycated proteome were much more pronounced. Thus, more than 150 AGE modification sites were found to be significantly up-regulated, while the abundance of approximately 50 individual AGE-modified positions was decreased. The glycated polypeptides were mostly involved in transcriptional regulation and protein degradation. Remarkably, the effect of light stress could be observed only after recovery phase, but not directly after restoration of light conditions. It can be explained by high carbohydrate contents in this phase. This assumption is in agreement with a simultaneous increase of dicarbonyl levels that might

indicate enhancement of carbohydrate autoxidation. Based on the obtained results we conclude, that light stress causes strong quantitative changes in glycation patterns occurring only at specific sites. Thus, existence of stress-related hotspots of glycation can be assumed. Such glycated proteins accumulate during recovery period but not during the stress application period, that might indicate activation of antiglycative defence under stress conditions.

The research was supported by the Russian Science Foundation (project № 17-16-01042).

1. Bechtold, U., Rabbani, N., Mullineaux, P. M., and Thornalley, P. J. Quantitative measurement of specific biomarkers for protein oxidation, nitration and glycation in *Arabidopsis* leaves // Plant J., 2009. V. 59. P. 661-671.

2. Bilova T, Lukasheva E, Brauch D, Greifenhagen U, Paudel G, Tarakhovskaya E, Frolova N, Mittasch J, Balcke GU, Tissier A, Osmolovskaya N, Vogt T, Wessjohann LA, Birkemeyer C, Milkowski C, Frolov A. A Snapshot of the Plant Glycated Proteome: Structural, Functional and Mechanistic Aspects // J. Biol. Chem., 2016. V. 291(14). P. 7621-7636.

3. Paudel G., Bilova T., Schmidt R., Greifenhagen U., Berger R., Tarakhovskaya E., Stöckhardt S., Balcke G.U., Humbeck K., Brandt W., Sinz A., Vogt T., Birkemeyer C., Wessjohann L., Frolov A. Osmotic stress is accompanied by protein glycation in *Arabidopsis thaliana* // J. Exp. Bot., 2016. V. 67 (22). P. 6283-6295.

RE-ARRANGEMENT OF TCA CYCLE IN ARABIDOPSIS UNDER HYPOXIC STRESS RELIES ON ENHANCED PHYTOGLOBIN EXPRESSION AND GABA SHUNT ACTIVATION

O. Blokhina[1], P. Törönen[2], P. Lackman[2], S. Sutela[3], B. Li[4], H. Rischer[5], P. Auvinen[2], H. Maaheimo[5], P.T. Kallio[6], H. Häggman[3], K.V. Fagerstedt[1]

[1]*Department of Biosciences, Division of Plant Biology, Viikinkaari 1, PO Box 65, FI-00014 Helsinki University, Finland; e-mail: olga.blokhina@helsinki.fi*

[2]*Institute of Biotechnology, Viikinkaari 5, PO Box 56, FI-00014 University of Helsinki, Finland.*

[3]*Department of Ecology and Genetics, PO Box 3000, FI 90014 University of Oulu, Oulu, Finland.*

[4]*College of Life Science, Hebei Normal University, No.20 Road East. 2nd Ring South, Shijiazhuang, 050024,Hebei, China.*

[5]*VTT, Technical Research Centre of Finland Ltd, PO Box 1000, FI-02044 VTT, Espoo, Finland.*

[6]*Institute of Microbiology, ETH Zürich, Vladimir-Prelog-Weg 1-5/10, CH-8093 Zürich, Switzerland.*

Lack of oxygen is a common condition in plants suffering from flooding which causes profound economic losses in crop yield worldwide. In oxygen-limited conditions the coordinated response of core hypoxia-inducible genes prevents overreduction of the cellular milieu caused by NAD(P)H accumulation, averts intracellular acidification and aids in metabolization of the toxic hypoxic metabolites ethanol and acetaldehyde. Carbohydrate flow through glycolysis maintains low energy expenditure, and allows for ATP synthesis [1], [2], [3]. The majority of induced genes are involved in glycolysis and fermentation with clearly defined functions in hypoxic metabolism. However, meta-analysis of hypoxic microarrays revealed paradoxical induction of oxygen consuming enzymes, such as 2-oxoglutarate oxygenases (2OGO) [4], [5]. Their role under hypoxia is not yet understood. Another universal feature of hypoxic response, revealed in virtually every hypoxic experiment, was the upregulation of phytoglobins (formely non-symbiotic hemoglobins), as the first response to low oxygen. The elimination of hypoxically accumulated NO has been deemed as the main function of phytoglobins under hypoxia. Furthermore, the sequence of reactions leading to NO removal by phytoglobins utilize the reducing power of accumulated NAD(P)H, stabilizing the intracellular redox state. The resulting inactive Phytoglobin Fe^{3+} have to be reduced to Phytoglobin Fe^{2+} to complete the cycle. Unlike some bacterial hemoglobins, phytoglobins do not carry a reductase domain and, hence, must rely on external enzymatic reaction for phytoglobin-NO cycle turnover. At present, monodehydroascorbate reductase (MDHAR), an enzyme of ascorbate-glutathione cycle, has been suggested to act in this reaction [6].

Increased NO levels under hypoxia may cause inhibition of NO sensi-

tive TCA cycle enzymes aconitase and oxoglutarate dehydrogenase complex together with mitochondrial electron transport chain complex IV, which may render the conventional operation of the TCA cycle impossible. Indeed, re-arrangement of the TCA cycle has been described in waterlogged *Lotus japonicus* [7], in mature illuminated leaves and developing embryos of *Helianthus annuus* and *Brassica napus*, supporting the idea that the architecture of the TCA cycle is cell type-specific and depends on physiological context of its operation [8]. Several models of the split-mode TCA cycle describe 2-oxoglutarate or its immediate precursors as a bypass node in a partial cycle configuration [7], [8].

These observations combined with the induction of 2OGOs under hypoxia necessitated the exploration of TCA cycle architecture under hypoxia, elucidation of the role of phytoglobins in hypoxic metabolism and assessment of the function of 2OGOs in the context of the modified TCA cycle.

Physiological role of induced phytoglobin expression under hypoxia was assessed by introducing a bacterial hemoglobin (VHb) of *Vitreoscilla sp.* to the cytoplasm and mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. Heterologous expression was chosen to avoid interference with developmental functions of endogenous phytoglobins. VHb shares some similarities with phytoglobins: it has a classic 3-on-3 protein fold and lacks a reductase domain, which is present in other type of bacterial globins and is essential for NO detoxification [9]. Thus, VHb and phytoglobins require the recruitment of a putative reductase to carry out the heme turnover. Global response to hypoxia (2 h and 24 h) was assessed by microarray approach followed by qPCR and by ^{1}H-NMR metabolomics. Growth performance, photosynthetic parameters, mitochondrial respiration and tolerance to hypoxia were also evaluated.

VHb transformants were characterized by distinct metabolite and gene expression signatures. Under hypoxia VHb transformants had a more efficient GABA shunt, up-regulation of hormonal response, preferential induction of circadian rhythm-related transcripts, and had a tendency to be more hypoxia tolerant.

We suggest that phytoglobins enhance hypoxic stress tolerance through a specific mechanism: The NO-inactivated aconitase and 2-oxoglutarate dehydrogenase in the TCA cycle are bypassed through induced 2-OGO using the hypoxic metabolites alanine and GABA, utilizing

the reducing power of ascorbate provided by MDHAR coupled with the Phytoglobin-NO-cycle. Functional 2-OGO bypass would result in sustained TCA cycle turnover, succinate formation for mitochondrial electron transport, reduction of phytoglobin at the expense of ascorbate, subsequent NO removal by phytoglobins under hypoxia and efficient NAD(P)H utilization. Operational 2OGO bypass may constitute a novel function for 2-OGOs under hypoxia.

1. Greenway H., Gibbs J. *Review:* Mechanisms of anoxia tolerance in plants. II. Energy requirements for maintenance and energy distribution to essential processes. Funct Plant Biol. 2003. V. 30. P. 999-1036.

2. Blokhina O., Fagerstedt K.V. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. Plant Physiol Biochem. 2010. V. 48. P. 359-373.

3. van Dongen J.T., Frohlich A., Ramirez-Aguilar S.J., Schauer N., Fernie A.R., Erban A., Kopka J., Clark J., Langer A., Geigenberger P. Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of Arabidopsis plants. Ann Bot. 2009. V. 103. P. 269-280.

4. Pucciariello C., Parlanti S., Banti V., Novi G., Perata P. Reactive oxygen species-driven transcription in Arabidopsis under oxygen deprivation. Plant Physiol. 2012. V.159. P. 184-196.

5. Blokhina O., Törönen P., Fagerstedt K.V. Oxidative stress components explored in anoxic and hypoxic global gene expression data. 2014. In: J. van Dongen, F. Licausi, eds, Low Oxygen stress in Plants. Springer-Verlag Wien, pp. 19-39.

6. Igamberdiev A.U., Bykova N.V., Hill R.D. Nitric oxide scavenging by barley hemoglobin is facilitated by a monodehydroascorbate reductase-mediated ascorbate reduction of methemoglobin. Planta. 2006. V. 223. P. 1033-1040.

7. Rocha M., Licausi F., Araujo W.L., Nunes-Nesi A., Sodek L., Fernie A.R., van Dongen J.T. (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. Plant Physiol. 2010. V.152. P. 1501-1513.

8. Sweetlove L.J., Beard K.F.M., Nunes-Nesi A., Fernie A.R., Ratcliffe R.G. (2010) Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. Trends Plant Sci. 2010. V. 15. P. 462-470.

9. Jokipii-Lukkari S., Frey A.D., Kallio P.T., Haggman H. Intrinsic non-symbiotic and truncated haemoglobins and heterologous *Vitreoscilla* haemoglobin expression in plants. J Exp Bot. 2009. V. 60. P. 409-422.

ION CHANNELS PLAY THE ROLE OF SENSORS FOR REACTIVE OXYGEN SPECIES IN PLANTS

V. Demidchik [1,2]

[1]*Department of Plant Cell Biology and Bioengineering, Biological Faculty, Belarusian State University, 220030, 4 Independence Ave., Minsk, Belarus*

[2]*Komarov Botanical Institute RAS, 2 Professora Popova Street, 197376, Saint-Petersburg, Russian Federation; e-mail: dzemidchyk@bsu.by*

Reactive oxygen species (ROS) are critically important for plants' life. They are generated by intracellular and extracellular mechanisms and accumulate in the apoplastic space, where antioxidant capacity is low. Moderate generation of ROS is necessary for normal physiology and adaptation but their overproduction, for example during severe environmental stresses, results in irreversible oxidative damage and dysfunction of cell components (Demidchik 2015, Environ Exp Bot). The question of sensing ROS is still open in plant physiology. Here, it is proposed that plasma membrane ion channels transporting cations, such as Ca^{2+} and K^+, function as prime targets of ROS in plants. They catalyse initial and very rapid sensing of ROS.

In the plasma membranes of lower and higher plants, ROS instantaneously activate two major classes of ion channels: Ca^{2+}-permeable nonselective cation channels (NSCCs) and K^+ outwardly-rectifying channels (KORs encoded by GORK). Activation of cation channels by ROS leads to dramatic influx of Ca^{2+} for signaling, developmental and nutritional needs and K^+ loss (electrolyte leakage) inducing autophagic and necrotic cell death. Ca^{2+} entry also rearranges actin cytoskeleton and modifies vesicular transport. ROS-activated ion channels reveal complex nature of activation, depending on the developmental stage and oxidative capacity of tested ROS. The transition metal binding centres have recently been iden-

tified in some members of cyclic nucleotide-gated channels, a subclass of NSCCs (Demidchik *et al*. 2014, JXB). These centers potentially produce hydroxyl radicals from H_2O_2 (Haber-Weiss reaction) directly in the channel's macromolecule. Mutations in ROS-sensitive moieties in K^+ efflux GORK channel leads to the decrease of ROS-sensing capacity, suggesting that distinct molecular groups are responsible for ROS sensing by ion channels. These moieties probably confer physiological properties related to ROS, such as programmed cell death and autophagy.

This study was supported by Russian Science Foundation grant#15-14-30008 to VD.

GENETIC APPROACHES TO UNDERSTAND HOW PLANTS COPE WITH GENOTOXIC STRESS AND MAINTAIN GENOME STABILITY

J.H. Doonan[1], C. Nibau[1], F. Corke[1], R. Mathews[1], D. Thorogood[1], J.Macduff[1], A. Talalaiev[2], L. Kashparova[2], V. Mackievic[3], S. Zvanarou[3], M. Makavitskaya[3], V. Demidchik[3,4], G. Shevchenko[2]

[1]National Plant Phenomics Centre, IBERS, Aberystwyth University, Aberystwyth, SY23 3EZ, UK

[2]Cell Biology Department, Institute of Botany NAS Ukraine, 2, Tereshchenkivska St., 01004, Kiev, Ukraine

[3]Department of Plant Cell Biology and Bioengineering, Belarusian State University, Minsk, Belarus

[4]Komarov Botanical Institute RAS, Saint Petersburg, Russian Federation

Plants are sessile organisms that do not have the option to move away when exposed to environmental stress. Their adaptive strategy to such challenges involves metabolic and growth responses. During their life cycle, plants are constantly exposed to genotoxic stress that can reduce growth and productivity while promoting genome instability. For example, as part of harvesting light for photosynthesis, they are exposed to solar irradiation that includes UV-B which can damage DNA, proteins and membranes. Reactive oxygen species (ROS) constitute another source of genotoxic stress (Hossain et al., 2012). The process of inorganic nutrient uptake

from the soil often inadvertently carries in genotoxic compounds such as heavy metals, many of which are harmful to plants at even very low substrate concentrations (Nagajyoti et al., 2010; Mehes-Smith et al., 2013).

Understanding the molecular mechanisms involved in adaptation to these diverse threats is of interest, not only as an academic exercise, but also in devising directed plant breeding leading to the development of tolerant varieties. Insights into the mechanisms of stress tolerance may allow better strategies to be used after pollution incidents, or at least to predict the effects on the environment and people. One example of extensive genotoxic stress is found in the Chernobyl exclusion zone where a nuclear power station exploded in 1986. Today, despite chronic radiation, flora and fauna in the Exclusion zone continue to flourish, evidencing the adaptation of plants and animals to a genotoxic environment. One of the immediate targets of radiation is the genetic material, DNA, and growing vegetation in Chernobyl means that genome of plants is somehow protected from the damage caused by radiation and heavy metals in soil.

To dissect the mechanisms of tolerance, we have utilised genetic approaches based on the model plant *Arabidopsis thaliana* and on the forage crop, Perennial Ryegrass (*Lolium* spp) combined with traditional and high throughput phenotyping. Arabidopsis is a small, rapidly cycling plant that grows across Europe and western Asia, in a wide variety of habitats. *L. perenne* is a globally dominant species of temperate grasslands that can tolerate a broad range of environmental conditions, such as rainfall, altitude, soil type and geochemistry. Based on the assumption that wild accessions will have adapted to local conditions, we are surveying the phenotypic diversity in terms of response to UV-B (Gegas et al., 2014), heavy metals and genotoxic agents, such as mutagens and double strand break-inducing agents.We are also developing and using novel phenotyping methods, including instrumented hydroponics and high throughput micro-phenotyping systems (Burrell et al., 2017) and cell biological approaches to examine effects on genome stability (Zheng et al., 2014).

Arabidopsis accessions from the Chernobyl zone tolerate DNA damaging agents such as bleomycin, MMS and heavy metals (Cd, Pb) much better than control plants from non-polluted areas. qPCR assays show upregulation of genes involved in DNA damage response (DDR), signal transduction pathways which sense DNA breaks and initiate cellular responses. Interacting signaling pathways of DDRs activate DNA repair, cell-

cycle checkpoints and cell death to remove or tolerate lesions in genetic material. In our experiments, expression of *ATR/ATM* kinases was increased after bleomycin and cadmium treatment suggesting role of ATR/ATM-dependent pathway in genome stabilization. Also, downstream expression of *Rad51, BRCA, PARP, Lig4* provide the evidence for the involvement of homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) in the maintenance of genomic stability in Chernobyl plants. Increased expression of *CycB1:1* and *CycB2:1* genes suggests active involvement of cell cycle regulation in response to chronic environmentally induced DNA damage. Understanding how this chronic stress affects different DNA repair pathways as well as cell cycle regulation, PCD, etc provides insight into coping mechanisms to deal with genotoxic stress in anthropogenically contaminated areas (Shevchenko et al., 2017).

Mechanisms of abiotic genotoxicity and DNA breaks involve several biochemical reactions centered on hydroxyl radicals, the most potent oxidisers among ROS (Demidchik et al., 2015). Hydroxyl radical production does not only increase in response to oxygen-activating stresses, such as UV-B, gamma radiation, O_3 or transition heavy metals, but also in the presence of high salinity, Cd, xenobiotics or polluting nanomaterials. Using *Physcomitrella* as a model, we have found that salt stress (high levels of NaCl) can induce single strand DNA breaks via hydroxyl radical dependent mechanism. We have also identified one of the prime sensors for hydroxyl radical and other genotoxic ROS at the cell surface, which locates within the K^+ channel GORK. Plants lacking this channel become more tolerant to oxidisers and have altered gamma radiation and Ni responses. Plants can also produce a number of substances that help them to cope with a genotoxic stress. We have demonstrated that the amino acid histidine, which is a protecting agent against Ni, form redox-active Ni-histidine complexes. These complexes are recognised by the Ca^{2+} signaling system and by cell adaption and reparation machineries.

1. Nagajyoti, P.C., Lee, K.D. & Sreekanth, T.V.M., 2010. Heavy metals, occurance and toxicity to plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8, 199-216.

2. Hossain, M. A., Piyatida, P., Teixaira da Silva, J.A. & Fujita, M. 2012. Molecular mechanisms of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen

species and methylglyoxyl and in heavy metal chelation. *Journal of Botany, 2012, 1-37*.

3. Mehes-Smith, M., Nkongolo, K. & Cholewa, E., 2013. Coping mechanisms of plants to metal contaminated soil. In: Silver, S. & Young, S. (eds) *Environmental Change and Sustainability,* Intech, 53-90.

4. Gegas, V. C., J. J. Wargent, E. Pesquet, E. Granqvist, N. D. Paul *et al.*, 2014 Endopolyploidy as a potential alternative adaptive strategy for Arabidopsis leaf size variation in response to UV-B. J Exp Bot 65**:** 2757-2766.

5. Zheng, T., C. Nibau, D. W. Phillips, G. Jenkins, S. J. Armstrong *et al.*, 2014 CDKG1 protein kinase is essential for synapsis and male meiosis at high ambient temperature in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A 111**:** 2182-2187.

6. Burrell, T., S. Fozard, G. H. Holroyd, A. P. French, M. P. Pound *et al.*, 2017 The Microphenotron: a robotic miniaturized plant phenotyping platform with diverse applications in chemical biology. Plant Methods 13**:** 10.

7. Shevchenko G.V., Talalaiev O.S. 2017 Efficient mechanism of DNA repair stabilizes genome of *Arabidopsis thaliana* from the Chernobyl zone. Dopov. Nac. acad. nauk Ukr. 4: 84.

8. Demidchik V. 2015 Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. Environ Exp Bot 109: 212-228.

THE NATURE OF PHOTOSYNTHETIC EXCITATIONS: IDEAS AND ON-GOING CHALLENGES

A. Freiberg

Institute of Physics, University of Tartu, W. Ostwald Str. 1, Tartu, Estonia

Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Riia 23, Tartu, Estonia

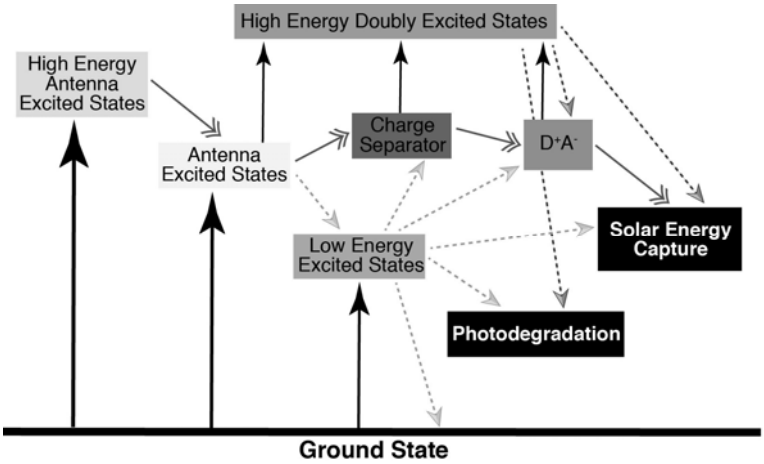
In photosynthesis, solar photons are converted into molecular excitations in light-harvesting pigment-protein complexes and the absorbed energy is transported to the reaction center complexes, where further conversion into chemical energy takes place.

The efficiency of light harvesting is significantly enhanced by inter-

pigment exciton interactions, which not only appropriately broaden the energy spectrum of the complexes, but also, by virtue of building up a suitable energetic ladder of exciton states, allows ultrafast excitation energy transfer with minimal losses.

Over the last decade, this simple exciton picture has evolved into a more detailed representation of exciton polarons by realizing that at least in some systems there exists strong coupling of the pigment excitons with the dynamic surroundings (more technically called phonons). This is part of an overall understanding of the role of excited states in photosynthesis as schematically demonstrated in the figure below.

In this talk, I present an overview of the ideas and experiments toward this general conclusion in bacterial photosynthesis realm. Current status of the field and the remaining challenges will be discussed based on some fairly recent developments of experiment and theory.



IMPACT OF PLANT PROTEIN GLYCATION IN AGEING AND STRESS RESPONSE: POTENTIAL MECHANISMS, BIOCHEMISTRY, AND BIOLOGICAL ROLE

A.A. Frolov,[1,2] T.E. Bilova,[1,3] G. Paudel,[1,4] U.M. Herfurth,[4] N.E. Shilyaev,[1] E.M. Lukasheva,[1] D. Brauch,[4] E.R Tarakhovskaya,[3] N.V. Frolova,[5] N.G. Osmolovskaya,[3] T. Vogt,[6] G.U. Balcke,[6] A. Tissier,[6] C. Milkowski,[5] C. Birkemeyer,[4] L.A. Wessjohann[2]

[1]*Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia; e-mail: afrolov@ipb-halle.de*

[2]*Department of Bioorganic Chemistry, Institute of Plant Biochemistry, Halle/Saale, Germany*

[3]*Department of Plant Physiology and Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

[4]*Faculty of Chemistry and Mineralogy, Universität Leipzig, Leipzig, Germany,*

[5]*Department of Cell and Metabolic Biology, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle/Saale, Germany*

[6]*Interdisciplinary Center for Crop Plant Research, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Germany*

In modern agriculture, environmental stress is the major factor reducing crop productivity. The alterations in temperature, salinity, light and water regimen, as well as prolonged storage, result in overproduction of reactive oxygen species (ROS) and onset of oxidative stress. From the other hand, development of plant response to environmental stress is often accompanied with metabolic adjustment, i.e. increase of primary metabolite contents (mostly amino acids and sugars). The simultaneous up-regulation of ROS and carbohydrate metabolism might result in protein glycation, i.e. interaction of protein amino- and guanidino groups with reducing sugars or α-dicarbonyl products of their oxidative degradation. This phenomenon is well-characterized for heat-treated foods of animal and plant origin. Resulting advanced glycation end-products (AGEs), upon their consumption and intestinal absorption, are known to be pro-inflammatory in mammals. Recently, the presence of glycation products was unambiguously demonstrated *in vivo* in stressed *Arabidopsis thaliana* plants [1]. However, only little information about the protein targets, mechanisms, glycation agents

in plants, and potential role in cellular biochemistry and role in environmental stress response are still unknown.

Therefore, here we comprehensively characterize age- and stress-related changes in plant glycated proteome and metabolome, by the methods of bottom-up LC-based in-depth proteomics, and LC- or GC-based metabolomics, respectively, and enclose the underlying mechanisms of AGE formation [2,3]. Using *in vitro* peptide-based glycation models, reactivity and glycation potential of individual plant sugars were addressed and considered in the context of *in vivo* abundances of corresponding metabolites. Thus, approximately 800 individual AGE-modified proteins were annotated. The rates of glycation were increased under stress conditions and during the life span of experimental plants. Thereby, monosaccharide autoxidation was the major pathway of their formation, whereas dihydroxyacetone phosphate, glyceraldehyde-3-phosphate, ribulose, erythrose, and sucrose were the most probable plant AGE precursors. Analysis of α-dicarbonyl formation in model peptide-based glycation reactions performed with these sugars confirmed monosaccharide autoxidation as the principle glycation pathway in plants. The work is supported by the Russian Scientific Foundation (grant identifier № 16-16-00026).

1. Bechtold U, Rabbani N, Mullineaux P.M., Thornalley P.J.Quantitative measurement of specific biomarkers for protein oxidation, nitration and glycation in *Arabidopsis* leaves // Plant J., 2009. V. 59(4):661-71.

2. Bilova T, Lukasheva E, Brauch D, Greifenhagen U, Paudel G, Tarakhovskaya E, Frolova N, Mittasch J, Balcke GU, Tissier A, Osmolovskaya N, Vogt T, Wessjohann LA, Birkemeyer C, Milkowski C, Frolov A. A Snapshot of the Plant Glycated Proteome: Structural, Functional and Mechanistic Aspects // J. Biol. Chem., 2016. V. 291(14). P. 7621-36.

3. Paudel G., Bilova T., Schmidt R., Greifenhagen U., Berger R., Tarakhovskaya E., Stöckhardt S., Balcke G.U., Humbeck K., Brandt W., Sinz A., Vogt T., Birkemeyer C., Wessjohann L., Frolov A. Osmotic stress is accompanied by protein glycation in *Arabidopsis thaliana* // J. Exp. Bot., 2016. V. 67 (22). P. 6283-6295.

ROS PARTICIPATION IN HEAT RESISTANCE INDUCTION IN PLANT CELLS BY HYDROGEN SILFIDE DONOR

Yu.E. Kolupaev, E.N. Firsova, T.O. Yastreb

V.V. Dokuchaev Kharkov National Agrarian University, Kharkov, Ukraine; e-mail: plant_biology@mail.ru

Hydrogen sulfide (H_2S) has been considered in recent years as one of the signal mediators in both animals [1] and plant [2,3] cells. The effects of increasing endogenous hydrogen sulfide content in plants under action of stressors, in particular, drought [4], salinity [5], heavy metals [6] have been shown. Numerous data have also been obtained on increase of plant resistance under influence of hydrogen sulfide donors, in particular sodium hydrosulfide (NaHS) [2]. At the same time, there is still no clear opinion as to whether H_2S is an "independent" signaling molecule in plants and what is its place in complex signaling networks [2, 3]. Signal intermediaries that provide the realization of the effects of hydrogen sulfide as a physiologically active molecule are also insufficiently studied.

To date, data have been obtained indicating the role of ROS in the transduction of the H_2S signal. For instance, increasing resistance of barley plants to UV-B by donor of hydrogen sulfide was accompanied by an increase in content of hydrogen peroxide in leaves and this effect was eliminated by the H_2O_2 scavenger dimethylthiourea [7]. However, in general, the role of ROS in the implementation of the effects of physiological action of hydrogen sulfide remains little studied. In particular, the enzyme systems involved in the formation of signaling ROS, when hydrogen sulfide donors act on plant objects, are almost not studied.

It can be assumed that an increase in the ROS content upon plant cells exposure to hydrogen sulfide may be due to the activation of NADPH oxidase [8] and/or apoplastic peroxidases [9], generating a superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), which turns into a more stable ROS – a hydrogen peroxide – under the action of superoxide dismutase (SOD) [10].

In connection with the stated the purpose of the work was to elucidate the role of ROS in transduction of the exogenous hydrogen sulphide signal inducing the development of heat resistance of cells of isolated wheat coleoptiles and estimation of the contribution of enzyme systems, involved in the formation and conversion of ROS, to the formation of such a signal.

The studies were conducted on coleoptiles of wheat (*Triticum aestivum* L.) variety Doskonala, separated from 4-day-old seedlings. The coleoptiles were incubated in Petri dishes on a sterile 2% sucrose solution supplemented with Na penicillin (100,000 units/l, control). In an experimental variant, NaHS was added to the plates at a final concentration of 100 μM (established in preliminary experiments) and held for a 24 hour period. In separate variants of the experiment, 2 hours before the insertion of sodium hydrosulfide in the coleoptile incubation medium, there were added inhibitors namely the one of NADPH oxidase – imidazole (1 μM), peroxidase – sodium azide (500 μM), superoxide dismutase (SOD) – sodium diethyldithiocarbamate (DDC, 1 mM), and also antioxidant with antiradical activity ionol (butylhydroxytoluene, 5 μM) and hydrogen peroxide scavenger dimethylthiourea (DMTU, 50 μM). After that, the coleoptiles were subjected to a damaging heating in a water thermostat at a temperature of 46°C for 10 minutes.

During the incubation of coleoptiles on solutions of the studied compounds, indicators of the superoxide anion radical generation [11], the content of hydrogen peroxide [12], the activity of apoplastic and soluble guaiacolperoxidase and cytosolic SOD [13] were determined.

Two to four hours after the beginning of the incubation of coleoptiles on the medium containing hydrogen sulfide donor, the formation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide enlarged, and the activity of SOD increased. At that time, the activity of apoplastic peroxidase under the influence of the H_2S donor decreased slightly, while the soluble, on the contrary, increased a little.

Treatment of coleoptiles with NADPH oxidase inhibitor imidazole eliminated the effects of enhancing the generation of superoxide anion radical and increase in the hydrogen peroxide content caused by the action of sodium hydrosulfide. At the same time, the peroxidase inhibitor sodium azide did not significantly affect the generation of ROS by coleoptiles treated with hydrogen sulfhide donor.

The SOD inhibitor DDC removed the effect of increasing the hydrogen peroxide content, observed 3 hours after the start of treatment with sodium hydrosulfide. The increase in the hydrogen peroxide content caused by the H_2S donor was also eliminated by the treatment of coleoptiles with DMTU and ionol.

Antioxidants ionol and DMTU, as well as inhibitors of NADPH-

oxidase imidazole and SOD DDC, neutralized the effect of increasing the activity of soluble peroxidase, observed after 24 hours treatment with hydrogen sulfide donor. Also, ionol, DMTU and DDC prevented the development of heat resistance of wheat coleoptiles caused by the action of exogenous hydrogen sulfide.

Thus, the causal relationship between the induced by hydrogen sulfide increase in the ROS content in cells and the development of heat resistance is shown. Probably, a short-term increase in the content of hydrogen peroxide in coleoptiles of wheat when they are treated with a hydrogen sulfide donor is associated with the activation of NADPH oxidase and SOD. An increase in the content of a relatively stable ROS (hydrogen peroxide) appears to be a signal that subsequently activates the antioxidant and possibly other protective systems, which contributes to the development of the heat resistance of wheat coleoptiles' cells.

1. Zaichko N.V., Melnik A.V., Yoltukhivskyy M.M., Olhovskiy A.S., Palamarchuk I.V. Hydrogen sulfide: metabolism, biological and medical role // Ukr. Biochem. J. 2014. V. 86(5). P. 5–25.

2. Lisjak M., Teklic T., Wilson I.D., Whiteman M., Hancock J.T. Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule? // Plant Cell Environ. 2013. V. 36. P. 1607–1616.

3. Hancock J.T. Harnessing evolutionary toxins for signaling: reactive oxygen species, nitric oxide and hydrogen sulfide in plant cell regulation // Front. Plant Sci. 2016. V. 8:189.

4. Jin Z.P., Shen J.J., Qiao Z.J., Yang G.D., Wang R., Pei Y.X.. Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 414. P. 481–486.

5. Lai D.W., Mao Y., Zhou H., Li F., Wu M., Zhang J., He Z., Cui W., Xie Y. Endogenous hydrogen sulfide enhances salt tolerance by coupling the reestablishment of redox homeostasis and preventing salt-induced K^+ loss in seedlings of *Medicago sativa* // Plant Sci. 2014. V. 225. P. 117–129.

6. Shi H., Ye T., Chan Z. Nitric oxide-activated hydrogen sulfide is essential for cadmium stress response in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.). Plant Physiol. Biochem. 2014. V. 74. P. 99–107.

7. Li Q., Wang Z., Zhao Y., Zhang X., Zhang S., Bo L., Wang Y., Ding Y., An L. Putrescine protects hulless barley from damage due to UV-

B stress via H_2S- and H_2O_2-mediated signaling pathways // Plant Cell Rep. 2016. V. 35. P. 1155–1168.

8. Baxter A., Mittler R., Suzuki N. ROS as key players in plant stress signalling // J. Exp. Bot. – 2013. doi:10.1093/jxb/ert375

9. Minibayeva F.V., Gordon L.K., Kolesnikov O.P., Chasov A.V. Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells // Protoplasma. 2001. V. 217. P. 125–128.

10. Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // Plant Physiol. 2006. V. 141. P. 336–340.

11. Shorning B.Y., Smirnova E.G., Yaguzhinsky L.S., Vanyushin B.F. Necessity of superoxide production for development of etiolated wheat seedling // Biochemistry (Mosc.). 2000. V. 65. P. 1357–1361.

12. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // Plant Physiol. 1976. V. 57. P. 308–309.

13. Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O., Shvidenko N.V., Karpets Yu.V. Induction of heat resistance of wheat coleoptiles by salicylic and succinic acids: connection of the effect with the generation and neutralization of reactive oxygen species // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V 48. P. 500–505.

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

Г.А. Абилова, П.Ш. Шагрудинова

Дагестанский государственный университет, г. Махачкала, Россия; e-mail:gulyaraabilova@mail.ru

В процессе эволюции происходит становление систем адаптации растений к условиям своего существования. При этом формируется устойчивость, то есть способность сохранять относительное постоянство внутренней среды в определенном диапазоне внешних воздействий [1]. Устойчивость можно целенаправленно повысить в ходе онтогенеза путем закаливания (акклимации) растений посредством действия невысоких доз стрессового фактора [2].

Настоящее исследование посвящено проверке гипотезы о том, что предобработка проростков пшеницы низкими концентрациями

сульфата кадмия повышает их устойчивость к последующему стрессовому действию данного фактора.

В опытах использовали проростки пшеницы (Triticum aestivum L) сорта Краснодарская-99, выращенных в течение 4-х суток на фильтровальной бумаге в чашках Петри с поливом дистиллированной водой (контроль) и раствором $CdSO_4$ 0,005мМ (опыт) при комнатной температуре и естественном освещении. На 4-е сутки контрольные и опытные проростки подвергали действию $CdSO_4$, но в более высоких концентрациях (10^{-3}-10^{-2}М). Реакцию проростков на действие $CdSO_4$ оценивали по длине и сырой биомассе побега. В первом листе определяли содержание свободного пролина нингидриновым методом [3] и интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) по содержанию малонового диальдегида (МДА) с помощью реакции с тиобарбитуровой кислотой [4]. В таблицах проведены средние арифметические значения и их стандартные отклонения по трем независимым опытам. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента при 5%-м уровне значимости.

Таблица 1

Влияние предобработки $CdSO_4$ в концентрации 0,005мМ на линейные размеры и биомассу побега проростков пшеницы при последующем действии $CdSO_4$ в концентрациях 10^{-3} и 10^{-2}М

Концентрация $CdSO_4$	Длина побега (мм)		Масса побега (мг)	
	после экспозиции на воде	после предобработки $CdSO_4$	после экспозиции на воде	после предобработки $CdSO_4$
Контроль (H_20)	105 ± 3	108 ± 2	64 ± 5	65 ± 2
10^{-3}М	85 ± 1*	84 ± 3*	54 ± 1	54 ± 2
10^{-2}М	64 ± 3*	59 ± 2*	42 ± 1	41 ± 1

Примечание: Здесь и в таблице 2 звездочкой обозначены достоверные различия результатов, полученных по отношению проростков, выросших без обработки $CdSO_4$ с концентрацией 0,005мМ.

Изучение динамики изменений биометрических показателей растений пшеницы при действии $CdSO_4$ показало, что с увеличением концентрации соли замедляются ростовые процессы (табл. 1). Так, например, у растений контрольного варианта длина и масса побега

достигала за 7 суток эксперимента максимальной величины. Присутствие в среде культивирования $CdSO_4$ в концентрации 10^{-3}М и 10^{-2}М снизило длину побега соответственно в 1,24 и 1,64 раза, а массу – в 1,18 и 1,53 раза по сравнению с контролем. Предварительная обработка проростков в течение трех суток $CdSO_4$ в концентрации 0,005мМ не изменила интенсивности ростовых процессов по сравнению с контролем и не повлияла на эти показатели у проростков, которые далее выращивали при поливе высокими концентрациями $CdSO_4$.

Воздействие на проростки пшеницы $CdSO_4$ в высокой концентрации приводило к подавлению процессов липопероксидации, оцениваемых по содержанию продуктов ПОЛ в листьях пшеницы (табл.2). Предобработанные $CdSO_4$ в концентрации 0,005мМ растения характеризовались еще меньшим уровнем накопления МДА, при этом предобработка растений 0,005мМ $CdSO_4$ также снижала этот показатель.

Таблица 2

Влияние предобработки $CdSO_4$ в концентрации 0,005Мм на изменение содержания МДА и пролина в первом листе проростков пшеницы при последующем действии $CdSO_4$ в концентрациях 10^{-3} и 10^{-2}М.

Концентрация $CdSO_4$	МДА (мкМ/г сырой ткани)		Пролин (мкМ/г сырой ткани)	
	после экспозиции на воде	после предобработки $CdSO_4$	после экспозиции на воде	после предобработки $CdSO_4$
Контроль (H_20)	0,19 ± 0,009	0,16 ± 0,007	1,57 ± 0,16	1,57 ± 0,21
10^{-3}М	0,17 ± 0,015	0,15 ± 0,013	1,95± 0,17	1,86 ± 0,11
10^{-2}М	0,14 ± 0,010*	0,13 ± 0,009*	2,46 ± 0,12*	3,02 ± 0,25*

Уменьшение содержания конечного продукта ПОЛ – МДА – коррелировало с накоплением пролина (табл.2), количество которого возрастало с увеличением концентрации металла в среде. Предобработка солью кадмия в низкой концентрации не изменила количество образующегося пролина в контроле, но способствовала еще большему его образованию при культивировании проростков на растворе $CdSO_4$ с концентрацией 10^{-2}М.

Таким образом, выбранный режим действия тяжелого металла на проростки пшеницы вызывал окислительный стресс. Увеличение количества образующегося пролина в листьях и торможение роста растений пшеницы свидетельствуют о сильных повреждениях клеток, когда все ресурсы растений и активность защитных систем уже недостаточны для их компенсации. Закаливание растений низкими концентрациями $CdSO_4$ в этих условиях не происходит.

1. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. – СПб.: Изд-во СПб университета, 2002. 244 с.

2. Таланова В.В., Титов А.Ф., Боева Н.П. Влияние возрастающих концентраций тяжелых металлов на рост проростков ячменя и пшеницы. // Физиология растений. 2001. Т.48. №1. С.119-123.

3. Bates L.S. Rapid determination of free proline for stress studies // Plant Soil. 1973. V. 39. P. 205-207.

4. Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М. Практикум по курсу «Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам»: Учебно-методическое пособие. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2013. 63с.

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛЖАСМОНАТА НА СОДЕРЖАНИЕ И ТИРОЗИНОВОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ У ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ВЛАГИ

А.М. Авальбаев[1], Р.А. Юлдашев[1], К.А. Федорова[1], Д.Р. Масленникова[1], Ч.Р. Аллагулова[1], Р.И. Гильманова[2], Н.В. Петрова[2], Е.О. Федина[2], Ф.Г. Каримова[2], Ф.М. Шакирова[1]

[1]ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия; e-mail: avalbaev@yahoo.com

[2]ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН, г. Казань, Россия

Выявленное нами сочетание ростстимулирующего и защитного к условиям обезвоживания эффектов метилжасмоната (МеЖ) в концентрации 0.1 мкМ на растения пшеницы свидетельствует об актив-

ном влиянии этого фитогормона на метаболизм клеток, центральным звеном которого является синтез белка. Вместе с тем, хорошо известна важная роль эндогенных и экзогенных жасмонатов в регуляции редокс-баланса, что вносит важный вклад в проявление физиологического действия этих гормонов на растения в норме и в условиях индуцируемого обезвоживанием окислительного стресса. С целью выяснения возможности вовлечения антиоксидантных ферментов в проявление протекторного действия МеЖ на растения пшеницы, нами был проведен анализ влияния МеЖ на распределение растворимых белков проростков пшеницы и уровень их тирозинового фосфорилирования в норме и в условиях дефицита влаги. Методами двумерного электрофореза и матричной лазерной десорбционно-ионизационной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) показано, что обработка растений МеЖ способствовала увеличению ряда защитных белков, в том числе, полипептидов и с антиоксидантными свойствами, таких как L-аскорбат пероксидаза, глутатион-S-трансфераза и хлоропластный 2-цис-пероксиредоксин. В то же время, в обработанных МеЖ проростках в норме наблюдалось увеличение тирозинового фосфорилирования некоторых белков, среди которых упоминавшиеся выше антиоксидантные ферменты глутатион-S-трансфераза и 2-цис-пероксиредоксин. Эти результаты могут указывать на активацию МеЖ систем про-/антиоксидантной защиты, вносящих важный вклад в формирование предадаптирующего эффекта МеЖ на проростки пшеницы к возможным стрессам.

Воздействие обезвоживания, существенно тормозящего рост проростков, вызывало сильное накопление идентифицированных нами защитных белков. Одновременно, в условиях дефицита влаги было выявлено сильное снижение уровня фосфорилирования белков по тирозину, в том числе 2-цис-пероксиредоксина, а также уменьшение количества фосфотирозиновых белков, в частности, дефосфорилирование глутатион-S-трансферазы, в проростках пшеницы, что может свидетельствовать о серьезном нарушении в них клеточной сигнализации, с чем может быть связано резкое торможение роста проростков при стрессе. Предобработка МеЖ способствовала снижению уровня повреждающего действия обезвоживания на рост проростков пшеницы. Вероятно, вызванные МеЖ изменения в протеоме и тирозиновом фосфопротеоме в норме способствуют адаптации пророст-

ков к последующему воздействию стресса и снижению уровня его негативного действия на их рост. В пользу этого свидетельствуют данные об уменьшении содержания в условиях стресса в предобработанных МеЖ проростках пшеницы уровня накопления защитных белков, в том числе антиоксидантных ферментов L-аскорбат пероксидазы, глутатион-S-трансферазы и 2-цис-пероксиредоксина в сравнении с необработанными гормоном растениями. Вместе с тем, предобработка МеЖ предотвращала стресс-индуцированное падение уровня тирозинового фосфорилирования и количества фосфотирозиновых полипептидов. Так, в условиях дефицита влаги в предобработанных МеЖ проростках наблюдалось усиление тирозинового фосфорилирования 2-цис-пероксиредоксина, а также рефосфорилирование глутатион-S-трансферазы. Полученные данные могут свидетельствовать о вкладе изменений в содержании и тирозиновом фосфорилировании антиоксидантных белков в проявление предадаптирующего и защитного действия метилжасмоната на растения пшеницы.

Работа поддержана грантом РФФИ (№17-04-01853_а).

ВКЛАД ДЕГИДРИНОВ В АНТИОКИДАНТНУЮ ЗАЩИТУ РАСТЕНИЙ

Ч.Р. Аллагулова, Ф.М. Шакирова

ФБГУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия; e-mail: shakirova@anrb.ru

Поскольку растения прикреплены к месту обитания и осуществляют оксигенный фотосинтез, в растительных клетках постоянно образуются активные формы кислорода (АФК). Являясь обычным продуктом обмена веществ, АФК в растениях выполняют ряд важных физиологических функций, регулируя их рост и развитие. В дополнение к нормальной метаболической активности продукция АФК в клетке резко возрастает в ответ на стрессовые факторы различной природы, в том числе при действии широкого спектра стрессовых факторов абиотического происхождения, в частности засухи, засоления, нарушения температурного режима, воздействия ионов тяжелых металлов. Поскольку АФК обладают чрезвычайно высокой реакци-

онной способностью, их избыточная генерация вызывает нарушение функционирования практически всех клеточных систем. В случае, когда происходят сдвиги в балансе между образованием АФК и их нейтрализацией, свободные радикалы начинают активно взаимодействовать с белками, липидами, нуклеиновыми кислотами, что приводит к нарушению структуры и функции мембран, активности ферментов, мутагенезу, остановке клеточного цикла и, в итоге к гибели клеток и всего организма в целом (Мерзляк, 1999; Колупаев и др., 2016).

Хорошо известно, что обезвреживание АФК в растениях обеспечивается антиоксидантной системой, все компоненты которой находятся в сложном функциональном взаимодействии, обеспечивая устойчивость растений к стресс-индуцируемым окислительным повреждениям (Колупаев и др., 2016). Помимо хорошо известных классических антиоксидантов (АО) ферментативной и не ферментативной природы (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, аскорбат-глутатионовая система, различные низкомолекулярные осмолиты) способность нейтрализовать АФК проявляют некоторые другие соединения, накапливающиеся в значительном количестве в растительных клетках при абиотических стрессовых воздействиях. Среди них особое внимание привлекают белки дегидрины, поскольку их синтез и накопление в растениях резко возрастает в условиях стрессовых факторов, вызывающих интенсификацию продукции АФК, таких как засуха, засоление, гипотермия, избыток соединений тяжелых металлов и т.д. (Sun and Lin, 2010). Следует отметить, что стресс-индуцированное накопление дегидринов носит мультифункциональный характер, которое отражается в поддержании целостности макромолекул и надмолекулярных клеточных структур в неблагоприятных для растений условиях (Hara, 2010; Hara et al., 2016). В начале 2000-х годов в работе японских исследователей университета г. Сидзуока были получены первые экспериментальные доказательства, демонстрирующие непосредственное участие дегидринов в защите растительных клеток от стресс-индуцируемой окислительной деградации клеточных структур (Hara et al., 2003). Было показано, что дегидрин CuCOR 19 (*Citrus unshiu* Cold Regulated 19 kDa) с Мм 19 кД способствует повышению холодостойкости растений японского мандарина, снижая уровень индуцируемого низкими температурами выхо-

да электролитов и накопления малонового диальдегида (МДА). В экспериментах *in vitro* были получены сведения о способности CuCOR 19 дегидрина предотвращать окислительное разрушение липосом и нейтрализовать гидроксильный и гидропероксидный радикалы (Hara et al., 2003; Hara et al., 2004). В пользу анатиоксидантной активности дегидринов свидетельствуют данные о существенно меньшем накоплении пероксида водорода в трансгенных растениях риса со сверхэкспрессией гена *OsDhn1* дегидрина, индуцированного засухой или засолением относительно растений дикого типа (Kumar et al., 2014). В растениях японского мандарина был идентифицирован CuCOR 15 дегидрин с Мм 15 кД, гомологичный CuCOR 19 белку и характеризующийся способностью связывать ионы Fe^{3+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+} и Zn^{2+} (Hara et al., 2005). Способность к взаимодействию с металлами была показана и для дегидринов из других видов растений, например для железо-транспортного ITP-белка клещевины (Krüger et al., 2002), для RAB18, COR47, LTI29, LTI30, ERD10 и ERD47 дегидринов арабидопсиса (Svensson et al., 2000; Alsheikh et al., 2005; Sun and Lin, 2010; Hara, 2010). Взаимодействие дегидринов с ионами металлов обусловлено присутствием в них гистидин-богатых последовательностей с аминокислотным составом: HKGEHHSGDHH, формирующим His-X3-His-мотивы (HKGEH и HSGDH), которые были охарактеризованы как металл-связывающие домены и в других белках (Hara et al., 2005; Sun and Lin, 2010; Hara, 2010; Hara et al., 2016).

Таким образом, антиокисидантная активность дегидринов обсуждается в литературе в двух аспектах: 1) способность дегидринов непосредственно «тушить» свободные радикалы, генерируемые в растениях в ответ на стрессовые факторы, и 2) хелатирование дегидринами ионов тяжелых металлов, являющимися мощными индукторами АФК. Способность дегидринов, характерных для царства растений белков, напрямую или опосредовано нейтрализовать АФК вносит существенный вклад в формирование устойчивости растений к широкому спектру неблагоприятных воздействий, вызывающих окислительный стресс.

1. Alsheikh M. K., Svensson J. T., Randall S. K. Phosphorylation regulated ion‐binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins //Plant, Cell & Environment. – 2005. – Т. 28. – №. 9. – С. 1114-1122.

2. Hara M. et al. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco // Planta. 2003. V. 217. P. 290-298.

3. Hara M. et al. The Arabidopsis KS-type dehydrin recovers lactate dehydrogenase activity inhibited by copper with the contribution of His residues // Plant Science. 2016. V. 245. P. 135-142.

4. Hara M. The multifunctionality of dehydrins: an overview // Plant Signaling & Behavior. 2010. V. 5. P. 503-508.

5. Hara M., Fujinaga M., Kuboi T. Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains // Journal of Experimental Botany. 2005. V. 56. P. 2695-2703.

6. Hara M., Fujinaga M., Kuboi T. Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin // Plant Physiology and Biochemistry. 2004. V. 42. P. 657-662.

7. Krüger, C., Berkowitz, O., Stephan, U. W., & Hell, R. A Metal-binding Member of the Late Embryogenesis Abundant Protein Family Transports Iron in the Phloem of *Ricinus communis L* // Journal of Biological Chemistry. 2002. V. 277. P. 25062-25069.

8. Kumar M. et al. Over-expression of dehydrin gene, OsDhn1, improves drought and salt stress tolerance through scavenging of reactive oxygen species in rice (*Oryza sativa L.*) // Journal of Plant Biology. 2014. V. 57. P. 383-393.

9. Sun X., Lin H. H. Role of plant dehydrins in antioxidation mechanisms // Biologia. Section Botany 2010. V. 65. P. 755-759.

10. Svensson J., Palva E. T., Welin B. Purification of recombinant Arabidopsis thaliana dehydrins by metal ion affinity chromatography // Protein expression and purification. 2000. V. 20. P. 169-178.

11. Колупаев Ю.Е. Антиоксиданты растительной клетки, их роль в афк-сигналинге и устойчивости растений // Успехи современной биологии. 2016. Т. 136. С. 181-198.

12. Мерзляк М. Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений // Соросовский образовательный журнал. 1999. Т. 9. С. 20-26.

РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ДЕЙСТВИИ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ НА ГИДРАВЛИЧЕСКУЮ ПРОВОДИМОСТЬ И АКВАПОРИНЫ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ

Г.Р. Ахиярова[1], Г.В. Шарипова[1], С.Ю. Веселов[2], Д.С. Веселов[1]

[1]*Уфимский институт биологии РАН, г. Уфа, Россия;*
e-mail: veselov@anrb.ru

[2]*Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия;*
e-mail: Veselov.stanislav5@yandex.ru

Активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в реализации сигнальной функции абсцизовой кислотой (АБК). Механизм взаимодействия АБК и АФК изучен наиболее детально на примере индуцируемого этим гормоном закрытия устьиц. Так показано, что запускаемое абсцизовой кислотой фосфорилирование НАДФ-оксидазы обеспечивает резкое увеличение продукции АФК, которые, в свою очередь, влияют на активность ионных каналов, вызывая выход ионов калия из клеток и закрытие устьиц (см. ссылки обзора [1]). Значение АФК в действии АБК на устьица было показано в экспериментах, в которых антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота) предотвращали индуцируемое АБК закрытие устьиц. Еще одно важное свойство АБК – это способность данного гормона влиять не только на устьичную, но и гидравлическую проводимость через изменение активности водных каналов аквапоринов [2]. Ранее нами было показано повышение гидравлической проводимости под влиянием АБК в корнях растений ячменя за счет увеличения уровня аквапоринов в клетках коры [3]. Однако в этих экспериментах не было изучено возможное участие АФК в действии АБК на гидравлическую проводимость и уровень аквапоринов. В данной работе мы использовали обработку растений ячменя абсцизовой кислотой и антиоксидантом аскорбиновой кислотой по отдельности и в сочетании для того, чтобы выявить предполагаемую роль АФК в действии АБК на способность корней проводить воду.

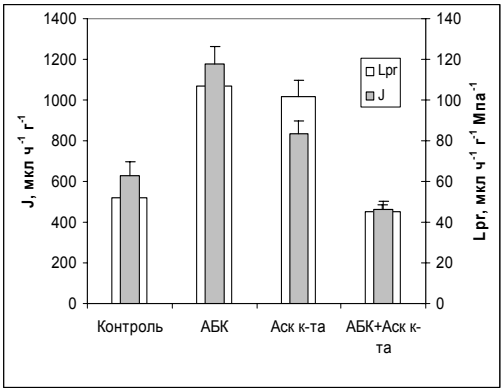


Рисунок 1. Влияния АБК, аскорбиновой кислоты (Аск к-та) и их сочетания на поток ксилемного экссудата (J) и гидравлическую проводимость корней (Lpr) 7-дневных растений ячменя

Исследования проводились на растениях ячменя сорта Прерия, выращенных в гидропонической культуре на среде Хогланда-Арнона при 16-часовом световом периоде (ФАР 400 ммоль м-1с-1) и 24 °С. В питательную среду семисуточных растений добавляли 11 μМ АБК и 10 мМ аскорбиновую кислоту (по отдельности и в сочетании), через 1 ч отделяли корни вместе с основанием побега и с помощью силиконовой трубочки присоединяли корни к стеклянному капилляру. Через 2 ч измеряли объем корневого экссудата путем взвешивания и рассчитывали скорость потока (J) как соотношение объема экссудата ко времени его сбора. Величину J выражали на единицу массы корней. Гидравлическую проводимость рассчитывали как $J/\varphi_{осм}$, где $\varphi_{осм}$ – осмотический потенциал собранного экссудата, измеренный с помощью Digital Micro-Osmometer (CAMLAB Limited). После сбора корневого экссудата корни фиксировали для иммунолокализации аквапоринов. Фиксацию зародышей, дегидратацию, заключение в смолу, приготовление срезов и иммуногистохимическое окрашивание проводили, как описано [3]. Сыворотка, содержащая антитела к аквапоринам семейства HvPIP2;2 была любезно предоставлены Maki Katsuhara (Okayama University, Japan).

Измерение потока корневого экссудата и гидравлической проводимости показало, что введение в растения экзогенной АБК увеличивало способность корней растений ячменя проводить воду (рис. 1), что соответствует полученным нами ранее результатам [3]. Сама по себе аскорбиновая кислота не влияла на гидравлическую проводимость, но в сочетании с АБК предотвращала повышение притока во-

ды из корней под влиянием этого гормона. Полученные нами результаты соответствуют данным Aroca с соавторами, которые также показали, что обработка аскорбиновой кислотой растений *Phaseolus vulgaris* ингибировала ускорение притока воды из корней под влиянием АБК [2]. Однако в этой работе аквапорины не были изучены.

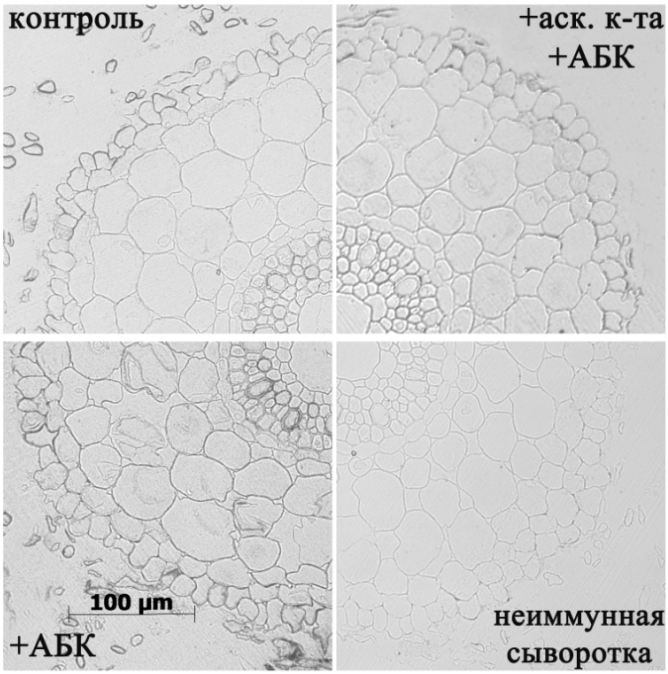


Рисунок 2. Иммуногистохимическая локализация аквапоринов HvPIP2;2 в клетках корня ячменя.

Измерение потока корневого экссудата и гидравлической проводимости показало, что введение в растения экзогенной АБК увеличивало способность корней растений ячменя проводить воду (рис. 1), что соответствует полученным нами ранее результатам [3]. Сама по себе аскорбиновая кислота не влияла на гидравлическую проводимость, но в сочетании с АБК предотвращала повышение притока воды из корней под влиянием этого гормона. Полученные нами результаты соответствуют данным Aroca с соавторами, которые также показали, что обработка аскорбиновой кислотой растений *Phaseolus vul-*

garis ингибировала ускорение притока воды из корней под влиянием АБК [2]. Однако в этой работе аквапорины не были изучены.

Иммуногистохимическая локализация аквапоринов HvPIP2;2 показала увеличение интенсивности окрашивания по периферии клеток на поперечном срезе корней, обработанных АБК растений ячменя по сравнению с контрольными растениями (рис.2), что соответствует локализации аквапоринов этого класса в плазмолемме и ранее опубликованным данным [3]. Специфичность метода подтверждается отсутствием окрашивания в том случае, когда вместо сыворотки против аквапоринов использовали неиммунную сыворотку (рис. 2). В присутствие аскорбиновой кислоты АБК не влияла на уровень окрашивания аквапоринов, и он оставался на уровне контроля.

Таким образом, как результаты измерения гидравлической проводимости, так и данные иммуногистохимической локализации свидетельствуют о том, что влияние АБК на способность корней проводить воду не проявляется в присутствие антиоксиданта (аскорбиновой кислоты), что свидетельствует о важной роли АФК в реализации действия АБК на процессы, обеспечивающие движение воды по тканям растений. Интересно, что сами по себе АФК, которые образуются при обработке растений реактивом Фентона, ингибируют аквапорины [3]. Очевидно, как и во многих других случаях, действие АФК может быть противоположным, в зависимости от их концентрации.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ №17-04-01477.

1. Xia, X.J., Zhou, Y.H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C.H. and Yu, J.Q. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance // Journal of Experimental Botany. 2015. V. 66. P. 2839–2856.

2. Aroca R.. Exogenous catalase and ascorbate modify the effects of abscisic acid (ABA) on root hydraulic properties in *Phaseolus vulgaris* L. plants // Journal of Plant Growth Regulation. 2006. V. 25. P. 10–17.

3. Sharipova G. , Veselov D., Kudsoyarova G., Fricke W., Dodd I., Katsuhara M., Furuichi T., Ivanov I., Veselov S. Exogenous application of abscisic acid (ABA) increases root and cell hydraulic conductivity and abundance of some aquaporin isoforms in the ABA deficient barley mutant Az34 // Annals of Botany. 2016. V. 118. P. 777-785.

СОДЕРЖАНИЕ ГОРМОНОВ В КЛЕТКАХ ЗАРОДЫША И ВЛИЯНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА И АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОРАСТАНИЕ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ И ЯЧМЕНЯ

Г.Р. Ахиярова[1], Г.В. Шарипова[1], С.Ю. Веселов[2], Д.С. Веселов[1]

[1]Уфимский институт биологии РАН, г. Уфа, Россия;
e-mail: veselov@anrb.ru

[2]Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия;
e-mail:Veselov.stanislav5@yandex.ru

Обнаружено, что у растений томатов, салата и арабидопсиса разрыхление под влиянием активных форм кислорода (АФК) клеточных стенок микропилярной части эндосперма, прилегающего к зародышевым корням способствует прорастанию [1]. Предполагается, что механизм торможения прорастания под влиянием абсцизовой кислоты (АБК) может быть связан с тем, что этот гормон ингибирует образование активных форм кислорода. Аналогичную функцию барьера для кончика зародышевого корешка у растений ячменя может выполнять колеориза [2]. Однако участие гормонов и АФК в прорастании однодольных изучено слабо. В литературе есть сведения о том, что АФК участвуют в ауксин-зависимой регуляции растяжения клеток [3]. Однако возможное участие ауксинов в продукции АФК при прорастании не изучалось. Цель данной работы состояла в изучении локализации гормонов (АБК и индолилуксусной кислоты - ИУК) в зародышах пшеницы и влияния перекиси водорода и АБК на прорастание дефицитного по АБК мутанта ячменя и его исходного генотипа.

Объектом изучения были зерновки пшеницы сорта Жница и ячменя (сорт Steptoe и его дефицитный по АБК мутант AZ34).

Зерновки ячменя анализировали через 4 месяца после сбора урожая. После стерилизации их замачивали в дистиллированной воде, 0,06 % перекиси водорода или 11 μM растворе АБК в течение 12 ч. После этого семена проращивали в чашках Петри (по 30 семян в каждой) на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой. Количество проросших зерновок подсчитывали через 40 ч после начала замачивания.

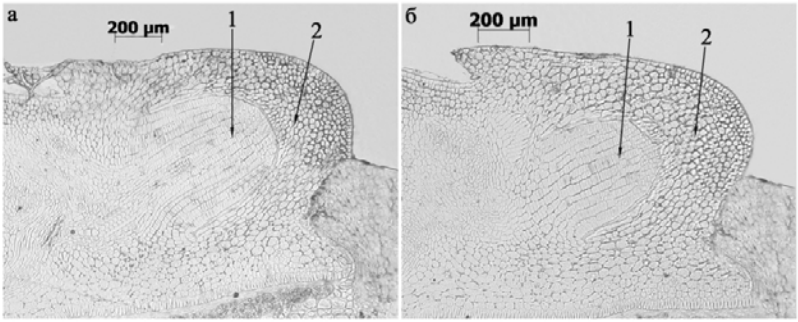


Рисунок. 1. Иммуногистохимическая локализация ИУК (а) и АБК (б) в прорастающих зерновках пшеницы. 1 – зародышевый корень, 2 - колеориза

Зерновки пшеницы стерилизовали, затем замачивали в дистиллированной воде. На иммунолокализацию ИУК и АБК образцы зародышей пшеницы брали через 6 часов после начала замачивания. Фиксацию зародышей пшеницы, дегидратацию, заключение в смолу, приготовление срезов и иммуногистохимическое окрашивание проводили, как описано [4].

Как видно из рисунка 1, клетки зародышевого корня были слабее окрашены на АБК и ИУК по сравнению с клетками колеоризы. Эти результаты указывают на то, что проклевывание зерновок происходит пассивно за счет поглощения воды клетками первичного корня, а регулируемые гормонами процессы происходят в колеоризе. По аналогии с микропилярной частью эндосперма, выполняющей у двудольных растений ту же функцию, что и колеориза у однодольных [2], можно предположить, что накопление гормонов, зарегистрированное нами в клетках колеоризы, может быть связано с продукцией в них АФК, которые разрыхляют клетки колеоризы, облегчая появление корней. Вместе с тем, у двудольных растений АБК ингибировала образование АФК и прорастание [1]. Важно было проверить, как АБК влияет на прорастание зерновок однодольных.

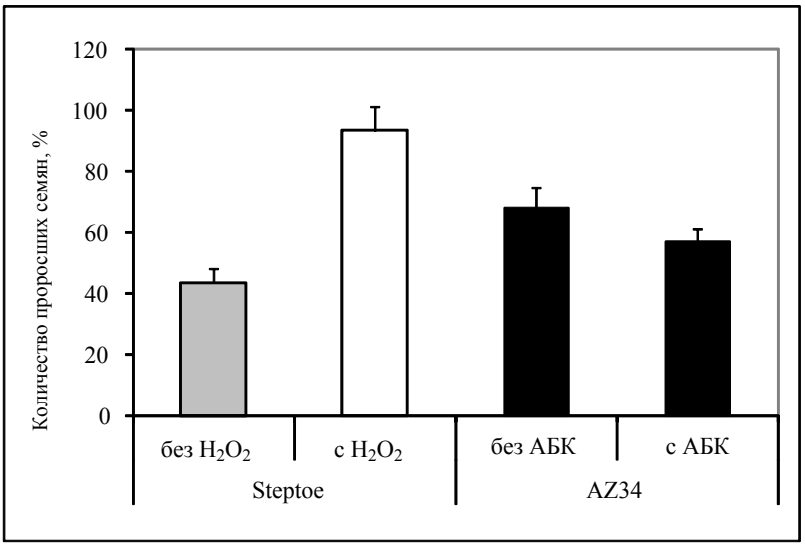


Рисунок 2. Влияние замачивания в растворах перекиси водорода и АБК на прорастание зерновок ячменя сорта Steptoe и мутанта AZ34

Для того чтобы получить ответ на этот вопрос, мы сравнили прорастание дефицитного по АБК мутанта ячменя и его исходного генотипа Steptoe. Как видно из рисунка 2, через 4 месяца после сбора урожая только 43 % зерновок Steptoe прорастали. Полученные нами результаты свидетельствует о том, что к этому времени только часть зерновок ячменя данного сорта вышла из состояния покоя. В то же время, процент проросших зерновок у AZ34 был существенно выше (68 %), что можно объяснить низким уровнем АБК у дефицитного по этому гормону мутанта, и способностью этого гормона пролонгировать покой семян. Это предположение подтверждают данные о снижении процента проросших зерновок у AZ34 после экзогенной обработки абсцизовой кислотой (рис. 2). Обработка зерновок Steptoe перекисью водорода стимулировала их прорастание, свидетельствуя о том, что и у однодольных растений, как и у двудольных АФК способствуют прорастанию.

Таким образом, АБК подавляла прорастание зерновок ячменя, вероятно, за счет ингибирования образования АФК. Почему же накопление АБК в клетках колеоризы растений пшеницы не подавляло прорастание? Вероятно, ингибирующему действию АБК могло противодействовать повышение уровня ИУК, способной индуцировать

образование АФК [3]. Требуются дальнейшие исследования для проверки этого предположения.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ №17-04-01477.

1. Muller, K., Tintelnot, S., Leubner-Metzger, G. Endosperm limited *Brassicaceae* seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and Arabidopsis thaliana // Plant Cell Physiol. 2006. V. 47. P. 864–877.

2. Barrero J.M., Talbot M.J., White R.G., Jacobsen J.V., Frank Gubler F. Anatomical and transcriptomic studies of the coleorhiza reveal the importance of this tissue in regulating dormancy in barley // Plant Physiology. 2009. V. 150. P. 1006–1021.

3. Schopfer P. Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth // The Plant Journal 2001. V. 28. P. 679–688.

4. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaytsev D. Yu, Veselev S.Yu. Changes in distribution of cytokinins and auxins in cells during callus induction and organogenesis in vitro in immature embryo culture of wheat // In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 2016. V. 52. P. 251–264.

ВЛИЯНИЕ ГЛИЦИРРИЗИНАТОВ КАК ИНДУКТОРОВ УСТОЙЧИВОСТИ ХЛОПЧАТНИКА К ФИТОПАТОГЕНАМ *Fusarium oxysporum и Verticillium dahliae*

А.А. Ахунов, Н.Р. Хашимова, М.А. Мамасолиева, С.Б. Наврузов

Институт биоорганической химии им. академика А.С. Садыкова АН РУз, г. Ташкент, Узбекистан;e-mail: ali.akhunov@gmail.ru

Как известно для защиты растений от болезней широко используются химические средства подавляющие рост и развитие микроорганизмов. Однако применение пестицидов биоцидной природы приводит с одной стороны к химическому загрязнению окружающей среды, и с другой к появлению высоко резистентных к пестицидам

форм патогенов, что еще раз подтверждает факт, что гены устойчивости быстро преодолеваются патогенами [1]. Этот постулат относится к важнейшей в Узбекистане технической культуре - хлопчатнику.

В настоящее время у многих фитопатогенов повысилась устойчивость к различным химическим препаратам. Это приводит к тому, что каждые 4-5 лет необходимо создавать новые пестициды, которые сегодня отрицательно воздействуют на иммунную систему растений. В связи с этим поиск новых стимуляторов устойчивости, всхожести, роста и развития хлопчатники из природных источников, является актуальной проблемой для получения высоких урожаев хлопка-сырца.

Известно, что одним из основных ферментов устойчивости, участвующих в защитных реакциях хлопчатника являются пероксидаза (ПО), её анионные изоформы, полифенолоксидаза (ПФО), фенилаланин аммиак-лиаза (ФАЛ), которые ответственны за формирование системной устойчивости хлопчатника [2, 3].

В Институте биоорганической химии АН РУз из корней солодки *Glycyrrhirza glabra L.* была выделена глицирризиновая кислота и на её основе были получены моноаммониевая соль глицирризиновой кислоты (препарат ДАГ-2) и ее супромлекулярный комплекс с салициловой кислотой (препарат ДАГ-1).

Исследования, проведенные на проростках хлопчатника выявили, что препараты ДАГ-1 и ДАГ-2 в концентрации 10^{-7} М способны повышать активность антиоксидантных ферментов (пероксидаза, полифенолоксидазы) и фенилаланин аммиак-лиазы, тем самым формируя неспецифическую устойчивость грибам *F. oxysporum* и *V. dahliae* у устойчивого Наманган-77, среднеустойчивого С-6524 и восприимчивого С-4727 сортов хлопчатника.

Повышение активности ПО и ПФО при инфицировании патогенами *F. oxysporum* и *V. dahliae* свидетельствует о процессах лигнификации клеточных стенок хлопчатника для механической изоляции патогена, а также в образовании активных форм кислорода. Стимуляция препаратами активности фенилаланин аммиак-лиазы, ключевого фермента фенилпропаноидного пути, дает возможность усилить синтез фитоалексинов, и салициловой кислоты – эндогенного элиситора системной неспецифической устойчивости хлопчатника.

Исследуемые препараты в несколько раз повышали устойчивость хлопчатника к *F. oxysporum* и *V. dahliae* не только в лабораторных, но и полевых условиях на опытных участках НИИ селекции, семеноводства и агротехнологии выращивания хлопка МСВХ АН РУз. Исследование в условиях открытого грунта выявили пролонгированную активность ферментов ПО, ПФО, ФАЛ в корнях проростков в исследуемых сортах хлопчатника (табл.1).

Таблица

Пролонгированная активность ферментов фитоиммунитета из корней проростков хлопчатника на 30й день после посева семян, обработанных глицирризинатами в концентрации 10^{-7} М (М±м; n=10; P<0,05)

Варианты опыта	Хитин-специфичная пероксидаза, Е/мг	полифенолоксидаза, Е/мг	Фенилаланин аммиак-лиаза, Е/мг
С-4727			
контроль	171,59 ± 5,4	237,44 ± 0,16	52,95 ± 2.7
(ДАГ-1)	318,44 ± 6,2	623,85 ± 0,25	714,17 ± 0,5
(ДАГ-2)	287,87 ± 8,3	494,17 ± 0,15	419,68 ± 0,12
С-6524			
контроль	182,7 ± 7,3	569,08 ± 0,32	29,8 ± 1,32
(ДАГ-1)	185,11 ± 7,5	760,76 ± 0,56	125,0 ± 7,9
(ДАГ-2)	737,53 ± 11,8	316,57 ± 0,78	37,0 ± 2,1
Наманган-77			
контроль	349,82 ± 3,2	356,07 ± 1,25	20,68 ± 0,96
(ДАГ-1)	238,55 ± 8,4	556,70 ± 7,6	101,2 ± 6,2
(ДАГ-2)	492,80 ± 7,0	278,08 ± 4,8	91,88 ± 4,4

Анализ результатов выявил, что активность ПО, ПФО, ФАЛ в корнях проростков хлопчатника, у которых семена были обработаны препаратами ДАГ-1 и ДАГ-2, сохранялась до 30 дней во всех сортах по отношению к контрольным. Проведенный в дальнейшем учет морфофизиологических признаков показал, что у неустойчивого сорта хлопчатника С-4727 выявлено не только снижение значений “вилт индекса”, но и стимулирующее действие на рост и развитие хлопчатника. Аналогичные результаты были получены и для устойчивых

Наманган-77, и С-6524 сортов хлопчатника. Высокая пролонгирующая активность исследованных препаратов еще раз подчеркивает их индуцирующее свойство. На препараты получен патент Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан.

Таким образом, наши исследования дали возможность выяснить первичный механизм функционирования защитных реакций хлопчатника при использовании препаратов нового поколения ДАГ-1 и ДАГ-2, полученных из корней солодки, активирующих защитные реакции в самом растении и индуцирующих системную устойчивость к грибу *F. oxysporum* и *V. dahliae*.

1. Горовой Л.Ф., Кошевский И.И., Редько В.В., Теслюк В.В. Препараты нового поколения для защиты растений - Сборник трудов НАН Украины. 2002. С.87-92.

2. Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И. Активность фенилаланин аммиак-лиазы и ингибиторов протеолитических ферментов в проростках пшеницы при септориозе // Физиология и биохимия культур растений. 2000. Т.32. С.223–229.

3. Минибаева Ф.А., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиология растений.2003. Т.50. С.459-464.

КЛЕТОЧНЫЕ МИШЕНИ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ НА УРОВНЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ

Е.Н. Баранова[1], И.Г. Широких[2], Л.В. Куренина[1], А.А. Гулевич[1]

[1]ФГБНУ Всероссийский научно исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия; e-mail: greenpro2007@rambler.ru

[2]ФГБНУ Научно исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока, г. Киров, Россия

Большинство современных растений может выживать и осуществлять жизнедеятельность в крайне узком диапазоне, формирование устойчивости к которому происходило в течении длительного эволюционного отбора. Особенностью растений является неодинаковые

для различных стадий онтогенеза условия зоны оптимума, зоны адаптации и зоны необратимых повреждений. Находящиеся в покое семена могут переносить относительно широкий спектр температур, изменение газового состава, проростки часто отличаются по устойчивости от растений на более поздних стадиях, формирование зародыша часто требует еще более узкого диапазона зоны оптимума. При изменении условий среды, которое характеризуется выходом из оптимальной зоны, в ряде случаев возможны адаптационные изменения, которые обеспечивают выживание в изменившихся условиях. Растения сильно отличаются по устойчивости клеток различных тканей, в ряде случаев можно наблюдать изменения в чувствительности к абиотическим стрессорам в зависимости от плоидности. Наибольшим диапазоном устойчивости обладают два типа клеток: 1) клетки с высокой степенью специализации и обладающие устойчивостью к повреждающему действию, часто имеющие специфические преобразования в структурной организации (специализированные вакуоли), изменение структуры синтетических и запасающих компартментов (ЭПР, диктиосом, вакуолей, пластид), изменений дыхательного и фотосинтетического метаболизма (пластиды, митохондрии) и 2) клетки с низкой степенью вакуолизации, с высокой плотностью цитоплазмы, поэтому такие ткани как ткани зрелых семян, первичной апикальной меристемы, клетки перицикла, молодые клетки устьиц, клетки протоксилемы могут обладать большим потенциалом для выживания в неблагоприятных и даже экстремальных условиях. Устойчивость второй группы связана с наличием окружающих их клеток, находящихся на более позднем этапе дифференцировки. С этим связан интересный феномен, наблюдаемый при попытках получить устойчивую к какому-либо фактору клеточную популяцию. При использовании стрессового фактора высокой интенсивности выжившие клетки могут длительное время культивироваться в неблагоприятных условиях, но теряют способность к морфо- и органогенезу. В таком каллусе можно наблюдать крупные вакуолизированные клетки паренхимного типа и часто клетки, идентичные ситовидным трубкам. В случае краткосрочного культивирования и не приближающихся к летальному порогу отбора концентраций сохраняются очаги невакуолизированных клеток меристематического типа, которые при помещении в условия более слабого воздействия могут восстанавливать

морфогенетический потенциал. При изучении клеток такой культуры на этапе отбора наблюдали резкое деление клеток на очаги с различной степенью организации, которые при сильном абиотическом воздействии погибали, наблюдали типичные для клеток целого растения исследуемых культур повреждения, связанные с изменением плотности цитоплазмы, ее фрагментации, образовании наблюдаемых в вакуоли фрагментов цитоплазмы, изменении расположения, количества конденсированного хроматина и организации ядер, характерных для программируемой клеточной гибели. Активные формы кислорода (АФК) являются естественным регулятором, так как восприниматься функциональными клеточными системами как сигнальные и при их переизбытке вызывают повреждения на уровне отдельных компартментов и на уровне клетки в целом. Использование АФК и реакции на них как универсальной системы можно наблюдать при изучении любого абиотического стрессора в диапазоне адаптации как в условно положительных, так и условно отрицательных зонах. При изучении цитологических изменений, вызываемых такими абиотическими факторами как токсичность алюминия, солей натрия у культурных растений удается выявить неспецифические последствия повышения АФК: нарушение процесса образования вакуолей, преобразование мембранных структур клетки, образование вакуолярных включений, содержащих отдельные органеллы и большие фрагменты цитоплазмы, нарушение интерфазного и митотического цитоскелета [1], нарушение формы и структурной организации субкомпартментов клеточных доменов, нарушение целостности клеточных органелл, нарушение уровня компактизации ДНК клеточных компартментов (ядра, пластид, митохондрий).

Неблагоприятные факторы приводили к нескольким формам повреждения вакуолярного компартмента (нарушению слияния вакуолей, отложению осмиофильных образований вдоль вакуолярной мембраны, фрагментацию мембраны, образованию связанных с органеллами или их фрагментами инвагинаций и разрывов, образованию содержащих как соединенные с основным содержимым (неправильной формы), так и локализованным в отдельные правильной округлой формы фрагменты цитоплазмы, включающих митохондрии и пластиды внутри вакуоли) [2-4].

Стрессоры вызывают обратимые нарушения цитоскелета (изме-

нение упорядоченной организации кортикальных микротрубочек, их фрагментацию, образование утолщенных пучков). При большой длительности воздействия, а также при применении высокой интенсивности воздействия наблюдали необратимые (образование кристаллических образований различной толщины, выявляемых как в цитоплазме, так и в ядре) [1, 3]. Кристаллы могут представлять собой следствие нарушений формирования препрофазного кольца.

Интересным фактом является изменение степени конденсации хроматина и ДНК органелл при всех видах изученных нами воздействий. Наибольшие отличия можно наблюдать у двудольных видов с мелкими хромосомами в районах, прилегающих к ядерной оболочке и традиционно связанных с теломерными областями. У однодольных видов, для которых характерны крупные хромосомы, отличия наблюдали во всех зонах клетки. При действии абиотических стрессов возрастает вероятность нарушения формы ядра (множественные инвагинации и «туннели»), а также вероятность включений внутри ядра, попадающих туда при нарушениях митотического цитоскелета (липидные капли, фрагменты органелл, кристаллы различных белков, в том числе цитоскелета, формирование которого нарушилось) [3]. Ряд воздействий может вызывать либо сильную конденсацию, либо деконденсацию хроматина по отношению к контрольным клеткам в зависимости от применяемого диапазона (концентрации), которая снимается при окончании воздействия. Отличия между тканями существенны - отдельные изменения могут относиться только к определенной зоне (ткани) корня или листа, именно поэтому ряд авторов наблюдает артефакты на биохимическом уровне, которые не удается подтвердить другими методами. В ряде случаев это может быть вызвано гибелью пула клеток, например, при образовании аэренхимы.

Таким образом, мишени абиотических стрессов, основным повреждающим агентом которых выступают АФК, могут служить все функционально активные компартменты клеток. Наиболее очевидные неспецифические реакции являются общими для разных воздействий, что также подтверждает общность действующих механизмов. Роль «агрессора» в настоящее время отводится именно АФК [4], часто приводящим к ПКГ части клеток. Выявление же более или менее специфических мишеней для каждого воздействия в этой связи достаточно проблематично, и при отсутствии сложных систем контроля

результаты экспериментов могут оказаться неинформативными и характеризоваться множеством ложных результатов, получение информации по которым будет бесперспективным.

1. Лазарева Е.М., Баранова Е.Н. Смирнова Е.А. Реорганизация системы микротрубочек клеток корня Medicago sativa в условиях акклимации к осмотическому и солевому стрессам // Цитология. 2017. Т. 59. С. 34-44.

2. Baranova, E. N., Gulevich, A. A., Kalinina-Turner, E. B., Koslov, N. N. (2011). Effects of NaCl, Na_2SO_4 and mannitol on utilization of storage protein and transformation of vacuoles in the cotyledons and seedling roots of alfalfa (*Medicago sativa L.*)// Russian Agricultural Sciences, 37(1), 11-19.

3. Баранова Е.Н., Чабан И.А., Кононенко Н.В., Халилуев М.Р., Христов Н.К., Гулевич А.А., Тодоровска Е.Г. Ультраструктурная организация доменов клеточного ядра некоторых двудольных и однодольных растений при действии абиотических стрессовых факторов // Российская сельскохозяйственная наука. 2017. № 2. С. 3-10.

4. Рябовол В.В., Минибаева Ф.В. Молекулярные механизмы аутофагии в растениях: роль белка ATG8 в формировании и функционировании аутофагосом // Биохимия. 2016. Т. 81. № 4. С. 487-505.

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА, ВЫЗВАННОЕ ЗАСОЛЕНИЕМ, ВЫЗЫВАЕТ РЕОРГАНИЗАЦИЮ ЦИТОСКЕЛЕТА В КЛЕТКАХ КОРНЕЙ ТОМАТА

Е.Н. Баранова [1], Е.М. Лазарева [1,2], И.А. Чабан [1],
Н.В. Кононенко [1], Е.А. Смирнова[1,2]

[1]*ФГБНУ Всероссийский научно исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия, e-mail: greenpro2007@rambler.ru*

[2]*Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия.*

Многие абиотические и биотические факторы вызывают у растений стрессовую реакцию, в ходе которой увеличивается уровень выработки в клетках активных форм кислорода (АФК). Мишенями для АФК в клетках могут быть разные молекулярные и физиологиче-

ские процессы, а также клеточные органеллы. Известно, что абиотические стрессовые факторы индуцируют реорганизацию системы микротрубочек, что ведет к нарушению прохождения митоза и цитокинеза [1]. В нашей работе мы проанализировали состояние тубулинового цитоскелета в клетках корней *Solanum lycopersicum* L. при действии длительного хлоридного и сульфатного засоления.

Объектом исследования служили растения томата *Solanum lycopersicum* L. сорта Белый налив. Для имитации абиотического стресса, растения инкубировали в присутствии NaCl и Na_2SO_4 в изотонических концентрациях, соответствовавших 400 кПа в течение 6 суток. Уровень АФК в корнях томата определяли с помощью флуоресцентного маркера Carboxy-H2DFFDA (ThermoFisher Scientific), микротрубочки выявляли с помощью иммуноцитохимии с использованием антител к тубулину (Sigma-Aldrich), фиксация и приготовление образцов для просвечивающей электронной микроскопии также проводили по методике описанной ранее [2].

В корнях томата, которые выращивали в нормальных условиях, маркер АФК Carboxy-H2DFFDA выявлялся только в апикальной части чехлика корней (рисунок 1 а,б). После инкубации с солями Carboxy-H2DFFDA накапливается в клетках разных зон корня, что указывает на повышение содержания в этих клетках/зонах уровня выработки АФК и активацию окислительного стресса (рисунок 1 в-е).

Изучение организации системы микротрубочек в клетках, выделенных из корней с нарушенным гомеостазом АФК показало, что по сравнению с контролем, когда в интерфазных клетках микротрубочки формируют кортикальную сеть, состоящую из пучков, располагающихся параллельно друг другу и ориентированных перпендикулярно оси роста клеток (рисунок 2 а), в присутствии солей сеть кортикальных микротрубочек имела признаки дезорганизации.

Хлорид натрия вызывал нарушение упорядоченной организации кортикальных пучков, хаотизацию сети, фрагментацию, укорочение и утолщение пучков, формирование фокусов схождения микротрубочек (рисунок 2 б,в). При выращивании в присутствии сульфата натрия, в клетках также выявлялась хаотизация сети микротрубочек, изменение ориентации пучков микротрубочек относительно оси роста и формирование фокусов схождения (рисунок 2 г,д).

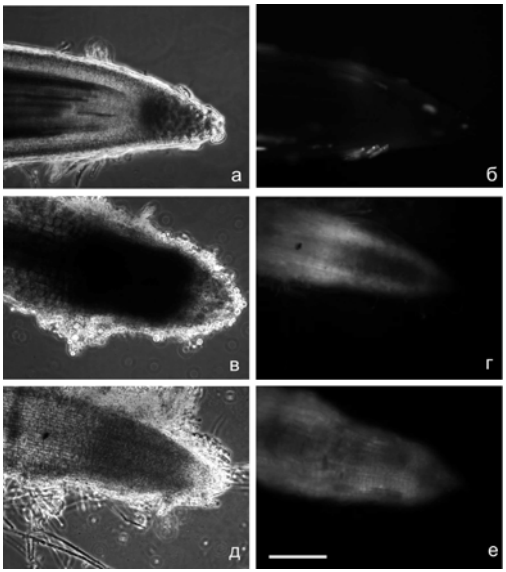


Рисунок 1. Определение уровня АФК в клетках корней томата в контроле (а, б), при действии сульфата (в,г) и хлорида натрия. (а,в,д) – фазовый контраст, (б,г,е) – флуоресценция Carboxy-H2DFFDA в клетках с повышенным уровнем АФК. Масштаб – 100 μm.

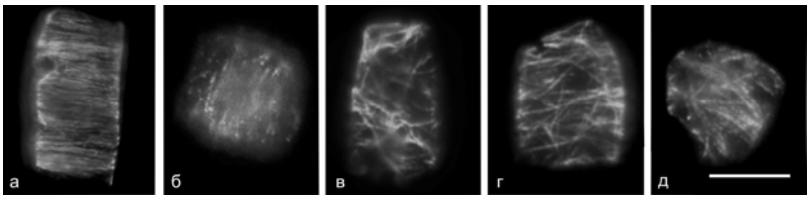


Рисунок 2. Микротрубочки в клетках корней томата с контроле (а), после действия хлорида натрия (б,в) и сульфата натрия (г,д). Масштаб – 5 μm.

Исследование клеток корней с помощью трансмиссионной электронной микроскопии показало, что в клетках корней томата в кортикальной цитоплазме выявлялись микротрубочки, которые располагались параллельно или перпендикулярно клеточной стенке (рисунок 3 а, б, в). Однако, в присутствии солей хлорида и сульфата натрия, в цитоплазме клеток, кроме микротрубочек, присутствовали атипичные элементы цитоскелета, отсутствующие у растений, не подвергавшихся стрессовому воздействию. Такие атипичные элементы цитоскелета

были представлены разными по протяженности и толщине тяжами, состоящими из плотно упакованных прямых или волнистых фибриллярных нитей (рисунок 3 г-и).

Таким образом, воздействие солей вызывает в клетках повышение уровня АФК, изменение упорядоченной организации системы микротрубочек и появление атипичных элементов цитоскелета. Эти элементы цитоскелета по структуре идентичны тубулиновым агрегатам, которые формируются при экспериментально индуцированном дисбалансе АФК [3]. Предполагается, что взаимодействие АФК и микротрубочек обеспечивает восприятие стрессовой ситуации и запускает соответствующую ответную реакцию. Во время этого процесса важную роль выполняет ремоделирование тубулинового цитоскелета.

Наши данные указывают на то, что после индуцированной абиотическим стрессовым воздействием деполимеризации микротрубочек (полной или частичной) в клетках корней томата присутствуют не только микротрубочки, но и собираются атипичные тубулиновые полимеры. Значение этих структур в защитной реакции растений на стресс требует детального изучения.

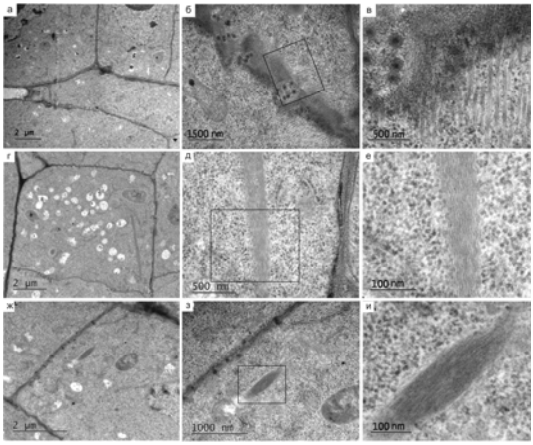


Рисунок 3. Ультраструктура компонентов цитоскелета в клетках корней томата в контроле (а, б, в), после действия хлорида натрия (г, д, е) и сульфата натрия (ж, з, и).

1. Livanos P., Apostolakos P., Galatis B. Plant cell division: ROS homeostasis is required // Plant Signal. Behav. 2012. V. 7. P. 771–778.

2. Лазарева Е.М., Баранова Е.Н. Смирнова Е.А. Реорганизация

системы микротрубочек клеток корня *Medicago sativa* в условиях акклимации к осмотическому и солевому стрессам // Цитология. 2017. Т. 59. С. 34-44.

3. Livanos P., Galatis B., Quader H., Apostolakos P. Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces atypical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana* // Cytoskeleton (Hoboken). 2012. V. 69. P. 1–21.

ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ РЕДОКС-СИСТЕМ В СВЯЗИ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ ПШЕНИЦЫ К КАДМИЮ

М.В. Безрукова, А.Р. Лубянова, Ф.М. Шакирова

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия; e-mail: lectin@anrb.ru

Доступность воды для растений является важнейшим экологическим фактором, который определяет их выживаемость, рост и, в конечном счете, урожайность. Известно, что ряд абиотических стрессовых воздействий, в том числе и тяжелые металлы, вызывают в растениях сходные изменения, приводящие к нарушению водного обмена. Совокупность полученных нами ранее данных с использованием ингибитора биосинтеза АБК флуридона позволила получить доводы в пользу ключевой роли эндогенной АБК в регуляции активации транскрипции гена агглютинина зародыша пшеницы (АЗП), транзиторного накопления этого лектина в предобработанных салициловой кислотой (СК) проростках в норме и в условиях кадмиевого стресса и его выхода в окружающие корни среду, а также важного вклада АЗП в проявление защитного эффекта СК на деление клеток при действии стресса.

Опыты по влиянию 1 мМ ацетата кадмия ($Cd(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$) проводили на 6-суточных проростках пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Башкирская 26. Известно, что воздействие кадмиевого стресса приводит к снижению доступности воды для растительных клеток и влияет на рост и развитие этих растений. Исследование осмотического потенциала и относительного содержания воды (ОСВ) в подверг-

нутых 7 ч воздействию ацетата кадмия растениях выявило снижение в корнях этих параметров. Кроме того, наблюдалось значительное (почти на 50%) подавление деления клеток меристемы. ОСВ корней предобработанных СК проростков за 7 ч воздействия стресса поддерживалось близким к контрольному значению, а в надземной части превышало его (90% в контроле и 96% в варианте СК + Cd). Поскольку для обеспечения водного статуса растений при стрессе важным является поддержание их осмотического потенциала на уровне, способном обеспечивать приток воды из среды в растение, выявленное нами более высокое значение осмотического потенциала в предобработанных СК растениях при воздействии ацетата кадмия свидетельствует о повышении водоудерживающей способности, тогда как меньший уровень выхода электролитов из растительных тканей о стабилизации клеточных мембран.

Важную роль в защите корней и в целом растений от поступления в них токсических ионов играет укрепление эндо- и экзодермального апопластных барьеров, включая пояски Каспари. Их транспортные свойства зависят от содержания в них количества биополимеров лигнина и суберина, а также локализации этих соединений. Использование флуоресцентной и конфокальной микроскопии позволило параллельно провести анализ локализации лигнина и суберина на поперечных срезах базальной части корней в видимой и ультрафиолетовой области спектра соответственно, а также выявить в них пояски Каспари в эндо- и экзодерме. Для обнаружения лигнина срезы корня были окрашены реактивом Визнера (флороглюцин - HCl). Затем их исследовали с использованием флуоресцентного микроскопа (Keyence BZ-8100, Япония) в видимой области спектра (лигнин) и при возбуждающей 360/40 и поглощающей 460/50 длине волны после отражения через дихроичное зеркало при длине волны 400 (суберин). Лигнин и суберин в поясках Каспари (рис.1) были выявлены последовательным окрашиванием растворами 0.1% берберина гемисульфата и 0.05% толуидинового синего. Срезы просматривали с помощью конфокального микроскопа (LSM 510, Германия), с использованием комбинации фильтров BP 450-490/FT 510/LP 520.

Под влиянием действия ацетата кадмия дополнительное отложение лигнина по сравнению с контролем выявлено на поперечных срезах в клеточных стенках суберинизированного U-образного утолще-

ния эндодермы и особенно внешней области этих клеток, за исключением пропускных, прилегающем слое клеток первичной коры и сосудах ксилемы. Вместе с тем, наблюдалась дополнительная суберинизация лигнифицированной экзодермы в области поясков Каспари (оставляющая свободными плазмодесмы) и перицикла. Ранее на давленых препаратах базальной части корней нами было показано, что вклад в повышение устойчивости проростков пшеницы к кадмию под влиянием СК и АЗП вносит их способность ускорять отложение лигнина в клеточной стенке, вовлекая в этот процесс помимо центрального цилиндра клетки первичной коры, вследствие чего наблюдается торможение проникновения токсических ионов в ткани корня и далее в побег.

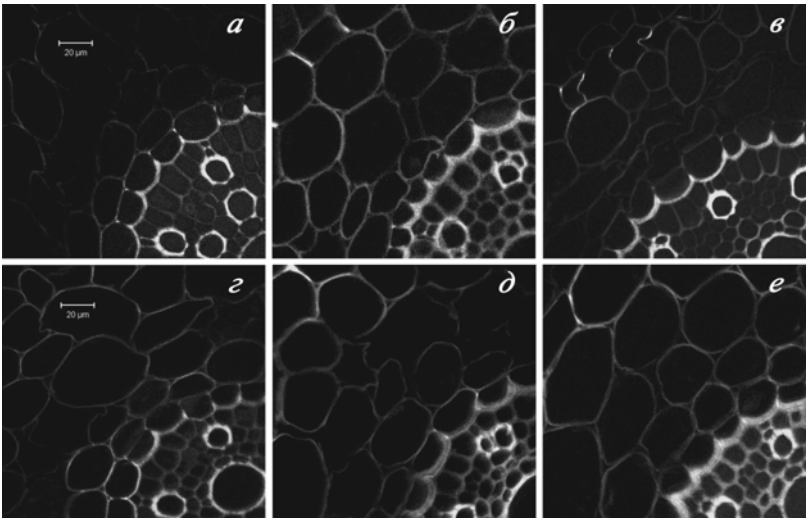


Рисунок 1. Локализация лигнина, суберина и выявление поясков Каспари в экзо- и эндодерме на поперечных срезах корней 6-суточных проростков пшеницы, окрашенных берберина гемисульфатом / толуидиновым синим. а – контроль; б - 7 ч 1 мМ Cd; в - предпосевное замачивание в 50 мкМ СК; г – предобработка СК + 7 ч Cd; д – 24 ч предобработка 28 нМ АЗП; е - 24 ч АЗП + 7 ч Cd. Масштабная линейка = 20 мкм

Действительно, предпосевная обработка СК способствовала усилению относительно контроля лигнификации и суберинизации клеточных стенок эндодермы, преимущественно радиальных, экзодер-

мы, частично включая наружный слой первичной коры, и в меньшей степени стели, перицикла. СК-предобработанные проростки, подвергнутые воздействию кадмия, характеризовались дополнительным отложением лигнина и суберина в клетках экзодермы, первичной коры, особенно ее наружного слоя и внешней тангентальной области последующего, эндодермы, а также перицикла, стели и частичной лигнификацией сосудов. Предобработка АЗП оказала сходный действию СК предадаптирующий эффект на растения и привела к дополнительному относительно контроля отложению лигнина и суберина в области поясков Каспари, как в эндо- , так и в экзодерме, включая плазмодесмы, за счет ускорения развития этих растений. Специфическое окрашивание поперечных срезов корней для выявления суберина суданом III подтвердило результаты, полученные с использованием флуоресцентной микроскопии.

Воздействие токсических ионов кадмия приводит к сверхпродукции активных форм кислорода и активации супероксиддисмутазы и пероксидазы, а также усилению перекисного окисления липидов (ПОЛ), тогда как в предобработанных СК растениях эти показатели значительно меньше. Вероятно, это связано со способностью СК в ходе предобработки вызывать сбалансированное усиление генерации $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 и активности антиоксидантных ферментов в проростках пшеницы, которые участвуют в нейтрализации вызываемого кадмием окислительного взрыва. Совокупность полученных ранее результатов указывает на важную роль СК-индуцированного новообразования АБК в регуляции активации СК ключевых компонентов биосинтеза лигнина. Проведенный нами гистохимический анализ позволил выявить колокализацию H_2O_2, важного компонента, вовлеченного в лигнификацию растений, и ПОЛ (рис. 2) в области эндо- и экзодермы, что свидетельствует об участии пероксидазы в модификации компонентов клеточной стенки при кадмиевом стрессе.

Таким образом, под влиянием СК при стрессе выявлено отложение лигнина и суберина в клеточных стенках корней в критических местах эндо- и экзодермального апопластного барьеров, особенно в области поясков Каспари, что отразилось в торможении поступления кадмия в центральный цилиндр и далее в побег и снижении степени негативного действия стресса на ростовые процессы проростков. Важный вклад в проявление действия СК на укрепление барьерных

свойств клеточных стенок исследуемых тканей вносит способность СК вызывать АБК-опосредованное накопление АЗП, который в свою очередь, также способствует ускорению отложения биополимеров лигнина и суберина в клеточных стенках корней.

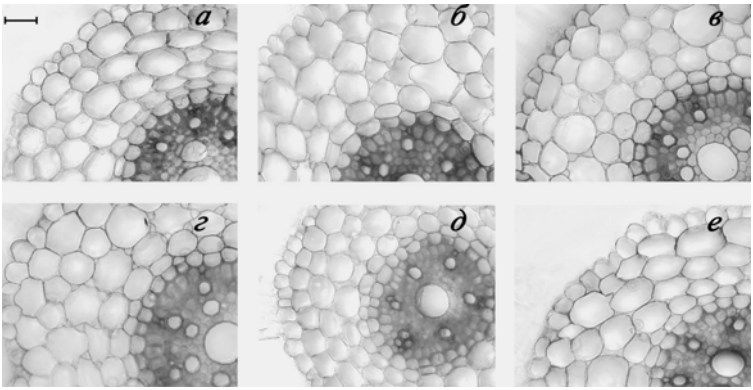


Рисунок 2. Локализация ПОЛ на поперечных срезах корней 6-суточных проростков пшеницы, окрашенных реактивом Шиффа. а – контроль; б - 7 ч 1 мМ Cd; в - предпосевное замачивание в 50 мкМ СК; г – предобработка СК + 7 ч Cd; д – 24 ч предобработка 28 нМ АЗП; е – 24 ч АЗП + 7 ч Cd. *Масштабная линейка = 20 мкм*

ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ГЕНЕРАЦИЮ В РАСТЕНИЯХ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

Д.К. Благова, Е.Р. Сарварова, Р.М.Хайруллин, И.В. Максимов
ФБГУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия; e-mail: blagova_darya@mail.ru

В последнее десятилетие особое внимание микробиологов привлекают эндофитные бактерии, изолируемые из поверхностно стерилизованных растительных тканей. Согласно определению Bai с соавторами [1] к эндофитам относятся микроорганизмы, колонизирующие внутренние растительные ткани, поддерживающие рост и развитие растений и не вызывающие у них болезней.

Активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в фи-

зиологии растений. Под контролем АФК находятся реакции сверхчувствительности и апоптоза. В частности, при патогенезе, благодаря реакции сверхчувствительности, вокруг патогена формируется зона из мертвых растительных клеток, насыщенных антимикробными соединениями [2]. АФК и продукты окислительной модификации биомолекул, образующиеся под их воздействием, могут играть роль вторичных мессенджеров в сигнальной трансдукции в геном, в т.ч. при стрессе [3], что может быть связано с изменением редокс-потенциала различных сенсорных белков. АФК способны окислять редокс-чувствительные белки непосредственно или опосредованно через молекулы, контролирующие окислительно-восстановительное состояние клетки (глутатион, тиоредоксин) [4].

Эндофиты индуцируют системную устойчивость (СИУ) к широкому спектру вредителей и патогенов, характеризующуюся быстрым и ранним накоплением АФК, в том числе пероксида водорода (H_2O_2),который активирует редокс-чувствительные транскрипционные факторы и гены защитных белков [5]. Сурфактин, продуцируемый *B. subtilis* вызывал зависимое от ионов Ca^{2+} подщелачивание среды и накопление активных форм кислорода (АФК) [6]. Эти данные предполагают, что путь СПУ, связанный с генерацией АФК и запускающийся салициловой кислотой, также может быть вовлечен в механизмы индукции защитной системы, опосредованные циклическими липопептидами [7].

В растениях картофеля, инфицированных оомицетом *Phytophthora infestans* и пшеницы, инфицированных грибом *Septoria nodorum,* эндофитный штамм бактерии *B. subtilis* 26Д индуцировал СИУ через процесс накопления H_2O_2 и усиление транскрипционной активности генов PR-белков [8; 9].

Вызываемая эндофитами СИУ сохраняется в растениях долгое время и эффективно работает против патогенов даже в условиях хранения [8]. Она проявляется в каскадном раннем, быстром и многократном накоплении уровня АФК, в том числе и H_2O_2 после начала инфицирования и запуске экспрессии редокс-чувствительных транскрипционных факторов и генов PR-белков, а также регулирует взаимодействие СК, ЖК и этиленового сигнальных путей [5; 10]. Так, ризобактерия *P. putida* LSW17S индуцировала быстрое накопление транскриптов PR-генов и продукцию H_2O_2 в растениях томата, инфи-

цированных *P. syringae pv. tomato* DC3000, что приводило к ингибированию развития патогена [11].

При развитии СИУ, индуцированной эндофитами, генерация АФК в растениях может играть критическую роль в формировании эффекта праймирования [12]. Феномен праймирования генома хозяина под влиянием бактериальных агентов заключается в приобретении растительными клетками повышенной чувствительности к воздействию чужеродных веществ и характеризуется более быстрой и сильной активацией клеточных механизмов защиты растения при атаке патогенами или насекомыми и может длиться довольно долго, что приводит к повышению устойчивости растений [12, 10, 13]. Выдвигаются предположение, что такое праймирование под влиянием бактерий связано с изменением статуса метилирования ДНК в геноме растений [14].

1. Bai Y., Zhou X., Smith D.L. Enhanced soybean plant growth resulting from co inoculation of Bacillus strains with *Bradyrhizobium japonicum* // Crop science. 2003. V.43. P. 1774-1781.

2. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Успехи современной биологии. 2006. Т. 126. С. 250-261.

3. Mitteler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends in Plant Science. 2002. V. 7 (9). P. 405-410.

4. Aroca R., Irigoyen J.J., Sanchez-Diaz M. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against oxidative stress during chilling and subsequent recovery in two maize varieties differing in chilling sensitivity // Plant Science. 2001. V. 161. P. 719-726.

5. Torres M.A. ROS in biotic interactions // Physiol. Plant., 2010. V. 138. P.414–429

6. García-Gutiérrez L., Zeriouh H., Romero D., Cubero J., de Vicente A., Pérez-García A. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses // Microb. Biotechnol. 2013. V.6(3). P.264-274.

7. Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils // Environ. Chem. Lett. 2009. V. 7. P. 1–19.

8. Максимов И.В., Абизгильдина Р.Р., Юсупова З.Р., Хайруллин Р.М. Влияние бактерий *B. subtilis* 26Д на содержание пероксида водорода и активность пероксидазы в растениях яровой пшеницы // Агрохимия. 2010. № 1. С. 55–60.

9. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Role of jasmonic acid in interaction of plants with plant growth promoting rhizobacteria during fungal pathogenesis // Jasmonic Acid: Biosynthesis, Functions and Role in Plant Development. Ch. 3 / Ed. Morrison L. New York: Nova Sci. Publ., 2015. P. 33-66.

10. Pieterse C.M., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., van Wees S.C., Bakker P.A. Induced systemic resistance by beneficial microbes // Annu. Rev. Phytopathol. 2014. V. 52. P. 347–375.

11. Ahn I.P., Lee S.W., Kim M.G., Park S.R., Hwang D.J., Bae S.C. Priming by rhizobacterium protects tomato plants from biotrophic and necrotrophic pathogen infections through multiple defense mechanisms // Mol. Cells. 2011. V. 32. P. 7–14.

12. Conrath U., Beckers G.J.M., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F., Newman M.A., Pieterse C.M.J., Poinssot B., Pozo M.J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne W., Zimmerli L., Mauch-Mani B. Priming: getting ready for battle // Mol. Plant–Microbe Interact. 2006. V. 19. P. 1062–1071.

13. Максимов И.В., Сорокань А.В., Нафикова А.Р., Беньковская Г.В. Возможность и механизмы действия *Bacillus subtilis* 26Д и гифомицета *Beauveria bassiana* Уфа-2 при применении для защиты растений картофеля от фитофтороза и колорадского жука // Микология и фитопатология. 2015. Т. 49(5). С. 317-324.

14. Da K., Nowak J., Flinn B. Potato cytosine methylation and gene expression changes induced by a beneficial bacterial endophyte, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN // Plant Physiology and Biochemistry. 2012. V.50. P.24-34.

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА РЕДОКС-ПРОЦЕССЫ В РАСТЕНИЯХ

Е.В. Бойко, А.Н. Видершпан, Е.В. Симон, И.Ф. Головацкая
Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия; e-mail: CaterinaSoloveva@gmail.com

Процесс фотосинтеза, рост и адаптация растений к факторам среды непосредственно связаны с образованием активных форм кислорода (АФК). В избыточном количестве АФК могут оказывать негативное воздействие вплоть до гибели организма. У животных и человека одним из сильнейших антиоксидантных веществ является гормон мелатонин. На сегодняшний день доказано, что мелатонин имеет повсеместное распространение как в царстве животных, так и в царстве растений. Установлено, что мелатонин повышает устойчивость ряда растений к различным неблагоприятным факторам окружающей среды. Мелатонин усиливает деятельность ферментов антиоксидантной системы [1] и влияет на уровень экспрессии большого числа генов арабидопсиса, отвечающих за реакции растений в ответ на действие стрессоров [2]. Есть данные о том, что экзогенно внесенный мелатонин повышает квантовый выход фотосинтеза у харовых водорослей, возможно за счет защиты фотосинтетического аппарата от АФК. Данных о влиянии мелатонина на редокс-процессы высших растений на сегодняшний день недостаточно. В связи с этим целью данного исследования стало изучение влияние мелатонина на редокс-процессы в растениях.

Исследование проводили на 7-дневных проростках *Lychnis chalcedonica* L. в темноте и на красном свету. Проростки *L. chalcedonica* выращивали на ½ питательной среде Мурасиге–Скуга до 5-дневного возраста, затем в питательную среду вносили мелатонин в концентрации 0,1 пМ или 1 мкМ, культивировали в течение 2 суток. У 7-дневных проростков определяли ростовые и физиологические параметры (содержание фотосинтетических пигментов, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ)).

В результате исследования показано влияние мелатонина на рост проростков лихниса. Мелатонин в низкой концентрации увеличивал длину корня в темноте. На красном свету экзогенный мелатонин ока-

зывал незначительный ингибирующий эффект на растяжение гипокотиля при высокой концентрации гормона. В то же время длина корня уменьшалась при обработке мелатонином в низкой концентрации. Обработка 0,1 пМ мелатонином уменьшал размеры семядолей, изменение роста которых сопровождалось изменением уровня фотосинтетических пигментов. С увеличением концентрации мелатонина происходило увеличение содержания всех групп фотосинтетических пигментов в расчете на единицу массы. Увеличение в 2,5 раза всех групп фотосинтетических пигментов отмечено при обработке растений мелатонином в концентрации 1 мкМ на красном свету. Такая реакция осевых органов проростков лихниса могла быть связана с изменением уровня эндогенного мелатонина, поскольку в соответствии с данными, полученными F. Afreen с соавтрами [3], красный свет может увеличивать его уровень в корнях относительно действия синего и белого света.

Для выяснения роли мелатонина в окислительных реакциях *Lychnis chalcedonica* определяли интенсивность ПОЛ. В контрольных проростках лихниса, как в темноте, так и на красном свету показана органоспецифичность в регуляции интенсивности ПОЛ. Уровень МДА в семядолях проростков, был выше в 2 раза, чем в гипокотилях, что вероятно обусловлено выполняемыми функциями органов. В семядолях происходит большое количество энергетических процессов, в результате которых образуется множество свободных радикалов, а гипокотиль выполняет преимущественно функцию транспорта веществ. Анализ интенсивности ПОЛ показал, что при выращивании растений на красном свету данный показатель выше в семядолях и гипокотилях, чем у контрольных растений (темнота). Это вероятнее всего было связано с тем, что на этом участке ФАР в семядолях осуществлялся процесс фотосинтеза, который служил естественным источником активных форм кислорода в растении. Внесение экзогенного мелатонина изменяло направленность окислительных процессов в зависимости от условий освещения. В темноте интенсивность ПОЛ возрастала в семядолях с повышением концентрации гормона, тогда как в гипокотиле отмечена противоположная реакция, данный показатель снижался. Выращивание растений на красном свету и экзогенная обработка мелатонином приводила к падению интенсивности ПОЛ как в семядолях, так и в гипокотилях с увеличением концентра-

ции мелатонина.

Таким образом, полученные данные свидетельствовали о зависимости активности мелатонина в регуляции ростовых и физиологических процессов в проростках *Lychnis chalcedonica* от условий освещения (темнота, красный свет), реализующих разные программы развития – скотоморфогенез и фотоморфогенез.

1. Li C., Tan D.X., Liang D., Chang C., Jia D., Ma F. Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress // J. Exp Bot. 2015. Vol. 66, №. 3. P. 669-680.

2. Weeda S., Zhang N., Zhao X. Ndip G., Guo Y., Buck G.A., Fu C., Ren S. Arabidopsis transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems // PLoS ONE. 2014. Vol. 9(3): e93462.

3. 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. V. 41. P. 108–115.

ВЛИЯНИЕ МНОГОСЛОЙНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА УРОВЕНЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ

К.П. Бурая, Л.Н. Скрыпник, Н.Н. Шушарина

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия;
e-mail: luba.skrypnik@gmail.com

Спроектированные инженерные наночастицы – это наночастицы, которые обладают уникальными физико-химическими свойствами, например, малой площадью поверхности, атипичной структурой поверхности, повышенной реакционной способностью, и т.д. Данные нанотрубки четко отличаются от их молекулярных и объемных аналогов. Эти свойства, как правило, являются результатом небольшого размера, химического состава, структуры поверхности, стабильности, формы и агломерации наночастиц [1]. Учитывая эти уникальные свойства, наночастицы все чаще используются в различных потребительских и коммерческих продуктах, в том числе полупроводниках,

микроэлектронике, катализаторах, повседневных бытовых изделиях (например, косметике и солнцезащитных средствах), а также для доставки лекарств. Эти же принципы могут быть применены и к растительным системам [2].

Агрономическое применение растительных нанотехнологий несомненно имеет высокий потенциал [3]. Так в отличие от обычного производства, нанотехнологии позволяют контролировать использование агрохимикатов (например, удобрений, пестицидов и гербицидов) и их поступление в окружающую среду, за счет целевой доставки конкретных целевых биомолекул (например, белков и активаторов) в нужные участки или органы растения [4].

В связи с тем, что на сегодняшний день еще не достаточно исследована роль углеродных нанотрубок в обменных процессах растений, целью данной работы явилось изучение влияния многослойных углеродных нанотрубок на развитие окислительного стресса в клетках растений. В данном исследовании предполагается, что, будет наблюдаться зависимость развития окислительного стресса в клетках растений от времени воздействия нанотрубок на растение и их концентрации.

В качестве объекта исследования использовались 14-дневные проростки ржи посевной (*Secale cereale* L.) и листья растения фикуса бенжамина (*Ficus benjamina* L.) . Растения ржи посевной и фикуса бенжамина выращивались при естественных условиях. Для проведения эксперимента побеги растений одинаковой массы помещались в растворы углеродных многослойных наноструктурных частиц (углеродные нанотрубки) с разными концентрациями и в течение 8 дней опрыскивались этими же растворами. Концентрация углеродных нанотрубок составляла: 0 мг/л;0,5 мг/л;1 мг/л;2 мг/л. В качестве контроля использовались растения, с нулевой концентрацией углеродных нанотрубок.

Анализ растений осуществляли на 2-е, 4-е, 6-е, 8-е сутки после помещения и опрыскивания побегов наноструктурными частицами (углеродными нанотрубками). Определяли содержание пероксида водорода в растениях [5]. Опыты проводили в четырех биологических повторностях для каждого вида растения. Данные по содержанию пероксида водорода представлены в пересчете на грамм сухого веса. Полученные данные были обработаны с использованием пакета элек-

тронных таблиц Microsoft Exel и представлены в виде средних арифметических значений с указанием стандартного отклонения. Достоверность различия между вариантами опыта определяли по критерию Тьюки-Крамера. Различия были достоверны при $p<0.05$.

В результате проведенных исследований было установлено, что концентрация пероксида водорода была достоверно выше в листьях растения фикуса бенджамина (*Ficus benjamina*L.), выращенного при концентрации 0,5 мг/л наноструктурных частиц. Однако, в растениях, выращенных при концентрации 2 мг/л наноструктурных частиц, наблюдалась наименьшая концентрация пероксида водорода (рис. 1).

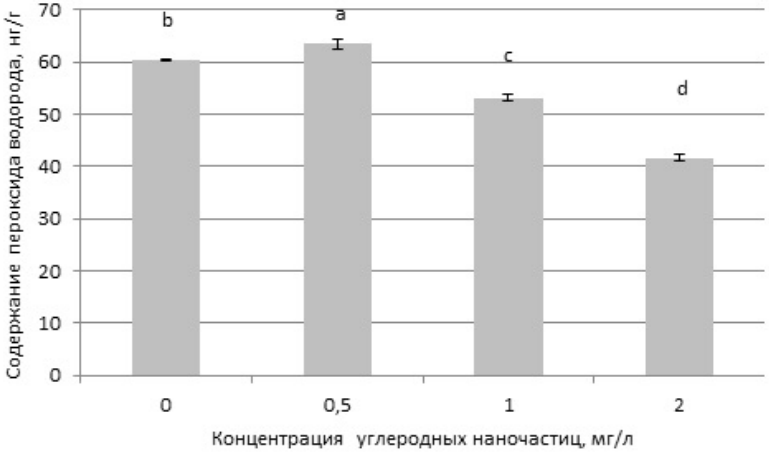


Рисунок. Влияние различных концентраций углеродных наночастиц на содержание пероксида водорода в листьях растения фикус бенжамин (Ficus benjamina L.) на 2-й день обработки (различными буквами на рисунке обозначены достоверно различимые значения при $f=12$, $p<0.05$).

На уровень пероксида водорода в растениях также оказывало влияние время воздействия углеродными нанотрубками. Так, содержание пероксида водорода в листьях растения фикуса бенджамина (*Ficus benjamina* L.) достоверно снижалось с увеличением периода обработки на 36,5% в контрольных растениях и на 37,7% при концентрации наноструктурных частиц 0,5 мг/л.

Таким образом, в работе показан поиск путей увеличения продуктивности растений за счет использования негенетических методов. Вовлечение в обмен веществ наноструктурных частиц, и в част-

ности разных концентраций многослойных углеродных нанотрубок, является эффективным способом модулирования окислительного стресса в растениях и позволяет снижать содержание активных форм кислорода, особенно при аккумулировании наночастиц растениям во времени. Данный эффект может быть связан с изменением в окислительно-восстановительном балансе клетке, приводящий к увеличению количества антиоксидантов.

1. Wang P., Lombi E., Zhao F.-J., Kopittke P.M. Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences // Trends in Plant Science. 2016. Vol. 21. N. 8. P. 699–712.

2. Giraldo, J. P., Landry, M. P., Faltermeier, S. M., McNicholas, T. P., Iverson, N. M., Boghossian, A. A., Reuel. N.F., Hilmer A.J., Sen F., Brew J.A., Strano, M.S. Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing // Nature materials. 2014. Vol. 13. N. 4. P. 400-408.

3. Mastronardi E., Tsae P., Zhang X., Monreal C., DeRosa M.C. Strategic role of nanotechnology in fertilizers: potential and limitations // Nanotechnologies in Food and Agriculture. – Springer International Publishing, 2015. P. 25-67.

4. DeRosa M.C., Monreal C., Schnitzer M., Walsh R., Sultan Y. Nanotechnology in fertilizers // Nature nanotechnology. 2010. Vol. 5. N. 2. P. 91-91.

5. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: учебно-методическое пособие / Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А., Акулов А.Н.,Костюкова Ю.А., Никонорова Н.А., Румянцева Н.И. – Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет, 2011. 61 с.

УЧАСТИЕ РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ РАЗВИТИИ СЕПТОРИОЗА

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

ФБГУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия; e-mail: guzel_mur@mail.ru

Активные формы кислорода (АФК), в том числе перекись водорода, принимают непосредственное участие в формировании и реализации ответных защитных реакций растения при инфицировании патогенами. АФК как сигнальная молекула активирует транскрипционные процессы в клетках растений, в том числе регулирует экспрессию генов, кодирующих транскрипционные факторы, и генов патоген-индуцируемых защитных белков (PR-белки) [1]. Сигнальными молекулами, механизм защитного действия которых связан с индукцией генерации АФК в растительных тканях, также являются салициловая (СК) и жасмоновая (ЖК) кислоты. СК и ЖК влияют на устойчивость к биотрофам и определяют развитие устойчивости к некротрофам соответственно.

Цель данной работы заключалась в выявлении взаимосвязи между экспрессией генов ТФ и PR-защитных белков, динамикой внутриклеточного содержания перекиси водорода и редокс-статусом клеток растений пшеницы, различающихся по устойчивости к септориозу.

Объектом исследования служили семисуточные проростки растений пшеницы восприимчивого сорта Казахстанская 10 (Каз10) и устойчивого – Омская 35 (Ом35). Предпосевная обработка пшеницы сигнальными молекулами проводилась при замачивании семян в растворах 10^{-5} М СК или 10^{-7} М ЖК. Инфицирование растений пшеницы проводили путем нанесения спор гриба на отрезки листьев. Содержание перекиси водорода, активность ферментов пероксидазы и каталазы, концентрацию белка, а также уровень транскриптов генов определяли, как описано ранее [2].

Показано, что при инфицировании устойчивого сорта растений пшеницы содержание перекиси водорода значительно возрастало. В восприимчивом сорте данный эффект наблюдался только при обработке сигнальными молекулами, в большей степени – под влиянием СК.

Установлено, что развитие СВЧ реакции в растениях прежде всего достигается за счет эффективной работы антиоксидантной системы. Так в устойчивом сорте Ом35 активность пероксидазы значительно повышалась, а активность каталазы - снижалась. В восприимчивом сорте активность пероксидазы практически не менялась, а активность каталазы, напротив, – возрастала. Обработка СК как устойчивого, так и восприимчивого сортов приводила к активации фер-

мента пероксидазы и снижению каталазной активности на протяжении первых суток инфицирования. Обработка ЖК индуцировала те же процессы, но на более поздних сроках инфицирования. Таким образом, СК индуцирует устойчивость в биотрофную фазу, а ЖК – во время некротрофной фазы развития *Septoria nodorum* в тканях растений.

Известно, что, образующиеся в результате окислительного взрыва, АФК могут выступать в качестве сигнальных молекул и выполнять функцию вторичного посредника гормональных защитных путей [1,3], активировать факторы регуляции транскрипции, что в итоге приводит к экспрессии защитных генов и синтезу PR-белков. Согласно литературным данным ТФ *TaWRKY13*, а также гены защитных белков *TaPR-1, TaPR-2* и *TaPR-9* являются маркерами СК-опосредованной устойчивости [4]. В нашей работе через 6 часов после инфицирования в растениях устойчивого сорта наблюдалась индукция экспрессии ТФ СК-зависимого пути *TaWRKY13*, что могло привести к более интенсивному накоплению транскриптов генов *TaPR-1*, *TaPR-2* и *TaPR-9* по сравнению с восприимчивым сортом (табл.). В то же время, при инфицировании растений устойчивого сорта наблюдалось повышение, а в восприимчивом сорте - снижение экспрессии генов ТФ, регулирующих этиленовый и ЖК сигнальные пути (*TaERF3* и *TaMYC2*). Что объясняет накопление мРНК генов *TaPR-3* и *TaPR-9* через 24 часа после инфицирования в большей степени в растениях устойчивого сорта по сравнению с восприимчивым сортом.

Для определения вклада каждого сигнального пути в формирование устойчивости растений семена пшеницы были обработаны сигнальными молекулами СК и ЖК. Показано, что обработка СК подавляла экспрессию *TaWRKY45* в растениях восприимчивого сорта, но при этом активировалась экспрессиия *TaWRKY13*. Известно, что ТФ *WRKY13* проявлял антагонистический эффект по отношению к *WRKY45* в процессе формирования устойчивости риса к патогену *M.oryzae* [4]. В то же время СК повышала накопление мРНК ТФ *TaMYC2* и *TaERF3* у восприимчивых растений. Ранее было показано, что ТФ *TaERF3* принимает участие в развитии СК-зависимой устойчивости пшеницы на ранней стадии инфицирования *B.graminis* [5]. Вероятно, ТФ *TaWRKY13* и *TaERF3* в дальнейшем могли индуциро-

вать экспрессию СК-чувствительных генов *PR-1, PR-2* и *PR-9,* а ТФ *TaMYC2* – ЖК-чувствительного *TaPR-3*.

Таблица

Транскрипционная активность генов в растениях пшеницы, инфицированных Septoria nodorum (S.n.), и под влиянием СК и ЖК

	Казахстанская 10			Омская 35		
	к	S.n.	СК S.n.	ЖК S.n.	к	S.n.
6 ч после инфицирования						
TaERF3	100	30	115	71	0	410
TaMYC2	100	36	154	129	0	405
TaWRKY13	100	58	71	111	0	390
TaWRKY45	100	411	94	220	0	440
24 ч после инфицирования						
TaPR-1	100	136	316	119	100	330
TaPR-2	100	129	351	104	100	255
TaPR-3	100	106	280	263	100	150
TaPR-9	100	140	406	672	100	366

Обработка ЖК через 6 часов после инфицирования повышала экспрессию ТФ *TaMYC2*, маркера ЖК-сигнального пути, в восприимчивом сорте пшеницы, и через 24 часа – *TaPR-3* и *TaPR-9* защитных белков, что приводило к снижению площади поражения листьев септориозом и формированию устойчивости растений, но в меньшей мере по сравнению с восприимчивыми растениями, обработанными СК.

Таким образом, показано, что при инфицировании *Septoria nodorum* во время биотрофной фазы его развития в устойчивом сорте пшеницы, а также в восприимчивом сорте, обработанном СК, наблюдается резкое повышение перекиси водорода, что обусловлено активацией пероксидазы и деактивацией каталазы, и сопровождается экспрессией ТФ и PR-белков СК-зависимого сигнального пути. Данные результаты подтверждают, что изученные ТФ вовлечены в регуляцию процессов устойчивости растений пшеницы в ответной реакции на инфицирование возбудителем септориоза.

1. Kazan K., Lyons R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors // Plant Cell. 2014. V. 26. P. 2285–2309.

2. Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В. Роль этилена и цитокининов в развитии защитных реакций в растениях *Triticum aestivum*, инфицированных *Septoria nodorum* // Физиология растений. 2016. Т. 63. № 5.С. 649–660.

3. Barna B., Fodor J., Harrach B.D., Pogany M., Kiraly Z. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens // Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 59. P. 37–43.

4. Cheng H., Liu H., Deng Y., Xiao J., Li X., Wang S. The WRKY45-2 WRKY13 WRKY42 transcriptional regulatory cascade is required for rice resistance to fungal pathogen // Plant Physiol. 2015. V. 3. P. 1087-1099.

5. Zhang Z., Yao WL, Dong N., Liang HX, Liu HX., Huang R. A novel ERF transcription activator in wheat and its induction kinetics after pathogen and hormone treatments // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 2993-3003.

ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТОРА ТОХ3 ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА *Septiria nodorum* НА ПРО-/АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

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

ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия. e-mail: veselova75@rambler.ru

Проблема устойчивости растений к фитопатогенам - одна из наиболее важных в физиологии растений. Возбудитель септориоза пшеницы *Septoria nodorum* Berk. наносит значительный ущерб растениям и приводит к потерям урожая, которые могут достигать 30%. Исследования септориоза интенсивно ведутся последние 2 десятилетия, но до сих пор нет четкого понимания механизмов, лежащих в основе устойчивости/восприимчивости пшеницы к инфекции, с одной стороны, и вирулентности патогена, с другой стороны [1, 2, 3]. Основной трудностью в раскрытии механизмов устойчивости/восприимчивости является комплексность заболевания. Однако в 2006г. было показано, что важнейшим фактором вирулентности *S.*

nodorum являются многочисленные некротрофные эффекторы (НЭ) гриба [1].

Эффекторы патогенов вносят большой вклад в развитие взаимоотношений паразит-хозяин. Эти эффекторы напрямую или косвенно взаимодействуют с продуктами генов устойчивости/восприимчивости, локализованных в геноме пшеницы [1, 3, 4]. НЭ определяются как токсины, специфические для хозяев (host-specific toxins (HST)), или патотоксины [5]. Среди НЭ встречаются поликетиды (PKS), нерибосомальные пептиды (NRPS), низкомолекулярные вещества, а также белки, как у *S. nodorum* и *Botritis cinerea* [5]. На сегодняшний день в геноме *S. nodorum* идентифицировано 4 гена эффектора (*SnToxA, SnTox1, SnTox2, SnTox3*) [2]. Эффекторы SnToxA, SnTox1, SnTox3 считаются основными у патогена *S. nodorum* и достаточно широко распространены среди штаммов и изолятов [6].

Известно, что одной из наиболее ранних ответных реакций растений на внедрение патогена является локальная генерация активных форм кислорода (АФК) – окислительный «взрыв», которая играет важную роль в развитии системной устойчивости и контролируется ферментами про-/антиоксидантной системы и фитогормонами [7]. Кроме того, H_2O_2 считается вторичным посредником в сигнальных системах и активирует факторы регуляции транскрипции, что приводит к экспрессии защитных генов и синтезу патоген-индуцируемых белков (PR-белков, от pathogenesis related) [8].

Показано, что патотоксины SnToxA, SnTox1, SnTox3 влияют на генерацию АФК в растениях пшеницы [3, 4, 6]. По данным литературы SnToxA участвует в образовании хлорозов и некрозов через влияние на белки ФСI и ФСII [3], SnTox1 – в образовании некрозов, за счет СВЧ-реакции [3, 6], SnTox3 – в образовании некрозов и хлорозов по неизвестному механизму [4].

В данной работе было изучено влияние двух штаммов *S. nodorum* – высокоагрессивного SnБ, содержащего ген, кодирующий эффекторный белок *SnTox3*, и низкоагрессивного Sn4, не содержащего ген *SnTox3* – на экспрессию генов PR-белков, кодирующих ферменты про-/антиоксидантной системы (*TaApx* – анионную пероксидазу, *TaRboh* – НАДФН-оксидазу, *TaSod* – супероксиддисмутазу), содержание перекиси водорода (H_2O_2) и активность пероксидазы (ПО) и каталазы (КАТ) у мягкой яровой пшеницы двух контрастных по ус-

тойчивости сортов – Экада 113 (Э113) (восприимчивый сорт), Омская 35 (Ом35) (устойчивый сорт). Кроме того, для ингибирования действия эффектора SnTox3 у высокоагрессивного штамма SnБ был применен дитиотритол (DTT) в концентрации 5 mM [9].

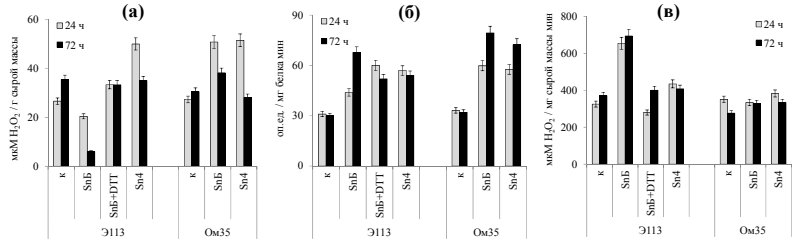


Рисунок. Изменение содержания H_2O_2 (а), активности пероксидазы (б) и каталазы (в) в растениях пшеницы контрастных по устойчивости сортов, инфицированных высокоагрессивным штаммом *S. nodorum* (SnБ), без или в сочетании с ингибитором SnTox3 дитиотритолом (DTT), или низкоагрессивным штаммом (Sn4).

Особенностью паразитирования *S. nodorum* – возбудителя септориоза пшеницы, изученного в данной работе, является гемибиотрофный характер питания, т.е. сочетание в своем цикле биотрофной и некротрофной фазы развития. В наших экспериментах с контрастными по устойчивости сортами пшеницы была изучена биотрофная фаза развития патогена, заканчивающаяся примерно ко вторым - третьим суткам паразитирования и начало некротрофной фазы развития. В начальный период инфицирования высокоагрессивным штаммом SnБ, содержащим ген *SnTox3*, восприимчивый сорт Э113 отличала низкая генерация H_2O_2, более медленное повышение активности ПО и усиление каталазной активности (рис.), что, скорее всего, было причиной интенсивного развития патогена в листьях (табл.). Устойчивый сорт Ом35 отличала интенсивная генерация H_2O_2, более быстрая и повышенная активность ПО и снижение активности КАТ (рис.), что приводило к задержке и остановке роста патогена в листьях (табл.). При инфицировании слабоагрессивным штаммом Sn4, не содержащим ген *SnTox3*, или инфицировании высокоагрессивным штаммом SnБ в сочетании с DTT, оба сорта Ом35 и Э113 развивали защитные реакции одинаково, как устойчивый сорт при инфицировании высокоагрессивным штаммом SnБ, что приводило к образованию

минимальных зон поражения на листьях или отсутствию таковых (табл., рис.). Так, известно, что при взаимодействии устойчивых форм растений с биотрофами в зоне поражения повышалась генерация АФК, приводившая к оксидативному стрессу и остановке роста патогена, а у восприимчивых форм растений инфицирование индуцировало активацию ферментов антиоксидантной системы, например, КАТ, что способствовало развитию инфекционного процесса [7].

Таблица

Влияние штаммов S. nodorum с различной агрессивностью на развитие симптомов заболевания (S) и накопление транскриптов генов PR-белков, кодирующих ферменты про-/антиокси-дантной системы, у контрастных по устойчивости сортов пшеницы.

		S, мм^2 *9 сут*	Накопление транскриптов *PR*-генов, % от контроля					
			TaApx		*TaRboh*		*TaSod*	
			24ч	*72ч*	*24ч*	*72ч*	*24ч*	*72ч*
Э113	SnБ	91±6,1	95,5	283	70	160	69	192
	SnБ+ DTT	0	250	186	120	130	120	71
	Sn4	9,6±2,2	320	300	160	150	144	213
Ом35	SnБ	12,4±1,9	365	575	260	100	300	150
	Sn4	1,8±1,5	401	631	160	154	142	100

Источники и способы генерации АФК при патогенезе остаются малоизученными. Однако имеются данные о катализе этого процесса ферментами НАДФН-оксидазой, оксалатоксидазой, СОД и ПО [8]. В нашей работе было показано, что у восприимчивого сорта Э113 через 24 часа инфицирования высокоагрессивным штаммом SnБ, содержащим ген *SnTox3*, на биотрофной стадии развития патогена, было обнаружено уменьшение содержания транскриптов *TaApx*, *TaRboh, TaSod,* генов, кодирующих ферменты, участвующие в генерации АФК (табл.), что совпадало со снижением генерации H_2O_2 у этого сорта (рис.). Напротив, у устойчивого сорта Ом35 в тех же условиях было обнаружено накопление транскриптов всех трех генов (табл.), что совпадало с повышением генерации H_2O_2 у данного сорта (рис.). Через трое суток после инфицирования, в начале некротрофной фазы развития патогена была обнаружена противоположная реакция кон-

трастных сортов. У восприимчивого сорта Э113 содержание мРНК двух генов (*TaRboh, TaSod*) повышалось, что впоследствии могло привести к образованию обширных зон поражения с некрозами, у устойчивого сорта Ом35 содержание мРНК этих генов снижалось (табл.). Такие данные могут объяснить участие SnTox3 в образовании некрозов на листьях пшеницы, способствующих росту *S. nodorum* в некротрофную стадию развития. Интересно, что обработка высокоагрессивного штамма SnБ ингибитором DTT снимала подавляющий эффект эффектора SnTox3 на экспрессию генов *TaApx*, *TaRboh, TaSod* на биотрофной стадии развития и не приводила к увеличению экспрессии этих генов на некротрофной стадии развития (табл.). Также как и инфицирование обоих сортов низкоагрессивным штаммом Sn4, не содержащим ген эффектора *SnTox3*, не подавляло экспрессию данных генов, хотя характер накопления транскриптов у контрастных по устойчивости сортов различался (табл.).

Известно, что SnTox3 это эффектор ранней стадии инфицирования, индуцирующий образование некрозов у восприимчивых форм пшеницы до колонизации тканей, после чего экспрессия *SnTox3* уменьшается и патоген готовится к споруляции [9]. Также недавно было показано, что SnTox3 влияет на процесс фотосинтеза, индуцирует накопление метионина и синтез этилена, активирует фенилпропаноидный метаболизм и экспрессию ряда генов PR-белков у растений уже через 24 часа после инфицирования [4]. На сегодняшний день считается, что основной ролью данного эффектора SnTox3 является индукция гибели клеток хозяина с помощью манипулирования защитными сигнальными путями растения [4]. Однако механизмы, лежащие в основе этого процесса в настоящее время неясны. Наши результаты показывают, что SnTox3 может напрямую или опосредованно влиять на про-/антиоксидантную систему растения, причем это влияние будет зависеть от фазы развития патогена.

1 Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z.H., Meinhardt S., Ling H., Faris J.D., Rasmussen J.B., Solomon P.S., McDonald B.A., Oliver R.P. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer // Nat Genet. 2006. V.38. P. 953–956.

2 Phan H.T.T., Rybak K., Furuki E., Breen S., Solomon P.S., Oliver R.P., Tan K.-C. Differential effector gene expression underpins epistasis in a plant fungal disease // The Plant Journal. 2016. V. 87. P. 343–354.

3 Shi G., Zhang Z.,·Friesen T.L., Bansal U.,·Cloutier S., Wicker T.,·Rasmussen J.B., Faris J.D. Marker development, saturation mapping, and high‑resolution mapping of the Septoria nodorum blotch susceptibility gene Snn3‑B1 in wheat // Mol Genet Genomics. 2016. V. 291. P. 107–119.

4 Winterberg B., Du Fall L.A., Song X.M., Pascovici D., Care N., Molloy M., Ohms S., Solomon P.S. The necrotrophic effector protein SnTox3 re-programs metabolism and elicits a strong defence response in susceptible wheat leaves // BMC Plant. Biol. 2014. 14:215.

5 Vleeshouwers, V.G. Oliver, R.P. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens // Mol. Plant Microbe Interact. 2014. V. 27. P. 196–206.

6 Liu Z.H., Zhang Z.C., Faris J.D., Oliver R.P., Syme R., McDonald M.C., McDonald B.A., Solomon PS., Lu S.W., Shelver W.L., Xu S.S., Friesen T.L. The cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by Stagnospora nodorum triggers susceptibility of wheat lines harboring Snn1 // PLoS Pathog. 2012. 8:e1002467. doi:10.1371/journal.ppat.1002467

7 Barna B., Fodor J., Harrach B.D., Pogány M., Király Z. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens // Plant Physiology and Biochemistry. 2012. V. 59. P. 37-43.

8 Тарчевский, И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука. - 2002. - 294 с.

9 Liu Z., Faris J.D., Oliver R.P. et al. SnTox3 acts in effector triggered susceptibility to induce disease on wheat carrying the Snn3 gene // PLoS Pathog. 2009. 5 (9). e1000581.

РОЛЬ РЕДОКС-ПРОЦЕССОВ И СЕЛЕНА В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *Saussurea orgaadayi*

И.Ф. Головацкая, А.В. Чигинцова, Е.В. Бойко, А.Н. Видершпан, Ю.В. Медведева

ФГАОУВО Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия; e-mail: golovatskaya.irina@mail.ru

Поддержание нормального внутреннего редокс-статуса играет существенную роль в процессе жизнедеятельности растительных клеток. Изменения этого статуса часто является следствием стрессовых воздействий или результатом активности самих клеток, регулирующих клеточные процессы. При определенных условиях превышение скорости продукции активных форм кислорода (АФК) над скоростью их детоксикации может приводить к повреждению и гибели клеток, вызванному окислительным стрессом. Из-за высокой реакционной способности АФК могут повреждать ДНК, белки и липиды, однако в нормальных условиях наличие антиоксидантной защиты позволяет клеткам поддерживать внутриклеточную концентрацию оксидантов на безопасном уровне.

Известно, что селен влияет на устойчивость растительного организма к различным стрессорным факторам, среди которых показаны УФ-радиация, гербициды, гипотермия, старение и засоление [1, 2]. Он служит природным антиоксидантом с широким спектром биологической активности. Меньше сведений о механизме действия селена при регулировании роста клеточной культуры. В связи с этим целью наших исследований было изучение регуляции роста и редокс-процессов клеточной культуры *Saussurea orgaadayi in vitro* селенитом натрия.

Объектом исследования служили клеточные культуры, полученные из семядолей и гипокотилей многолетнего растения горькуши оргаадай сем. Asteracea – *Saussurea orgaadayi* (V.Khan. and Krasnob.) на кафедре физиологии растений и биотехнологии под руководством профессора Р.А. Карначук. *S. orgaadayi* – узколокальный эндемик Русского Алтая, Юго-Западной Тывы и территорий Монголии. Ранее показано, что в данной культуре присутствуют сесквитерпены, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, тритерпеновые сапонины. Широкий спектр вторичных метаболитов обеспечивает важное фармакологическое значение данного вида. В процессе эксперимента субкультивирование клеток проводили на агаризованной среде Мурасиге и Скуга, содержащей 1 мкМ селенита натрия (Se; “Sigma”, США) и без него (контроль). Прирост каллусной культуры клеток определяли по изменению массы сырого и сухого вещества, рассчитывали ростовой индекс. Содержание пролина и интенсивность перекисного окисления липидов (по малоновому диальдегиду – МДА) определяли

спектрофотометрически по методикам [3, 4] в расчете на сырую массу культуры клеток.

В результате исследований отметили, что каллусная культура, полученная из экспланта гипокотиля, характеризовалась более активным ростом, чем культура, полученная из экспланта семядоли. На 20-е сут она набирала массу в 2 раза большую и заметно снижала прирост к 25 сут. У быстрорастущей культуры гипокотиля отмечалось 35%-ное повышение интенсивности перекисного окисления (ПОЛ) и 4-кратное увеличение содержания пролина по сравнению с культурой семядоли. Не пропорциональные изменения уровня пролина и интенсивности ПОЛ могут свидетельствовать не только об антиоксидантной, но и осмотической функции пролина в процессе роста культуры. Другими авторами показана динамика метаболизма пролина, участвующего в регуляции жизнедеятельности растений в условиях дефицита воды. Изменение накопления пролина и его обмена может использоваться для буферизации клеточного окислительно-восстановительного статуса во время засухи, а также для поддержания роста при дефиците воды. Мутанты по Δ1-пирролин-5-карбоксилат-синтетазе1 (P5CS1) и пролиндегидрогеназе1 (PDH1), ключевым ферментам синтеза и катаболизма пролина соответственно, одинаково снижают рост при высыхании почвы [5]. Эти же ферменты могут играть важную роль в регуляции уровня пролина при интенсивном росте клеток каллусной ткани, обеспечивая водный обмен между клетками и агаризованной средой.

Введение селенита натрия высокой концентрации увеличивало прирост культуры на начальных этапах культивирования, но к 15 сут рост замедлялся, вероятно, из-за накопления элемента. Повторная активация роста семядольной культуры к 20–25 суткам сопровождалась 2-кратным увеличением пролина и незначительным повышением интенсивности ПОЛ. Другая картина наблюдалась у гипокотильной культуры. Не смотря на ее отставание в росте от контрольной, каллус к 25 суткам сохранял высокий уровень пролина, который удерживал интенсивность ПОЛ на контрольном уровне.

Таким образом, в результате исследований показано влияние типа экспланта и экзогенного селенит-иона на рост клеточных культур и их окислительный гомеостаз.

1. Блинохватов А.Ф., Вихрева В.А., Денисова Г.В. и др. Селен в биосфере. – Пенза: РИО ПГСХА, 2001. 324 с.

2. Yao X.Q., Chu J.Z., Ba C.J. Antioxidant responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B // Biol. Trace Elem. Res. 2010. V. 136. P. 96–105.

3. Bates L.E. Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. 1973. Vol. 39. P. 205–207.

4. Кузнецов В.В., Ралдугина Г.Н., Кузнецов В.В. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 348 с.

5. Bhaskara G.B., Yang T.-H., Verslues P.E. Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water limited environments // Front. Plant Sci. 2015. V. 6: 484. doi: 10.3389/fpls.2015.00484.

ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА КАК МОДЕЛЬ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ ХЛОПЧАТНИКА К ХЛОРИДНОМУ ЗАСОЛЕНИЮ

З. Голубенко, А.А. Ахунов, К.М. Кулдошева, С.Б. Наврузов, Г.А. Акбарова

Институт биоорганической химии им. акад. А. С. Садикова АНРУз, г.Ташкент, Узбекистан; e-mail: zamira.golubenko@yandex.ru

Антиоксидантный статус растений определяется сбалансированностью между прооксидантными и антиоксидантными реакциями протекающими в клетке. Исследование особенностей функционирования антиоксидантной системы важно для понимания того, как растение адаптируется к измененным условиям среды, вызванного стрессовыми факторами. При воздействии хлорида натрия на растение повышается продукция активных форм кислорода, которая интенсифицирует перекисное окисление липидов, и приводит к значительным нарушениям внутриклеточного гомеостаза. Ограничение процессов пероксидации и поддержание структурно-функционального состояния мембранных липидов осуществляется за счет работы антиоксидантной системы защиты, ключевую роль в ко-

торой играют специализированные ферменты [1-4].

Целью данного исследования было выявить роль антиоксидантного статуса в сортах хлопчатника, отличающихся по устойчивости к засолению. При реализации данной цели проведены исследования сравнительной оценки антиоксидантного статуса двух сортов хлопчатника, отличающихся по устойчивости к хлоридному засолению в модельных системах. Изучена значимость некоторых компонентов системы антиоксидантной защиты при формировании устойчивости хлопчатника к солевому стрессу.

Для этого семена хлопчатника сорта Гулистан (солеустойчивый) и С-4727 (неустойчивый) проращивали в пресной воде, и по истечении 6 – суток образцы подвергали воздействию солевого стресса, путем экспозиции их в растворе 1% и 4 % хлорида натрия в течение 1 часа, а затем в течение 24 часов, с последующим определением в семядольных листьях содержания МДА, СОД и АПО. Интенсивность образования малонового диальдегида (МДА) – конечного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) – является интегральным маркером уровня окислительного стресса в растительной клетке. Увеличение количества МДА в клетках при стрессе свидетельствует о деструкции липидных компонентов биомембран, в результате окислительного стресса и о более слабой устойчивости растений к абиотическим факторам.

Результаты исследования модельных экспериментов воздействия засоления (1% и 4% NaCl) показали, что через 1 час у устойчивого сорта Гулистан при засолении (1%) раствором отмечено уменьшение содержание МДА, по сравнению с контролем; у восприимчивого С-4727 количество МДА существенно повысилось (таблица 1). Через 24 часа действия стресс-фактора, содержание МДА у сорта Гулистан не значительно изменилось, в то время как у С-4727 было высоким. При засолении 4% NaCl у них наблюдалась идентичная картина, но показатели были выше.

Полученные данные свидетельствуют о том, что сорт хлопчатника Гулистан более устойчив к солевому стрессу, по сравнению с С-4727. Возможно, в семядольных листьях проростков хлопчатника, сорта Гулистан, при воздействии хлорида натрия не происходило накопления продуктов перекисного окисления липидов и содержание МДА поддерживалось на уровне контроля, и даже ниже, за счет уси-

ления активности антиоксидантных ферментов.

В условиях засоления (1% NaCl), в листьях проростков, исследованных сортов хлопчатника, в первые часы действия стресса, происходило повышение активности супероксиддисмутазы (СОД). У сорта Гулистан СОД вносила более значительный вклад в защитный ответ, чем у С-4727. Такая динамика может свидетельствовать о более эффективном участии в защитном ответе на стадии стресс-реакции, за счет высокой способности удалять O_2 радикал, у сорта С-4727 засоление вызывало лишь незначительное повышение содержания СОД. Индуцированная засолением активность СОД, через 24 часа была выражена ярче у сорта Гулистан, чем у сорта С-4727. При концентрации NaCl 4% у сорта Гулистан активность СОД возрастала на 110%, тогда как у сорта С-4727 составляла 23,8%. Поскольку в реакции, катализируемой СОД, повышается концентрация H_2O_2, эффективным механизмом детоксикации пероксида водорода считается повышение активности АПО. Высокий конститутивный уровень аскарбатпероксидазы (АПО), как видно из таблицы, было отмечено у сорта хлопчатника Гулистан. При солевом стрессе, значительно активизируется АПО, у обоих сортов достигая максимального значения к одному часу (таблица), тогда как значение активности СОД возрастала при 24 часовой экспозиции, при этом у устойчивого сорта хлопчатника это значение намного выше, чем у сортаС-4727. Активность изучаемых ферментов повышалась с увеличением степени засоления.

На примере двух сортов хлопчатника выявлена корреляция между устойчивостью к стрессам и уровнем активности антиокислительных систем. Таким образом, наши исследования показали наличие существенных различий в ответе на солевой стресс чувствительного и устойчивого сортов хлопчатника. Различия в ответной реакции на засоление тесно связаны с отличиями в активности ферментов антиоксидантной системы и содержанием малонового диальдегида. Устойчивость сортов хлопчатника к засолению связана с высокой эффективностью работы ферментативной системы по обезвреживанию АФК, что повышает окислительно-восстановительный гомеостаз и сохранность компонентов клетки.

Эти результаты позволят в будущем решать многие биотехнологические вопросы, касающиеся увеличения урожайности хлопчатника путем создания сортов, с повышенным антиоксидантным стату-

сом, что существенно повысит их устойчивость к засолению и сократит потери урожая.

Таблица

Влияние различных концентраций NaCl на содержание МДА и активность антиоксидантных ферментов (СОД, АПО) в сортах хлопчатника (n=3;M±m)

Образец	Гулистан		С-4727	
	1 Час	24 Час	1 Час	24 Час
Содержание МДА в (10^{-7}) мМоль/г сух. веса				
Контроль	24,56±2,1	22,06±1,8	26,03±2,0	25,36±3,7
NaCl 1%	24,05±1,8	22,3±2,5	46,5±3,2	44,07±1,4
NaCl 4%	24,52±1,0	22,4±0,7	57,59±1,8	47,53±2,5
СОД ед.акт/мг белка				
Контроль	3,5±2,0	4,0±2,1	2,5±1,8	2,1±1,8
NaCl 1%	4,6±1,5	6,8±1,8	2,8±2,4	2,3±1,0
NaCl 4%	6,3±0,9	8,4±2,0	4,3±3,0	2,6±0,9
АПО ед.акт/мг белка				
Контроль	27,50±1,4	26,30±2,0	19,78±1,8	20,60±0,4
NaCl 1%	34,70±1,0	26,83±1,9	21,04±1,4	20,91±2,3
NaCl 4%	40,23±0,5	29,07±4,1	23,05±3,5	22,03±1,4

1. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисного окисление липидов. Успехи современной биологии 1991, 111(6); 923-93

2. Ahmad P., Jaleel C.A., Salem M.A., Nabi G., Sharma S. (2010) Roles of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. Crit. Rev. Biotechnol., 30, 161–175

3. Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Сер. Биология. - 2007. - Вып. 3(12). - С. 6-26

4. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends in Plant Sci. 2002. V. 7. № 3. P. 405–410.

5-АМИНОУРАЦИЛ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ В РЕАКЦИИ С ПЕРОКСИЛЬНЫМИ РАДИКАЛАМИ

С.А. Грабовский, Н.М. Андрияшина, Ю.С. Грабовская, А.В. Антипин, Н.Н. Кабальнова

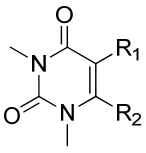
ФГБУН Уфимский Институт химии Российской академии наук, г. Уфа, Россия; e-mail: stas_g@anrb.ru

Известно, что в тканях растений достаточно высокая концентрация молекулярного кислорода. Так концентрация кислорода в митохондриях млекопитающих достигает 0.1 мкМ, в то время как в митохондриях растительных клеток – более 250 мкМ. При этом, примерно 1% поглощаемого растениями кислорода преобразуется в его активные формы [1]. С другой стороны 5-аминоурацил способствует митотической синхронизации в растительном материале. Было показано, что синхронность делений клеток под действием 5-аминоурацила обусловлена снижением скорости синтеза ДНК, что приводит к накоплению клеток в S-фазе клеточного цикла. Обработка растений 5-аминоурацилом также может вызвать задержку скорости выхода клеток из G-периода, но не влияет на его продолжительность [2]. Ранее нами показано, что 5-аминоурацил является эффективной ловушкой пероксильных радикалов [3].

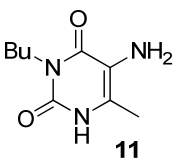
В данной работе изучены закономерности взаимодействия 5-аминоурацила и его производных с пероксильными радикалами и обнаружено влияние заместителей на антиоксидантные свойства.

Мы синтезировали ряд N-алкилированных производных урацила растворимых в неполярных и изучили их антиоксидантные свойства, используя надежный метод инициированного окисления стирола в хлорбензоле при 37 °С. Метод SMD-M05/MG3S использовали для предсказания реакционной способности изученных соединений по отношению к пероксильным радикалам.

Структуры исследованных соединений приведены на схеме:



No.	R_1	R_2	No.	R_1	R_2
1	OH	H	**6**	H	H
2	OH	CH_3	**7**	H	CH_3
3	OH	Ph	**8**	H	Ph
4	NH_2	H	**9**	NH_2	Et
5	NH_2	CH_3	**10**	NH_2	i-Pr



11

Показано, что соединения 1-5, 9-11 уменьшают скорость расходования кислорода. Индукционный период линейно возрастает с увеличением концентрации производных урацила. После его завершения скорость окисления равна скорости окисления стирола без добавок ингибитора. Константы скорости ингибирования не превышают значения $1 \cdot 10^5$ $M^{-1} \cdot c^{-1}$. Введение электронодонорного заместителя в 6-положение увеличивает константу скорости реакции.

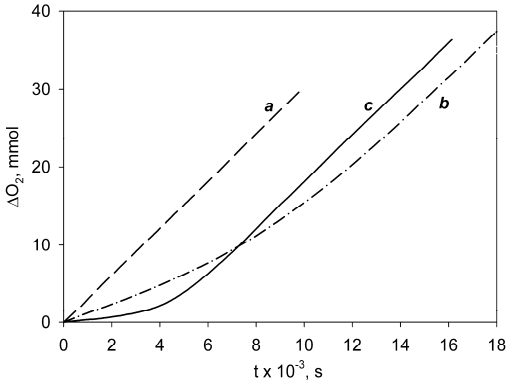


Рисунок. Расходование молекулярного кислорода при окислительной полимеризации стирола (1.7 М) в хлорбензоле инициируемое АИБН (35 mM) при 37.0 °С без ингибитора (a), в присутствии 1 (b) и 5 (c) при концентрации 10^{-4} М.

Обычно реакционную способность антиоксидантов связывают с величиной энергией диссоциации связи (BDE) или потенциалом ионизации (IP). В случае изученных производных урацилов нет удовлетворительной корреляции между константой скорости и BDE или IP, в то время как, энтальпия переходного состояния, рассчитанная на уровне теории SMD-M05/MG3S, хорошо согласуется с полученными экспериментально константами ингибирования.

Образующиеся радикалы ингибитора в реакции с кислородом способны генерировать $O_2^{-\bullet}/HO_2^{\bullet}$ радикалы, которые могут участвовать в дальнейшем процессе окисления. Способность к генерации зависит от заместителя в 6-положениии урацильного кольца.

Таким образом, изученные производные урацила, в неполярном растворителе, характеризуются как ингибиторы средней реакционной способности. Алкильная группа в 6-положении урацила увеличивает константу скорости взаимодействия с пероксильными радикалами и стехиометрический коэффициент ингибирования. При моделирования реакционной способности изученных производных урацила не-

обходимо учитывать влияние растворителя для получения результатов сопоставимых с экспериментальными.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00141).

1. Гарифзянов А.Р., Жуков Н.Н., Иванищев В.В. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений // Современные проблемы науки и образования. 2011. № 2.

2. Prensky W., Smith H.H. The mechanism of 5-aminouracil–induced synchrony of cell division in *Vicia Faba* room meristems. // The Journal of Cell Biology 1965. Vol. 24. P, 401–414.

3. Grabovskiy S.A., Konkina I.G., Murinov Yu.I. Kabal'nova N.N. 5-Aminouracil as Effective Inhibitor of Peroxyl Radicals. Experimental and Theoretical Studies**.** // Current Organic Chemistry. 2012. Vol. 16. No. 11. P 1447-1452.

РЕГУЛЯЦИЯ ФИТОГОРМОНАМИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА КИСЛОРОДА И CO_2-СРЕДЫ

А.Н. Ершова, О.С. Бердникова

ФГБОУ ВО Воронежский государственный педагогический университет, г. Воронеж, Россия; e-mail: aershova@vspu.ac.ru

Регуляторы роста оказывают разностороннее влияние на растения. Фитогормоны участвуют в процессах адаптации растений к различным неблагоприятным факторам внешней среды [4]. В работах [5] отмечено, что в условиях гипоксического стресса в клетках растений наблюдалось увеличение скорости процессов пероксидации липидов за счет активации неферментативных свободнорадикальных процессов. Было показано, что высокие концентрации CO_2 в большей степени, чем условия обычной гипоксии, оказывали влияние на изменение скорости свободнорадикального окисления [2]. При этом кинетин и эпибрассинолид (ЭБ) стабилизировали содержание и жирнокислотный состав фосфолипидов мембран, что могло повышать устойчивость растений к воздействию гипоксии [1]. Однако влияние фито-

гормонов на процессы свободнорадикального окисления в митохондриях растений изучено недостаточно. В опытах исследовали влияние условий кратковременной (3-24 ч) гипоксии и CO_2 – среды на процессы свободнорадикального окисления в митохондриях растений кукурузы, предварительно обработанных фитогормонами.

Объектом исследования служили 10-дневные проростки кукурузы сорта «Воронежская 76», выращенные методом гидропоники. Кинетин (0,04 мМ) и ЭБ (0,02 мМ) вводили в надземную часть проростков методом насасывания с транспирационным током (12 ч) в темновых условиях, после чего растения переносили в условия разных газовых сред [2]. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования и их чистоту оценивали по активности маркерного фермента сукцинатдегидрогеназе и содержанию хлорофилла. Интенсивность свободнорадикального окисления в митохондриях определяли методом хемилюминесценции, содержание супероксидного анион-радикала и пероксида водорода спектрофотометрическими методами [3].

Было показано, что интенсивность процессов свободнорадикального окисления в митохондриях проростков в условиях гипоксии значительно возрастала, но только в начале опыта и (в 1,9 раз), а к концу опыта она снижалась. При действии CO_2 – среды существенного изменения показателей свободнорадикального окисления в митохондриях не наблюдалось. К 6 часам гипоксического стресса показатели скорости свободнорадикальных процессов снижались на 15-34%, а к концу опыта они была ниже уровня аэрируемых растений.

Обработка растений кинетином снижала интенсивность процессов свободнорадикального окисления во все сроки действия газовых сред, особенно в первые часы опытов. Кинетин снизил показатели хемилюминесценции в митохондриях растений в условиях гипоксии в два раза, при действии CO_2 – среды на 15%. Предобработка проростков эпибрассинолидом в большей степени снижала скорость процессов свободнорадикального окисления в митохондриях. При 3-х часовом действии гипоксии в 2,9 раз, в условиях CO_2 – среды на 20%.

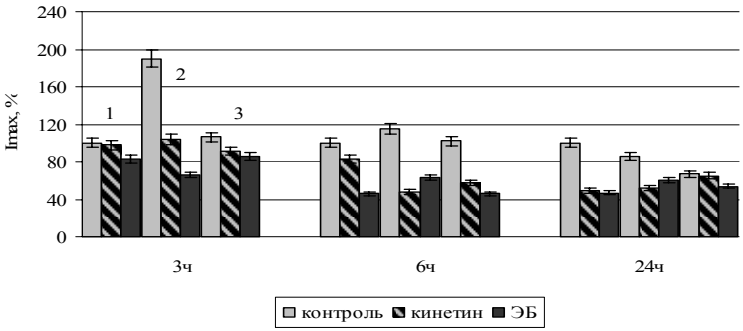


Рисунок. Влияние кинетина и эпибрассинолида на интенсивность процессов свободнорадикального окисления в митохондриях проростков кукурузы при действии гипоксии и CO_2 – среды (1 – воздух контроль, 2 – гипоксия, 3 – CO_2-среда).

В присутствии фитогормонов отмечалось снижение содержания супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в митохондриях проростков в условиях разных газовых сред только в последние часы опыта. Под действием кинетина продукция супероксида и пероксида водорода снижалась к 24 часам опыта в 1,5-2 раза во всех газовых средах. Предобработка ЭБ снижала содержание супероксида и пероксида водорода в митохондриях проростков концу опыта только в условиях CO_2 – среды практически в два раза.

Таблица

Влияние кинетина и эпибрассинолида на содержание пероксида водорода в митохондриях проростков кукурузы в условиях гипоксии и CO_2 – среды при разных экспозициях (% от контроля)

вариант	контроль	кинетин	эпибрассинолид
6 часов			
воздух	100	132	96
гипоксия	46	64	93
CO_2 - среда	33	60	85
24 часа			
воздух	100	100	293
гипоксия	319	176	273
CO_2 - среда	280	156	157

Таким образом, в результате проведенных опытов было показано, что в митохондриях проростков кукурузы интенсивность процессов свободнорадикального окисления возрастала в первые часы гипоксического стресса, а к концу опыта снижалась. В тоже время накопление пероксида водорода, одной из самых стабильных форм АФК, отмечалось в митохондриях проростков лишь к концу опыта. Предобработка растений фитогормонами кинетином и эпибрассинолидом стабилизировала интенсивность процессов свободнорадикального окисления во все периоды воздействия гипоксического стресса, а накопление пероксида водорода только через 24 часа опыта.

1. Ершова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода. Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2007. 264 с.

2. Ершова А.Н., Попова Н.В., Бердникова О.С. Продукция активных форм кислорода и антиоксидантные ферменты растений гороха и сои при действии гипоксии и CO_2 – среды // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 6. С. 834-843.

3. Ершова А.Н., Бердникова О.С. Роль ферментов СОД и липоксигеназы в процессах накопления АФК в клетках растений в условиях кратковременной гипоксии и CO_2 – среды // Вестник ВГУ, серия Химия. Биология. Фармация. 2013. № 1. С. 132-136.

4. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.

5. Crawford R.M. Seasonal differences in plant responses to flooding and anoxia // Can. J. Bot. 2003. V. 81. № 2. P. 1224–1246.

АНТИОКСИДАНТЫ В КАЧЕСТВЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ

И.В. Жигачева, Т.А. Мишарина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, г. Москва, Россия; e-mail: zhigacheva@mail.ru

Растения находятся в постоянно меняющихся условиях внешней среды, подвергаясь действию различных стрессовых факторов. При этом сильные стрессовые воздействия или длительное действие стрессового фактора приводят к смещению антиоксидантно/проксидантного равновесия в сторону увеличения содержания активных форм кислорода (АФК) в клетке, что лежит в основе нарушения физиологических функций растительных организмов (снижения ростовых процессов, урожайности и т.д.). Одними из основных источников АФК в условиях стресса являются митохондрии и хлоропласты [1, 2]. В своей работе мы обратили внимание, главным образом, на митохондрии, так как эти органеллы, как у растений, так и у животных играют одну из основных ролей в ответе организма на действие стрессовых факторов. Взаимодействие АФК с полиненасыщенными жирными кислотами (ЖК), входящими в состав липидов мембран митохондрий, такими как арахидоновая, линолевая и линоленовая, кислоты, приводит к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ). [3]. Пероксидация линолевой кислоты, входящей в состав кардиолипина, имеет следствием снижение содержания этого фосфолипида во внутренней мембране митохондрий [4] и окисление тиоловых групп белков. В результате происходит набухание митохондрий, выход цитохрома С и, возможно, индукция апоптоза [5]. В связи с этим, мы предположили, что антиоксиданты, снижая интенсивность ПОЛ, могут играть роль регуляторов роста и развития растений, предупреждая дисфункцию митохондрий в стрессовых ситуациях.

В качестве объекта исследования были выбраны антиоксиданты, относящиеся к пространственно-затрудненным фенолам: анфен натрия (1-карбокси-1-(N-метиламид)-2-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил пропанат натрия) и фенозан калия (2,6-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил-пропанат калия). Поскольку водный дефицит снижает функциональную активность, как хлоропластов, так и митохондрий [6] протекторную активность препаратов мы исследовали на модели водного дефицита. Проверку протекторных свойств препарата проводили, используя 10^{-6} М амбиол и 10^{-12} М фенозан калия, т.е. в тех концентрациях, в которых эти антиоксиданты снижали интенсивность ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха в модельных экспериментах.

Дефицит воды приводил к 3-кратному увеличению интенсивно-

сти флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха. Отметим, что обработка проростков гороха исследуемыми антиоксидантами приводила к снижению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ до контрольного уровня.

Активация ПОЛ вызывала значительные изменения в содержании C_{18} и C_{20} жирных кислот (ЖК) в мембранах митохондрий. Соотношение суммарного содержания C_{18} ненасыщенных ЖК к содержанию стеариновой кислоты снижалось с 16,61 ± 0,30 до 10,59 ± 0,20, а соотношение 20:1ω7 + 20:1ω9 + 20:2ω6) /$C_{20:0}$ снизилось с 3,65 ± 0,03 до 1,20 ± 0,16.

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий сопровождались 30% снижением максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и 25% снижением эффективности окислительного фосфорилирования. Описанные нарушения биоэнергетических характеристик митохондрий, по-видимому, обусловлены окислением ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав кардиолипина, главным образом, линолевой кислоты, и, следовательно, снижением содержания этого фосфолипида во внутренней мембране митохондрий [7]. Подтверждением этому предположению является 2-кратное снижение скоростей транспорта электронов на цитохромоксидазном участке дыхательной цепи митохондрий проростков гороха, находящихся в условиях дефицита воды. Введение в среду инкубации этих митохондрий, 5×10^{-6}М цитохрома С приводило к восстановлению скоростей окисления пары аскорбат + ТМФД до контрольных значений, что свидетельствует о потере митохондриями части цитохрома С, обусловленной окислением кардиолипина во внутренней мембране этих органелл. Это предположение подтверждается данными, полученными методом атомно-силовой микроскопии (АСМ), которые свидетельствуют о набухании митохондрий [8]. Обработка проростков гороха 2×10^{-12}М фенозаном калия или 10^{-6}М амбиолом предотвращала набухание митохондрий. Антиоксиданты, защищая от перекисного окисления ненасыщенные жирные кислоты, предупреждали изменения в жирнокислотном составе мембран, проростков выращенных в условиях дефицита воды, что отразилось на биоэнергетических характеристиках митохондрий: сохранялись высокие скорости окисления НАД-зависимых субстратов и эффектив-

ность окислительного фосфорилирования. При этом восстанавливались скорости транспорта электронов на конечном участке дыхательной цепи митохондрий. На основании представленных данных, можно предположить, что предотвращение окисления ненасыщенных жирных кислот, в частности C_{18} и C_{20} кислот, в мембранах растительных тканей приводит к повышению устойчивости растений к дефициту воды. Действительно, между коэффициентом ненасыщенности C_{18} жирных кислот в липидах мембран митохондрий ($\sum$ненасыщенные C_{18} жирные кислоты/$C_{18:0}$) и максимальными скоростями окисления NAD-зависимых субстратов наблюдалась корреляция с коэффициентом корреляции r =0,76489.

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий, приводящие к изменениям в энергетическом метаболизме, отразились и на физиологических показателях, а именно, на росте проростков. Водный дефицит резко снижал ростовые процессы. Обработка семян гороха исследуемыми антиоксидантами предупреждала снижение темпа роста корней. Длина корней проростков гороха в условиях водного дефицита почти не отличалась от соответствующих показателей контрольной группы растений.

На основании полученных данных можно предположить, что устойчивость растений к водному стрессу определяется антиоксидантной системой клетки, предотвращающей окисление ненасыщенных жирных кислот, содержащих 18 и 20 углеродных атомов. При этом коэффициент ненасыщенности C_{18} жирных кислот тесно коррелирует с максимальными скоростями окисления НАД-зависимых субстратов. Отметим, что митохондрии прорастающих семян характеризуются относительно низкими скоростями окисления НАД-зависимых субстратов. Увеличение активности НАД-зависимых дегидрогеназ активирует энергетические процессы в клетке, что повышает устойчивость растительного организма к изменяющимся условиям окружающей среды.

1. Тодоров И.Н. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологий, процессе старения и апоптозе. // Рос. хим. Журнал. 2007. Т.51.С. 93-106.

2. Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов Вл.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у рас-

тений // Физиология растений. 2012. Т. 59 (2). С. 163–178.

3. Гривенкова В.Г., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями. Успехи биологической химии. 2013. Т. 53. С. 245–296.

4. Genova M.L., Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes // BBA. 2014. V. 1837(4). P. 427–443.

5. Vladimirov Yu.A., Olenev V.I., Suslova T.V., Cheremisina Z.V. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane // Adv. Lipid Res. 1980. V. 17(1). P. 173–249.

6. Шугаева Н.А., Выскребенцева Э.И., Орехова С.О., Шугаев А.Г. Влияние водного дефицита на дыхание проводящих пучков листового черешка сахарной свеклы // Физиология растений. 2007. Т.54(3). С. 373-380.

7. Paradies G., Petrosillo G., Pistolese M., Venosa N., Federici A., Ruggiero F.M. Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Perfused Rat Heart. Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin // Circulation Research. 2004. V. 94.P. 53-59.

8. Zhigacheva I., Generozova, Shugaev A., Misharina T., Terenina M., Krikunova N. Organophosphorus Plant Growth Regulators Provides High Activity Complex I Mitochondrial Respiratory Chain *Pisum sativum* L. Seedlings in Conditions Insufficient Moisture // Annual Research & Review in Biology. 2015. V. 5(1). P. 85-96.

О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗОГЕННЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КАЧЕСТВЕ РЕДОКС РЕГУЛЯТОРОВ ДЛЯ РАСТЕНИЙ

Н.В. Загоскина, Т.Н. Николаева, Т.Л. Нечаева, П.В. Лапшин, В.В. Казанцева, Е.А. Гончарук

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия; e-mail: biophenol@gmail.com

Фенольные соединения (ФС) относятся к одним из наиболее распространенных в растениях вторичных метаболитов, присутствующих практически во всех их клетках [1]. Они участвуют в самых разнообразных биологических процессах и способны влиять на рост

растений, репродуктивные процессы, а также обеспечивать их устойчивость к стрессовым воздействиям (УФ–радиации, низким температурам и др.) [2]. Их часто называют биоантиоксидантами, благодаря способности взаимодействовать с активными формами кислорода (АФК), тем самым ингибируя процессы перекисного окисления липидов [3]. Антиоксидантная активность характерна как для С6-С3, так и для С6-С3-С6 соединений, соответственно, фенилпропаноидов и флавоноидов.

ФС находят все более широкое применение в различных отраслях народного хозяйства – пищевой, фармацевтической и косметологической промышленности, а также в сельском хозяйстве в качестве регуляторов роста растений. При этом эффект действия полифенолов зависит от их структуры, в том числе наличия и расположения оксигрупп и их заместителей в молекуле, концентрации действующего вещества и способа обработки, а именно воздействие на семена либо листья растений [4]. Несмотря на имеющиеся в литературе данные, до сих пор остается много вопросов о влиянии отдельных их представителей, включая агликон полифенола или его гликозидированную форму, на продуктивность растений, в том числе биосинтез этих представителей вторичного метаболизма.

Одной из ведущих зерновых культур во многих странах мира, в том числе и в России, является пшеница. Изучению ее метаболизма, регуляции продуктивности и устойчивости к различным стрессовым воздействиям уделяется большое внимание [5]. Что же касается образования ФС, то этот аспект изучен в значительно меньшей степени [6]. Показано, что наибольшее накопление этих вторичных метаболитов характерно для листьев растений, по сравнению с узлами кущения и корнями [7]. Это может быть обусловлено функционированием в автотрофных тканях хлоропластов – одного из основных мест биосинтеза фенольных соединений, в том числе флавоноидов [1]. К их числу относятся кверцетин и его гликозид – рутин, образование которых характерно для большинства надземных органов растений. Возможно, что эти вещества могут выполнять функции редокс-регуляторов в клетках растений, что имеет важное значение в силу их «прикрепленного» образа жизни и необходимости «приспосабливаться» к различным условиям окружающей среды.

Все это послужило основанием для изучения действия двух

представителей ФС, относящихся к классу флавонолов, а именно кверцетина (КВ) и рутина (РТ), на начальные этапы онтогенеза растений пшеницы и их антиоксидантную систему (на уровне определения количества МДА и содержания различных классов ФС).

Обработка семян КВ и РТ способствовала более интенсивному росту проростков пшеницы, по сравнению с контролем. В контрольном варианте длина корней и листьев увеличивалась, соответственно в 3 и 12 раз, а при действии ФС - в 3,5-4,3 и 14,4-18 раз (КВ и РТ, соответственно). Это подтверждает рост-регулирующую активность ФС, что отмечалось и другими авторами [4].

Изучение состояния антиоксидантной системы растений после воздействия ФС на семена пшеницы показало, что количество МДА в листьях проростков в варианте с КВ было на 15% ниже, чем в контроле, тогда как в варианте с РТ – превышало его на ту же величину. Следовательно, агликоны флавонолов, по-видимому, способствуют активации антиоксидантной системы защиты растительных клеток (о чем косвенно свидетельствует содержание МДА), в отличие от их гликозидированных форм.

Несколько иная тенденция отмечалась в отношении накопления ФС, в том числе флавоноидов, являющихся основными компонентами фенольного комплекса листьев пшеницы [7]. Их содержание было наиболее высоким у проростков, выросших из семян, обработанных КВ, тогда как в варианте с РТ - ниже. Кроме того, изменялась их доля в суммарном содержании ФС Так, в контрольном варианте она составляла 87%, в варианте с КВ – 94%, а в варианте с РТ - 81%. Следовательно, обработка семян пшеницы флавоноидами в дальнейшем отражалась именно на их накоплении в листьях проростков.

Все вышеизложенное свидетельствует о возможности использования экзогенных ФС, в частности агликонов флавонолов, в качестве редокс-регуляторов, повышающих устойчивость сельскохозяйственных культур.

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: «Наука», 1993. 272с.

2. Lattanzio V., Kroon P.A., Quideau S., Treutte D. Plant phenolics - secondary metabolites with diverse functions // Recent Advances in Polyphenol Research . Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2008. V. 1. P. 1-35.

3. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты.М., 2006. 556 с.

4. Волынец, А.П. Фенольные соединения в жизнедеятельности растений Минск: Изд-во Буларуская навука, 2013. 150 с.

5. Лебедева Т.В. Генетическое разнообразие мягкой пшеницы Triticum aestivum L. по устойчивости к Blumeria graminis DC. f. sp. tritici Golovin // Вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. С. 686-690.

6. Ahmed N., Maekawa M., Noda K. Anthocyanin accumulation and expression pattern of anthocyanin biosynthesis genes in developing wheat coleoptiles // Biologia plantarum. 2009. V. 53. P. 223-228.

7. Загоскина Н. В., Олениченко Н. А., Чжоу Юньвэй, Живухина Е. А. Способность различных сортов пшеницы (*Triticum aestivum L.*) к образованию фенольных соединений // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. С. 113-116.

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ СТУПЕНЬ ПЕНТОЗО-ФОСФАТНОГО ЦИКЛА В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО И МЕДНОГО СТРЕССОВ У РАСТЕНИЙ ВЕЙГЕЛЫ ЦВЕТУЩЕЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

О.А. Землянухина, В.Н. Калаев, В.С. Воронина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»), Воронеж, Россия; e-mail: oz54@mail.ru

Первой реакцией растений на стресс является увеличение концентрации активных форм кислорода, приводящее к снижению активности ферментов, принимающих участие в детоксикации перекисных соединений. Однако влияние стресса абиотической природы сказывается на всех процессах, приводя к изменению клеточного метаболизма в целом. В настоящее время наблюдается увеличение числа засоленных земель, а также увеличение территорий, загрязненных тяжелыми металлами за счет увеличения нагрузки на автомагистрали. Загрязненные человеком парковые и лесопарковые зоны, а также отвальные земли должны быть рекультивированы согласно закону Рос-

сийской Федерации «О недрах». В связи с этим задача получения больших количеств адаптированных к солевому и медному стрессам растений является актуальной. Подобная задача решается с помощью микроклонального размножения растений, позволяющего получать плантационные количества растений сходного генотипа, резистентных к неблагоприятным условиям среды. Особенное значение метод приобретает в случае размножения красивоцветущего кустарника вейгелы цветущей «вариегата», декоративность которого можно сохранить методом культуры ткани.

Целью работы было изучение активности ключевого энзима первого, окислительного, этапа пентозо-фосфатного цикла, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49), поскольку известно, что фермент является индикативным по отношению к неблагоприятным факторам среды [1], а также установление изменений в содержании основного растворимого белка и свободного пролина.

Объектами исследования служили микроклонально размноженные растения вейгелы цветущей «вариегата» (*Weigela florida* «Variegata» Bunge A.D.C.), при адаптации к условиям солевого (NaCl, полулетальная концентрация 130 мМ) и медного стрессов ($CuCl_2$, полулетальная концентрация 0.075 мМ) на протяжении долговременного трехступенчатого эксперимента (120 суток) [2].

Определение белка проводили по методу Брэдфорда (Bradford, 1976).

Определение пролина проводили по (Bates и др., 1973).

Для получения ферментативных препаратов навеску растительной ткани растирали со стеклянным песком в 0.1 М трис-HC1 буфере, pH 7.5 и центрифугировали в эппендорфах на центрифуге CM50 EL-MI (Латвия) при 20000 g, +4°C, в течение 10 мин. Измерение активности и подсчет удельной активности проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции по руководству [3].

Все экспериментальные данные получены в 4-х биологических повторностях, процедура группировки данных и их статистическая обработка изложены в работе Кулаичева (2006).

В ходе реакции, катализируемой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой, происходит восстановление молекулы $NADP^+$ до NADPH. Фермент является аллостерическим: при снижении уровня NADPH его активность снижается, а глюкозо-6-фосфат утилизируется в гли-

колизе. В результате действия солевого и медного стрессов в конце первого пассажа (10 суток на селективной среде с последующими 30 сутками восстановления на контрольной среде) удельная активность фермента у солевых растений снижалась в 2.5 раза, а у медных – в 3.7 раза (различия с контролем достоверны ($P<0.05$)). Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у контрольных растений на протяжении трех пассажей снижалась с $14.56\pm2.46 \times 10^{-3}$ ФЕ/мг до $8.02\pm3.11 \times 10^{-3}$ ФЕ/мг, что может объясняться образованием листьев с нормально развитыми устьицами в процессе онтогенетического взросления. К концу адаптации (120 суток) значения удельной активности у трех групп растений выравнивались. Ранее О.А. Землянухиной было показано, что в условиях пониженного содержания воды у растений-регенерантов сахарной свеклы $K_м$ снижался в 1.3 раза, что предполагает возможное изменение структуры активного центра молекулы фермента из-за увеличения сродства энзима к субстрату. Окислительный стресс является эволюционно закрепленным иммунным откликом растительного организма на действие стрессовых факторов. Образование активных форм кислорода зависит от образования NADPH в цитозоле при усилении метаболизма углеводов. Однако при стрессе наблюдается снижение метаболических циклов: пентозофосфатного, гликолиза и др. в результате снижения содержания углеводов и их замедленного поступления в ткани растения. Известно, что у высших растений пентозо-фосфатный шунт играет роль главного поставщика NADPH в процессах ассимиляции и свободнорадикальных процессов в цитозоле. Поэтому у высших растений в цитозоле активна только окислительная ветвь пентозо-фосфатного цикла, в которой образуются С5-сахарофосфаты. Выравнивание к концу эксперимента активностей фермента у трех групп растений свидетельствует о нормализации метаболических процессов в процессе длительной адаптации к солевому и медным стрессам.

Солевой стресс не оказал значительного влияния на содержание основного растворимого белка. В процессе онтогенетического взросления (120 суток) наблюдалось падение содержания белка как у контрольных, так и у опытных растений в 2.0-2.5 раза (различия с третьим пассажем достоверны ($P<0.05$)). Однако к концу долговременной адаптации разница по содержанию белка между опытными и контрольными растениями выравнивалась.

Пролин обладает антиоксидантными, протекторными свойствами, защищающими растения при действии стрессов различной природы [4]. Результаты работы обнаруживают довольно высокий конститутивный уровень пролина у контрольных растений на протяжении всего периода наблюдения равный 11 мг%/г. У растений, подвергшихся солевому и медному стрессовому воздействию, к концу первого пассажа количество пролина возрастает в 2-2.5 раза (различия с контролем достоверны ($P<0.05$)), но к концу эксперимента его содержание падает до контрольного уровня. Это может быть показателем запуска стресс-факторами механизмов адаптации.

Результаты экспериментов по определению содержания общего растворимого белка клетки, свободного пролина и активности основного фермента окислительной цепи пентозо-фосфатного цикла у микроклонов растений вейгелы цветущей «вариегата» свидетельствуют о получении хорошо адаптированных к условиям засоления и присутствию ионов тяжелых металлов (медь) организмов.

Выводы подтверждаются нормальным ростом и развитием адаптированных растений на летальных концентрациях обоих агентов.

1. Pugin A., Frachisse J. M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R., Guern J. Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells. Involvement of plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway // Plant Cell. 1997. V. 9. P. 2077-2091.

2. Землянухина О.А., Калаев В.Н., Воронина В.С., Мирошниченко Л.А. Влияние абиотического стресса на содержание свободного пролина у микроклонов вейгелы цветущей «вариегата» (Weigela florida «Variegata») // Проблема региональной экологии. - 2016. - № 6. - С. 6 - 13.

3. Землянухин А.А., Землянухин Л.А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений. – Воронеж: Изд - во ВГУ, 1996. 188 с.

4. Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. 1999. Т. 48. № 2. С. 321-336.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В ХЛОРОПЛАСТЕ: ПРОДУКЦИЯ, ДЕТОКСИКАЦИЯ И СИГНАЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ

Б.Н. Иванов, Д.В. Ветошкина, М.А. Козулева, М.М. Борисова-Мубаракшина

ФБГУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино, Россия; e-mail: ivboni@rambler.ru

В хлоропластах фотосинтезирующих клеток высших растений активные формы кислорода (АФК) возникают на свету со скоростью, превышающей скорость их появления в органеллах и компартментах всех других клеток живых организмов. Знание механизмов образования АФК может обеспечить как выработку эффективных способов предотвращения их деструктивного влияния на биомолекулы, так и выяснение путей осуществления ими сигнальной функции.

Особенностью хлоропластов является то, что в них при освещении образуются все АФК [1]. Именно в хлоропластах возможна значительная первичная генерация синглетного кислорода, $^1O_2$, формирующегося из «обычной» триплетной молекулы $^3O_2$ в результате обращения спина одного из неспаренных электронов. Такой процесс легко протекает при переносе энергии на молекулу $^3O_2$ от молекулы хлорофилла, находящейся в триплетном состоянии. Взаимодействие $^3O_2$ с триплетным хлорофиллом в реакционном центре фотосистемы 2 (ФС2) считается основным путем генерации $^1O_2$ в растениях. Предполагается возможность его генерации и в фотосистеме 1 (ФС1).

В хлоропластах при нарушении процессов окисления воды возможно образование и относительно долгоживущих АФК, гидропероксидов органических молекул [2]. Этот процесс приводит к изменению свойств тилакоидных мембран и нарушению фотосинтетической функции хлоропласта.

Возникновение других АФК в хлоропласте инициируется восстановлением молекулы кислорода O_2 в фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ) (реакция Мелера). Это – неизбежный процесс при нынешнем содержании кислорода в атмосфере Земли, учитывая окислительно-восстановительные потенциалы переносчиков ФЭТЦ в высших растениях, зеленых водорослях и цианобактериях. Первичный продукт восстановления молекулы O_2 в ФЭТЦ –

супероксидный анион радикал, $O_2^{\bullet-}$. *In vivo,* восстановление O_2 происходит одновременно с восстановлением НАДФ$^+$ и фиксацией CO_2; в зависимости от вида растения при определенных условиях среды на восстановление кислорода тратится до 60 % электронов, поступающих в ФЭТЦ от воды [1].

Участие ферредоксина, компонента ФЭТЦ, расположенного в строме хлоропласта, в процессе восстановления O_2 весьма мало, особенно в условиях восстановления НАДФ$^+$. Восстанавливают O_2 в хлоропластах, прежде всего, мембранные компоненты ФЭТЦ, и скорость именно этого процесса возрастает при увеличении интенсивности света [3]. В ФС1, которая является главным местом восстановления O_2 в хлоропластах, оно осуществляется как терминальными железо-серными кофакторами переноса электрона, F_A и F_B, расположенными на стромальной поверхности тилакоидной мембраны, так и промежуточными кофакторами, молекулами филлохинона, расположенными в глубине мембраны. Экспериментальные результаты предполагают, что именно филлосемихинон является основным восстановителем O_2 при умеренных и высоких интенсивностях света [4]. Было обнаружено, что молекулы O_2 могут восстанавливаться и в пуле пластохинона, и что это восстановление осуществляется пластосемихиноном на границе тилакоидной мембраны и водной фазы [5].

Прямые измерения с использованием обладающих разной липофильностью детекторов супероксидных радикалов, показали, что эти радикалы действительно могут продуцироваться мембранными компонентами ФЭТЦ как на поверхности тилакоидов, то есть, *in vivo* в строме хлоропласта, так и в гидрофобной фазе тилакоидной мембраны [6].

Не все супероксидные радикалы, продуцируемые в ФЭТЦ, регистрируются вне тилакоидов, и количество таких не обнаруживаемых $O_2^{\bullet-}$ увеличивается с увеличением интенсивности действующего света; при этом с увеличением интенсивности света увеличивается и количество молекул H_2O_2, образующихся внутри тилакоидной мембраны [7]. Сопоставление этих данных с тем, что вклад пула пластохинона в полное восстановление кислорода в ФЭТЦ увеличивается с увеличением интенсивности света, превышая его вклад в генерацию $O_2^{\bullet-}$, а также с особенностями кинетики окисления этого пула после освещения и с данными модельных экспериментов с искусственной

генерацией $O_2^{\bullet-}$ в тилакоидах свидетельствует, что образование молекул H_2O_2 в пределах мембраны осуществляется в реакции $O_2^{\bullet-}$ с пластогидрохиноном, PQH_2 [8].

Модельные эксперименты показывают, что синглетный кислород также может превращаться в пероксид водорода в реакции с PQH_2. Очень быстро с участием супероксиддисмутазы превращаются в пероксид водорода и супероксидные радикалы, которые или образуются в строме, или выходят в строму из мембраны. Пероксид водорода уже в концентрациях близких к 10 мкМ ингибирует фотосинтез вследствие окисления тиоловых групп ферментов цикла Кальвина, и такая концентрация H_2O_2 в строме при обычных скоростях фотосинтеза создавалась бы на свету менее чем за 1 мин, даже если только 1% электронов, поступающих в ФЭТЦ, участвуют в восстановлении кислорода. Уменьшение концентрации H_2O_2 в строме до неопасного для ферментов уровня осуществляется с участием аскорбат-глутатионового цикла, ключевой реакцией которого является восстановление молекул H_2O_2 аскорбатом с образованием монодегидроаскорбат-радикала. Восстановление этого радикала является приоритетным процессом при переносе электронов в ФЭТЦ высших растений, что обеспечивает постоянную регенерацию антиоксиданта [9].

ФЭТЦ является чувствительным датчиком, информирующим системы метаболизма растения об изменениях в окружающей среде, причем экспериментальные данные показывают, что управление адаптационными процессами осуществляет, прежде всего, окислительно-восстановительное состояние пула пластохинона, которое регулирует, в частности, размер пигментной светособирающей антенны ФС2. Из представленных выше результатов следует, что от окислительно-восстановительного состояния этого пула может зависеть продукция в хлоропластах молекул H_2O_2, которые являются основными молекулами, участвующими в системе окислительно-восстановительной сигнализации в клетках и тканях растений. Нами показано, что именно содержание пероксида водорода в листе определяет размер светособирающей антенны ФС2 [10]. Мы полагаем, что молекулы H_2O_2, сформированные с участием PQH_2 внутри тилакоидной мембраны, являются главными первичными мессенджерами, с участием которых информация об окислительно-восстановительном состоянии пула пластохинона передается систе-

мам, обеспечивающим адаптацию растений к изменяющимся условиям среды.

1. Иванов Б.Н., Хоробрых С.А., Козулева М.А., Борисова-Мубаракшина М.М. Роль кислорода и его активных форм при фотосинтезе. В кн.: Современные проблемы фотосинтеза. (Аллахвердиев С.И., Рубин А.Б., Шувалов В.А., ред.) Москва: Изд-во МГУ им. М.В. Ломоносова, 2014. Т. 1, С. 407-460.

2. Khorobrykh S.A., Khorobrykh A.A., Yanykin D.V., Ivanov B.N., Klimov V.V., Mano J. Photoproduction of catalase-insensitive peroxides on the donor side of manganese-depleted photosystem II: evidence with a specific fluorescent probe // Biochemistry. 2011. V. 50. P. 10658−10665.

3. Kozuleva M., Ivanov B. Evaluation of the participation of ferredoxin in oxygen reduction in the photosynthetic electron transport chain of isolated pea thylakoids // Photosynthesis Research. 2010. V. 105. P. 51–61.

4. Kozuleva M., Ivanov B. The mechanisms of oxygen reduction in the terminal reducing segment of the chloroplast photosynthetic electron transport chain // Plant Cell Physiology. 2016. V. 57. P. 1397-1404.

5. Mubarakshina M., Ivanov B. The production and scavenging of reactive oxygen species in the plastoquinone pool of chloroplast thylakoid membranes // Physiologia Plantarum. 2010. V. 140. P. 103–110.

6. Kozuleva M., Klenina I., Proskuryakov I., Kirilyuk I., Ivanov B. Production of superoxide in chloroplast thylakoid membranes: ESR study with cyclic hydroxylamines of different lipophilicity // FEBS Letters. 2011. V. 585. P. 1067-1071.

7. Mubarakshina M., Khorobrykh S., Ivanov B. Oxygen reduction in chloroplast thylakoids results in production of hydrogen peroxide inside the membrane // Biochimica et Biophysica Acta. 2006. V. 1757. P. 1496-1503.

8. Vetoshkina D.V., Ivanov B.N., Proskuryakov I.I., Borisova-Mubarakshina M.M. Involvement of the chloroplast plastoquinone pool in the Mehler reaction // Physiologia Plantarum. 2017.

9. Ivanov B.N. The competition between methyl viologen and monodehydroascorbate radical as electron acceptors in spinach thylakoids and intact chloroplasts // Free Radical Research. 2000. V. 33. P. 217-227.

10. Borisova-Mubarakshina M.M., Ivanov B.N., Vetoshkina D.V., Lubimov V.Y., Fedorchuk T.P., Naydov I.A., Kozuleva M.A., Rudenko N.N., Dall'Osto L., Cazzaniga S., Bassi R. Long-term acclimatory response to excess excitation energy: evidence for a role of hydrogen peroxide in the regulation of photosystem II antenna size // Journal of Experimental Botany. 2015. V. 66. P. 7151-7164.

ТОЧКИ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ АСКОРБАТ-ГЛУТАТИОНОВОГО ЦИКЛА В ПРОЦЕССЕ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН И РОСТА ПРОРОСТКОВ ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ

POINTS OF ASCORBAT-GLUTHATION CICLE ACTIVITY CHANGES DURING WINTER BARLEY SEEDS GERMINATION AND SEEDLINGS GROWTH

А.С. Казакова

Azov-Black Sea Engineering Institute of Don State Agrarian University, Zernograd, Rostov-on-Don Region, Russia

Tel.: 8-906-452-68-93, e-mail: Kasakova@inbox.ru

При прорастании семян происходит активизация метаболических процессов, что сопровождается образованием активных форм кислорода (АФК), защита от которых осуществляется за счет использования высокоактивной антиоксидантной системы в составе низко- и высокомолекулярных соединений. Важную роль в защите клеток от избыточного накопления и повреждающего действия АФК играют аскорбиновая кислота (АК) и глутатион (GSH), которые функционируют как единый аскорбат-глутатионовый цикл. Исследования содержания низкомолекулярных антиоксидантов в прорастающих семенах зерновых культур немногочисленны, при этом во всех этих исследованиях для анализа отбирали семена не по фазе их развития, а по времени от замачивания. Такой подход даёт усредненную характеристику изучаемого процесса, так как в анализ попадают семена, находящиеся на разных фазах прорастания, а полученные на основе такого подхода результаты не могут отражать протекание процесса в индивидуальном семени. Нами была разработана шкала микрофено-

логических фаз прорастания семян (МФФ ПС) ячменя, которая включает 8 микрофенофаз: в том числе МФФ ПС собственно прорастания семени (до его наклёвывания), а также микрофенофазы роста проростков, в том числе три МФФ ПС, предложенные нами впервые (К-1, К-2 и К-3) и описывающие этапы развития и роста зародышевой корневой системы [Kasakova, 2014]. На основе данного подхода к изучению физиологии и биохимии прорастающего семени ярового и озимого ячменя нами были впервые установлены закономерности изменения содержания компонентов системы АК и GSH в условиях оптимального и недостаточного увлажнения. Однако из-за того, что МФФ ПС «корешки 1» (К-1) длится только 2…4 часа, а «росток» (Р) – 6…8 часов, оценка содержания антиоксидантов в эти микрофенофазы проведена не была.

В связи с этим целью данного исследования явилось изучение содержания АК и GSH в семенах озимого ячменя по всем восьми МФФ ПС. Объектом исследования служили выделенные зародыши из сухих и прорастающих семян и проростки озимого ячменя трёх сортов за три года репродукции. Семена проращивали в растильнях на фильтровальной бумаге при +20° С. Содержание АК, GSH определяли методом Петта в модификации Прокошева и выражали в мкг/г на абсолютно сухую массу (АСМ).

Установлено, что изменение содержания АК и GSH в тканях проростка по фазам прорастания семян всех сортов озимого ячменя за все годы репродукции имеет общие закономерности: в целом оно у всех сортов возрастает от сухого семени до появления полноценного проростка, однако кривая при этом приобретает два минимума, так как содержание АК и GSH в интересующие нас микрофенофазы К-1 и Р существенно снижается. Следовательно, когда главный зародышевый корешок прорывает колеоризу, а затем появляются второй и третий корешки (но все они имеют длину до 2-х мм), в тканях проростка происходят существенные изменения активности антиоксидантной системы, что может являться отражением перестройки метаболизма в целом. От момента наклёвывания семени (что принято считать точкой прорастания семени) до микрофенофазы К-1 в среднем по всем изученным сортам содержание АК снижается в два раза (с 10 до 5 мкг/г), а содержание GSH – в 1,2 раза (с 59,3 до 48,6 мкг/г). Затем за короткий промежуток времени от МФФ К-1 до МФФ К-2 (ко-

роткие корешки) содержание АК возрастет в три раза (с 5 до 14,8 мкг/г), а содержание GSH – в два раза (с 48,6 до 93,4 мкг/г).

В МФФ ПС «росток», когда при наличии растущих корешков из цветковых чешуй семени появляется колеоптиль длиной менее половины длины семени, происходит вторичное снижение содержания АК и GSH. От предыдущей фазы К-3 (длинные корешки) до микрофенофазы Р в среднем по всем изученным сортам содержание АК снижается в два раза (с 18,5 до 9,4 мкг/г), а содержание GSH – в 1,9 раза (с 138,5 до 72,8 мкг/г). Затем за короткий промежуток времени от МФФ Р до МФФ «проросток» (эту фазу определяли согласно ГОСТ-12038-84) содержание АК возрастет в 3,3 раза (с 9,4 до 31,3 мкг/г), а содержание GSH – в 1,6 раза (с 72,8 до 116,3 мкг/г).

Таким образом, выявленные закономерности изменения количества АК и GSH по микрофенофазам прорастания семян озимого ячменя свидетельствуют о том, что непродолжительные по времени МФФ ПС «К-1» и «росток» являются точками изменения активности аскорбат-глутатионового цикла, когда расход АК и GSH сначала превышает их синтез/регенерацию, а затем их содержание быстро восстанавливается. Это может отражать и направленность физиолого-биохимических процессов в период прорастания семени и роста проростков. Очевидно, именно в эти МФФ ПС происходит переключение метаболизма и именно здесь следует искать ключевые лимитирующие факторы ростовых процессов.

О РОЛИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В АДАПТАЦИИ ЯЧМЕНЯ К НИЗКОЙ ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Н.М. Казнина, Ю.В. Батова, Н.С. Репкина, Г.Ф. Лайдинен, А.Ф. Титов

ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия; e-mail: kaznina@krc.karelia.ru

В условиях лабораторного опыта изучали влияние температуры 4°С на рост проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L.), состояние клеточных мембран, активность антиоксидантных ферментов – суперок-

сиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и гваяколовой пероксидазы (ПО), а также содержание транскриптов генов (*HvCu/ZnSOD*, *HvCAT* и *HvPRX*), контролирующих синтез этих ферментов.

Для этого проростки ячменя сорта Зазерский 85 выращивали в течение 7 сут в условиях контролируемой среды в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе с добавлением микроэлементов. Затем их в течение 4 сут подвергали действию температуры 4˚С, которая является для ячменя закаливающей, а контрольные растения оставляли в прежних условиях. О влиянии температуры 4˚С на рост проростков судили по изменению (по отношению контролю) высоты побега, состояние клеточных мембран оценивали по выходу из клеток электролитов и содержанию малонового диальдегида (МДА), как показателю интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ). Одновременно с этим в листьях определяли количество транскриптов указанных выше генов и активность соответствующих им антиоксидантных ферментов.

Результаты исследования показали, что низкая положительная температура вызывает резкое торможение роста проростков. В частности, за 4 сут ее воздействия высота побегов в опытном варианте увеличилась всего на 8% по отношению к контролю.

Как известно, одной из основных причин задержки роста растений, вызываемых низкой температурой, являются структурно-функциональные изменения и/или нарушения мембран, вызванные, в частности, усилением интенсивности окислительных процессов вследствие возрастания количества АФК, что приводит к увеличению проницаемости мембран. Однако в наших опытах при действии температуры 4°С интенсивность ПОЛ и проницаемость клеточных мембран в листьях проростков не изменялись (табл.).

Установлено, что предотвращение развития окислительного стресса у растений в неблагоприятных условиях окружающей среды прежде всего достигается за счет эффективной работы антиоксидантной системы (АОС), в том числе антиоксидантных ферментов [1, 2]. Наши исследования также выявили у проростков, подвергнутых действию температуры 4°С, значительное повышение (почти в 7 раз) количества транскриптов гена *HvCu/ZnSOD*, которое сопровождалась примерно двухкратным увеличением активности СОД – фермента, участвующего в нейтрализации супероксидного анион-радикала с

образованием H_2O_2. Однако повышения уровня транскриптов генов *HvCAT* и *HvPRX*, отвечающих за синтез КАТ и ПО – ферментов, разлагающих образующуюся перекись водорода, при этом не происходило, а их активность даже снижалась (соответственно в 1.7 и 2.4 раза по сравнению с контролем).

Таблица

Влияние температуры 4˚С на состояние мембран и активность антиоксидантных ферментов в листьях проростков ячменя с. Зазерский 85

Показатель	Контроль	4˚С
Проницаемость мембран, % от полного выхода	19.0±0.9	20.2±1.3
Содержание МДА, мкмоль/г сырой массы	4.27±0.20	4.39±0.16
Активность СОД, усл.ед.акт./мг белка	2.61±0.24	4.03±0.13*
Активность КАТ, ммоль/мг белка·мин	39.90±5.73	22.9±2.1*
Активность ПО, ммоль/мг белка·мин	2.34±0.24	0.97±0.10*

** различия с контролем достоверны при $P<0.05$*

Установлено, что предотвращение развития окислительного стресса у растений в неблагоприятных условиях окружающей среды прежде всего достигается за счет эффективной работы антиоксидантной системы (АОС), в том числе антиоксидантных ферментов [1, 2]. Наши исследования также выявили у проростков, подвергнутых действию температуры 4°С, значительное повышение (почти в 7 раз) количества транскриптов гена *HvCu/ZnSOD*, которое сопровождалась примерно двухкратным увеличением активности СОД – фермента, участвующего в нейтрализации супероксидного анион-радикала с образованием H_2O_2. Однако повышения уровня транскриптов генов *HvCAT* и *HvPRX*, отвечающих за синтез КАТ и ПО – ферментов, разлагающих образующуюся перекись водорода, при этом не происходило, а их активность даже снижалась (соответственно в 1.7 и 2.4 раза по сравнению с контролем).

Уменьшение активности КАТ и ПО у растений при действии низких положительных температур отмечалось ранее и другими авторами [3, 4]. Предполагается, что в таких условиях поддержание допустимого уровня перекиси водорода может осуществляться за счет

активизации других компонентов АОС, например, ферментов аскорбат-глутатионового цикла, которые также участвуют в нейтрализации H_2O_2.

В целом проведенное исследование показало, что 4-суточное воздействие температуры 4˚С на проростки ячменя вызывает у них сильное торможение роста, но не сказывается на интенсивности окислительных процессов и проницаемости мембран. Очевидно, сохранению структурно-функциональной целостности мембран способствует, по крайней мере отчасти, значительное повышение количества транскриптов гена *HvCu/ZnSOD* и усиление активности СОД в листьях, что обеспечивает их защиту от избыточных количеств супероксида. В отличие от СОД, КАТ и ПО, по-видимому, не играют столь же важную роль в адаптации растений ячменя к низкой положительной температуре.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема НИР №0221-2014-0032, № г.р. АААА-А17-117022850044-2).

1. Foyer C.H., Noctor G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context // Plant Cell Environ. 2005. V.29. P 1056–1071.

2. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода./ Под ред. И.П. Ермакова. – М.: КДУ, 2007. – 140с.

3. Janda T., Szalai G., Rios-Gonzaier K., Veisz O., Páldi E. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals // Plant Sci. 2003. V. 164. P. 301–306.

4. Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Процессы, препятствующие повышению интенсивности перекисного окисления липидов у холодостойких растений при гипотермии // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 875–882.

РОЛЬ NO В РАЗВИТИИ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ БРАССИНОСТЕРОИДА

Ю.В. Карпец[1], Ю.Е. Колупаев[1], В.А. Хрипач[2]

[1]Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, Украина; e-mail: plant_biology@mail.ru

[2]Институт биоорганической химии НАН Беларуси Минск, Республика Беларусь; e-mail: khripach@iboch.bas-net.by

Брассиностероиды (БС) относят к группе стрессовых фитогормонов, принимающих участие в формировании многих адаптивных реакций растений на стрессоры различной природы, в т. ч. действие экстремальных температур, обезвоживание, засоление [1]. Накоплены многочисленные сведения об индуцировании устойчивости растений к неблагоприятным абиотическим факторам экзогенными БС. Вместе с тем механизмы активации адаптивных реакций под влиянием БС до сих пор изучены недостаточно.

Получены сведения о роли АФК как сигнальных посредников в процессах индуцирования устойчивости растений БС [2]. Менее изученной остается роль монооксида азота (NO) в реализации физиологических эффектов БС. Показано, что у растений огурца антагонисты NO снимали вызываемые БС эффекты повышения устойчивости к параквату, нивелировали усиление экспрессии генов антиоксидантных ферментов и повышение их активности [3]. Авторами сделано заключение, что индуцируемое БС образование NO происходит при посредничестве АФК, поскольку нивелируется скавенджером пероксида водорода диметилтиомочевиной (ДМТМ) и ингибитором НАДФН-оксидазы дифенилениодониумом. Обработка растений табака Бентхама брассинолидом вызывала повышение их солеустойчивости [4]. Этот эффект сопровождался увеличением содержания в листьях оксида азота и нивелировался при обработке скавенджером NO PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) и вольфраматом натрия – ингибитором нитратредуктазы, считающейся одним из генераторов NO.

Целью работы явилось изучение возможного участия оксида азота в индуцировании 24-эпибрассинолидом (24-ЭБЛ) устойчивости

колеоптилей пшеницы к повреждающему нагреву и исследование связи БС-зависимых изменений содержания оксида азота в клетках с образованием АФК.

Базальные части колеоптилей пшеницы отделяли от 4-суточных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала, выращенных при 20°С. Колеоптили инкубировали на простерилизованном 2%-ном растворе сахарозы с добавлением Na-соли пенициллина (100 тыс. ед./л, контроль). 24-ЭБЛ растворяли в этаноле и вносили соответствующие количества в среду инкубации колеоптилей (конечная концентрация 50 мкМ). Для модификации NO статуса клеток колеоптили обрабатывали скавенджером оксида азота PTIO (50 мкМ), ингибитором фермента, подобного NO-синтазе животных L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester, 500 мкМ) или ингибитором нитратредуктазы вольфраматом натрия (500 мкМ). При исследовании роли АФК в реализации эффектов 24-ЭБЛ использовали антиоксиданты ионол (5 мкМ), диметилтиомочевину (ДМТМ – 50 мкМ) и ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол (2 мкМ). После суточной инкубации колеоптилей в растворах исследуемых соединений часть отрезков подвергали потенциально летальному прогреву в водяном ультратермостате в стерильной дистиллированной воде в течение 10 мин при 43.0 ± 0.1°С. Затем колеоптили помещали в чашки Петри со стерильным 2%-ным раствором сахарозы с добавлением пенициллина. Через 2 сут оценивали их повреждение.

Содержание NO в колеоптилях анализировали с использованием реактива Грисса. Генерацию супероксидных анион-радикалов отрезками колеоптилей определяли по восстановлению нитросинего тетразолия. Содержание H_2O_2 в тканях колеоптилей определяли с помощью ферротиоцианатного метода.

Уже через 1 ч после начала инкубации колеоптилей на среде с добавлением 50 мкМ 24-ЭБЛ отмечалось увеличение в них содержания NO, максимальный эффект наблюдался через 2 ч, после чего содержание оксида азота постепенно уменьшалось, почти достигая значений контроля к 24 ч.

Усиление генерации супероксидного анион-радикала проявлялось через 1 ч после начала воздействия на колеоптили 24-ЭБЛ. Максимальные величины наблюдались через 2–4 ч после начала обработки фитогормоном. Через 24 ч воздействия 24-ЭБЛ генерация $O_2^{\bullet -}$ дос-

товерно не отличалась от величин контрольного варианта.

Заметное увеличение содержания пероксида водорода в колеоптилях пшеницы под влиянием 24-ЭБЛ наблюдалось только через 4–6 ч после начала обработки. Через 24 ч воздействия фитогормона содержание пероксида водорода в колеоптилях снижалось до значений контроля.

Ингибитор NO-синтазы животных L-NAME заметно нивелировал повышение содержания NO, наблюдавшееся через 2 ч после начала обработки колеоптилей 24-ЭБЛ. Обработка колеоптилей ингибитором нитратредуктазы вольфраматом натрия вызывала тенденцию к снижению содержания NO в варианте с обработкой колеоптилей 24-ЭБЛ.

Антиоксидант ионол и скавенджер пероксида водорода ДМТМ в отсутствие 24-ЭБЛ не оказывали существенного влияния на содержание оксида азота в колеоптилях пшеницы. В то же время как ионол, так и ДМТМ, практически полностью снимали вызываемое 24-ЭБЛ повышение содержания NO в колеоптилях пшеницы.

Ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол сам по себе не влиял на количество оксида азота в колеоптилях, но существенно угнетал эффект увеличения его содержания, вызываемый обработкой отрезков 24-ЭБЛ.

При обработке колеоптилей ингибиторами NO-синтазы L-NAME и нитратредуктазы вольфраматом натрия в отсутствие 24-ЭБЛ существенных изменений генерации супероксидного анион-радикала не наблюдалось. В вариантах с сочетанием 24-ЭБЛ с L-NAME и вольфраматом генерация супероксидного анион-радикала была несколько ниже, чем в варианте с 24-ЭБЛ, однако эти эффекты ингибиторов достоверны лишь при $P \leq 0.1$. Скавенджер оксида азота PTIO сам по себе не оказывал заметного влияния на продукцию супероксидного анион-радикала колеоптилями пшеницы, однако частично снимал эффект усиления генерации $O_2^{\bullet-}$, происходящий при обработке колеоптилей 24-ЭБЛ.

Положительное влияние 24-ЭБЛ на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы нивелировалось PTIO, ингибиторами ферментов, генерирующих NO, антиоксидантами и ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом.

В литературе имеются сведения о том, что индуцированное БС

усиление образования оксида азота в клетках растений огурца и табака зависит от происходящей ранее активации продукции АФК [3, 4]. В наших экспериментах также вызываемое 24-ЭБЛ повышение содержания оксида азота в колеоптилях пшеницы полностью нивелировалось их обработкой ионолом, связывающим радикальные АФК, скавенджером пероксида водорода ДМТМ и частично ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом. С другой стороны, ингибиторы NO-синтазы L-NAME и нитратредуктазы вольфрамат вызывали лишь относительно небольшое уменьшение индуцированного 24-ЭБЛ усиления генерации $O_2^{\bullet-}$ колеоптилями пшеницы. Скавенджер оксида азота PTIO только частично нивелировал вызываемое обработкой колеоптилей 24-ЭБЛ усиление образования супероксидного анион-радикала. Возможно, что формирование АФК-сигнала предшествует увеличению содержания NO в клетках, однако оксид азота также влияет на процесс генерации АФК. В целом можно сделать заключение о роли NO в трансдукции брассиностероидного сигнала, индуцирующего развитие теплоустойчивости колеоптилей и о функциональном взаимодействии АФК и NO как сигнальных посредников.

1. Fariduddin Q., Yusuf M., Ahmad I., Ahmad A. Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses // Biol. Plant. 2014. V. 58. P. 9–17.

2. Xia X.J., Wang Y.J., Zhou Y.H., Tao Y., Mao W.H., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J.Q. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber // Plant Physiol. 2009. V. 150. P. 801–814.

3. Cui J.X., Zhou Y.H., Ding J.G., Xia X.J., Shi K., Chen S.C., Asami T., Chen Z., Yu J.Q. Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumberpce // Plant Cell Environ. 2011. V. 34. P. 347–358.

4. Zhu T., Deng X.-G., Tan W.-R., Zhou X., Luo S.-S., Han X.-Y., Zhang D.-W., Lin H.-H. Nitric oxide is involved in brassinosteroid-induced alternative respiratory pathway in *Nicotiana benthamiana* seedlings' response to salt stress // Physiol. Plant. 2016. V. 156. P. 150–163.

РЕАКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ НА СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРА РОСТА МЕЛАФЕНА И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ МЕДИ И СЕЛЕНА

И.Г. Кириллова

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева», г. Орёл, Россия; e-mail: kaf_botany@univ-orel.ru

В последние годы особое внимание уделяется функционированию антиоксидантной системы растений. Основное предназначение данной системы состоит в обезвреживании активных форм кислорода (АФК) за счет инициации ими перекисного окисления липидов мембран (ПОЛ) [1].Большое значение приобретает также изучение механизмов действия синтетических регуляторов роста с антиоксидантными свойствами. К регуляторам роста последнего поколения относится препарат мелафен (соль бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты). В настоящей работе изучено совместное действие регулятора роста мелафена и микроэлементов меди и селена на активность ферментов-антиоксидантов (пероксидазы, каталазы, полифенолоксидазы) и количество продуктов ПОЛ в клубнях растения картофеля (в период снятия опытов). Исследования проводили с растениями картофеля сорта Удача, которые выращивали в условиях вегетационного домика в почвенной культуре. Обработку регулятором роста мелафеном и микроэлементами проводили путем замачивания посадочных клубней в водных растворах следующих концентраций: мелафена – 10^{-8} М, $CuSO_4$* 5 H_2O – 3 *10^{-5} М, Na_2SeO_3 –10^{-6} М в течение 8 часов. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы определяли по методу Бояркина [2], активность каталазы по количеству выделившегося кислорода, количество продуктов ПОЛ- спектрофотометрическим методом по реакции с роданитом аммония (содержание гидроперекисей) и с тиобарбитуровой кислотой (содержание малонового диальдегида) [3]. Достоверность результатов оценивали по критерию Стьюдента.

Проведенные исследования показали, что обработка растений картофеля регулятором роста мелафеном и мелафеном совместно с микроэлементом медью повышает активность пероксидазы в клубнях (рис. 1). Больший эффект оказало дополнительное обогащение расте-

ний микроэлементом медью. В литературе есть данные, что медь способствует синтезу в растениях железосодержащих ферментов, в частности, пероксидазы. Совместное применение регулятора роста мелафена и микроэлемента селена, напротив, снизило данный показатель. Определение каталазной активности показало ее увеличение при обработке растений мелафеном и мелафеном совместно с селенитом натрия. Что касается совместного действия мелафена и меди, то на этом фоне каталазная активность в клубнях картофеля практически не изменилась по сравнению с контрольным вариантом и имела некоторую тенденцию к снижению (рис.2).

В литературе есть указания, что высокие концентрации меди тормозят каталазную а ктивность почвы [4].

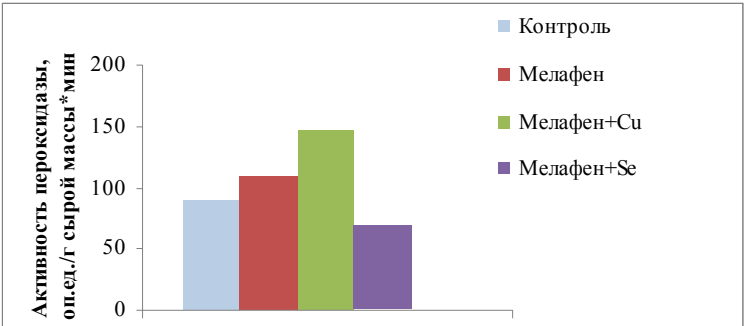


Рис.1. Активность пероксидазы в клубнях картофеля

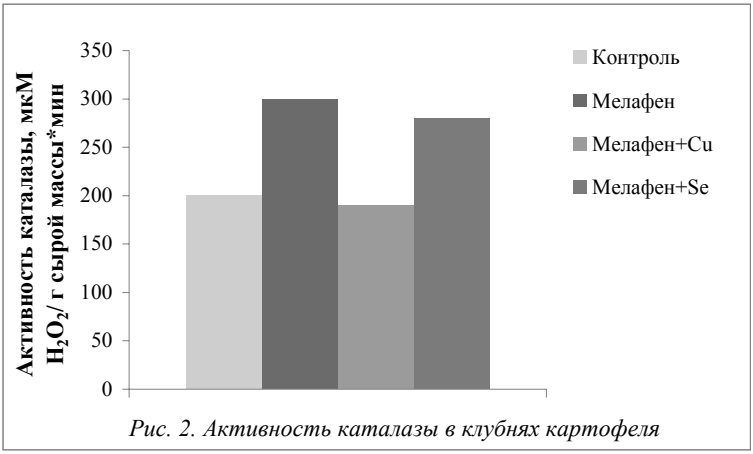


Рис. 2. Активность каталазы в клубнях картофеля

Определение активности другого медьсодержащего фермента-полифенолоксидазы показало несколько иную картину. Так, во всех вариантах опыта она понизилась по сравнению с контролем. Совместная обработка мелафеном и микроэлементами (медью и селеном) существенно уменьшила данный показатель (рис.3). Наибольшее снижение активности данного фермента отмечено в варианте с совместным применением мелафена и селенита натрия. Как известно, микроэлемент селен обладает антиоксидантными свойствами, а фермент полифенолоксидаза активна при патогенезе, старении, ранениях. Снижение ее активности в клубнях при совместном действии мелафена и микроэлементов указывает на повышение устойчивости растений картофеля к действию стрессоров.

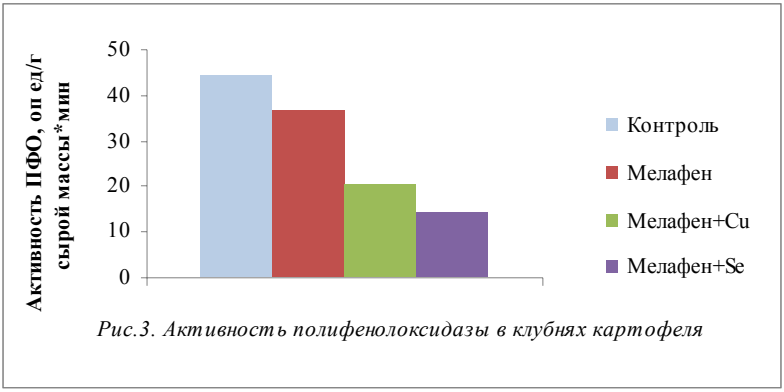


Рис.3. Активность полифенолоксидазы в клубнях картофеля

Определение продуктов перекисного окисления липидов показало, что содержание гидроперекисей в клубнях несколько повысилось в вариантах с мелафеном и с совместным действием меди и мелафена (рис.4). В варианте с совместным действием мелафена и селена этот показатель снизился в 2 раза. Что касается содержания МДА – конечного продукта липопероксидации мембран клеток, то отмечено уменьшение его количества во всех вариантах опыта по сравнению с контролем (рис.5). Наибольшее снижение данного показателя отмечено в варианте с совместной обработкой регулятором роста мелафеном и микроэлементом медью (в 2,8 раза).

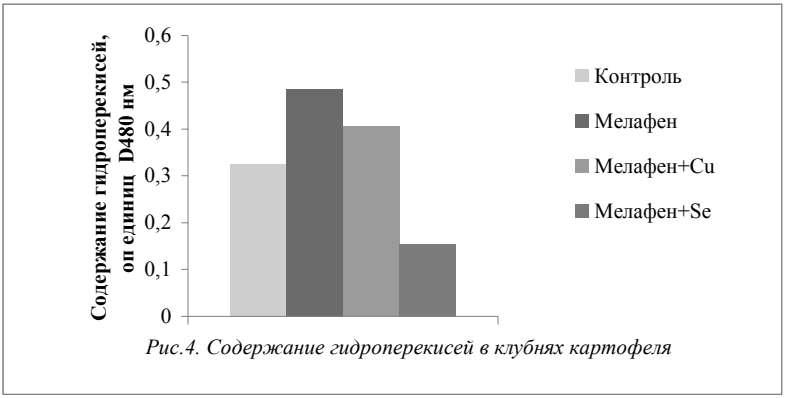


Рис.4. Содержание гидроперекисей в клубнях картофеля

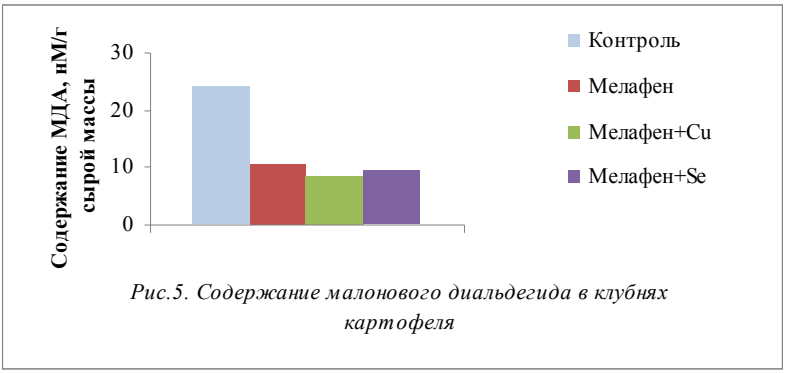


Рис.5. Содержание малонового диальдегида в клубнях картофеля

Таким образом, показано, что антиоксидантная система растения картофеля чувствительна к обработке регулятором роста мелафеном и микроэлементами – медью и селеном.

1. Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals // Biochem. and Cell Biol. -1990.- V. 68.- P. 989 – 998.

2. Гавриленко В.Ф., Ладынина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. М. -1975. -392 с.

3. Артюхов В.Г., Наквасина М.А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. Воронеж: ВГУ. -2000. -296 с.

4. Черных Н.А., Ладонин В.Ф. Вопросы нормирования содержания тяжелых металлов в почве // Химия в сельском хозяйстве.- 1995. -№5.-С.10-21.

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ЯБЛОНИ В ПЕРИОД ВОЗДЕЙСТВИЯ ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

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

ФГБНУ Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, г. Краснодар, Россия; e-mail: galina-kiseleva-1960@mail.ru

В зоне южного плодоводства России с экстремально высокими температурами летнего вегетационного периода устойчивость растений яблони к высокотемпературному стрессу представляет несомненный интерес, поскольку повышенные температуры окружающей среды негативно влияют на физиолого-биохимические процессы яблони, что, в конечном итоге снижает ее урожайность.

Исследования проводили в 2016 г. на базе ЗАО ОПХ «Центральное», ФГБНУ СКЗНИИСиВ, г. Краснодар. Объектами исследования служили сорта яблони различного эколого-географического происхождения: Айдаред, Эрли Мак, Дейтон (селекции США), Лигол (польской селекции), Рассвет, Фортуна, Союз, Родничок, Прикубанское (селекции СКЗНИИСиВ, Россия).

Цель исследований – по активности антиоксидантной системы защиты выявить сорта яблони, устойчивые к высокотемпературному стрессу в период засухи.

Содержание фенолкарбоновых, органических кислот, активность пероксидазы определяли по соответствующим методикам с использованием метода капиллярного электрофореза, каротиноидов – спектрального метода базе ЦКП «Приборно-аналитический» и лаборатории физиологии и биохимии растений ФГБНУ СКЗНИИСиВ [1].

Известно, что под действием экстремальных температур усиливается образование активных форм кислорода (АФК) в клетках растений. Почвенная засуха также может способствовать генерации АФК, особенно если она сопровождается высокой солнечной инсоляцией [2]. Увеличение содержания АФК в растительных клетках приводит к нарушению многих физиолого-биохимических процессов. В связи с этим большое значение имеет функционирование антиокси-

дантных систем, снижающих внутриклеточные концентрации АФК, а также систем, ликвидирующих токсические продукты взаимодействия АФК с биополимерами и повышающих устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды.

В результате проведенных исследований в течение летнего вегетационного периода на содержание фенолкарбоновых кислот, каротиноидов, органических кислот, активность пероксидазы выделились сорта, у которых в течение летнего периода указанные показатели имеют тенденцию к увеличению. Эти сорта выделены как устойчивые к высоко температурному стрессу и засухе.

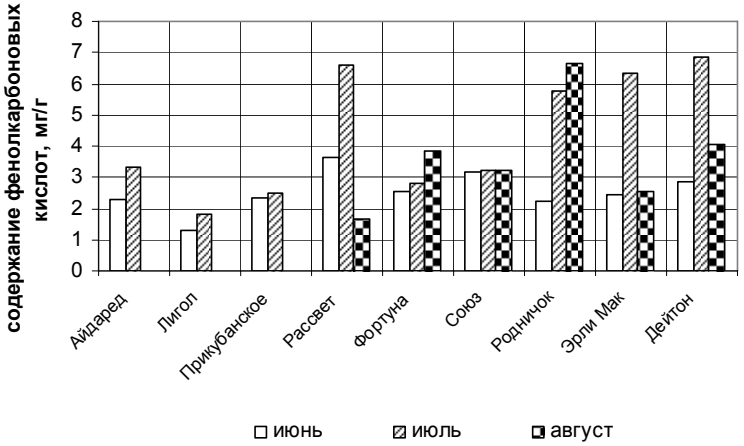


Рисунок 1. Динамика содержания суммы фенолкарбоновых кислот в листовом аппарате яблони в условиях летнего периода 2016 г.

Фенолкарбоновые кислоты являются важными антиоксидантами в системе защиты растений яблони во время летней засухи. В период воздействия высоко температурного стресса в августе 2016 г. в сравнении с июнем в листовом аппарате сортов яблони Айдаред, Фортуна, Союз повысилось содержание фенолкарбоновых кислот (рис.1).

Каротиноиды, благодаря наличию сопряженных двойных связей, могут связывать синглетный кислород и ингибируют образование свободных радикалов, предупреждая их негативное действие на растительный организм. Каротиноиды снимают избыток энергии у возбужденного хлорофилла или синглетного кислорода и рассеивают ее через процесс нерадиационной релаксации в виде тепла. Таким обра-

зом, может быть предотвращен окислительный стресс [3]. В августе 2016 г. в листовом аппарате сортов яблони Прикубанское, Союз, Родничок повысилось содержание каротина (рис.2).

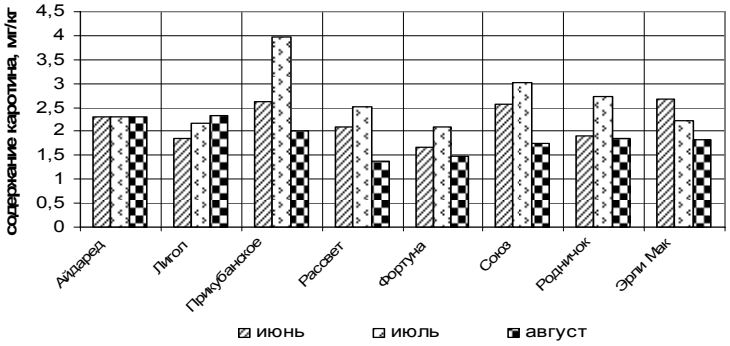


Рисунок 2. Динамика содержания каротина в листовом аппарате яблони в условиях летнего периода 2016 г.

Органические кислоты ингибируют некоторые ферменты, ответственные за восстановление продуктов окисления полифенолов. Показано, что органические кислоты (янтарная, яблочная, лимонная) активируют внеклеточную пероксидазу, что приводит к значительной интенсификации образования супероксида.

Таким образом, в результате проведенных исследований в период воздействия высоко температурного стресса у сортов яблони Прикубанское, Союз, Родничок, Айдаред, Фортуна, выделенных как засухоустойчивые, увеличилось содержание фенолкарбоновых кислот, каротиноидов, органических кислот, активность пероксидазы, свидетельствующее о функционировании антиоксидантных систем, повышающих устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды.

Поддержано грантом №16-44-230077 р_а Российского фонда фундаментальных исследований и администрации Краснодарского края.

1. Ненько Н.И., Ильина И.А., Воробьева Т.Н. [и др.] Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда / Под общей редакцией Н.И. Ненько. - Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015. 115 с.

2. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. - М.: Дрофа, 2010. 638 с.

3. Joana Lua Henfrey, Gerhard Baab, Michaela Schmitz. Physiological stress responses in apple under replant conditions. - Scientia Horticulturae. 2015. Vol. 194. P. 111-117.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ И АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЙ РАСТЕНИЙ

Г.Р. Кудоярова

Уфимский институт биологии РАН, г. Уфа, Россия; e-mail: guzel@anrb.ru

Взаимодействие гормонов и активных форм кислорода (АФК) играет важную роль в жизни растений. С одной стороны, это взаимодействие проявляется в способности АФК влиять на содержание гормонов и передачу гормональных сигналов. С другой стороны, оно реализуется через влияние гормонов, как на продукцию, так и инактивацию АФК. В докладе обсуждается неоднозначность действия АФК, способных не только непосредственно вызывать распад гормонов, но и выполнять сигнальную функцию через экспрессию генов, контролирующих метаболизм гормонов. Рассматриваются известные механизмы участия АФК в передаче гормональных сигналов и влияния гормонов на продукцию и инактивацию АФК. Таким образом, формируется сложная сеть взаимодействий, которая сказывается на процессе роста и развития растений, обеспечивая их адаптацию к условиям обитания. В докладе рассматривается вклад гормонов и АФК и их взаимодействия в регуляцию водного обмена, прорастания и роста растений в норме и при стрессовых воздействиях. Обсуждается роль активных форм кислорода в действии гормонов на растяжимость клеточной стенки и скорость удлинения листьев и корней, участие АФК в АБК-зависимом закрытие устьиц, ингибировании прорастания и регуляции последующего роста. Приводятся примеры быстрой реакции растений на внешние воздействия и значения взаимодействия гормонов и АФК в распространении сигналов по растению

и регуляции адаптивных реакций. Анализируются возможные причины противоречий в интерпретации механизмов влияния АФК, когда увеличение их продукции связывают как с торможением, так и ускорением роста.

АБК – абсцизовая кислота.

ВЛИЯНИЕ РОСТ СТИМУЛИРУЮЩИХ И ГОРМОН ПРОДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА УРОВЕНЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ЗАСОЛЕНИИ

Г.Р. Кудоярова[1], Т.Н. Архипова[1], Л.Ю. Кузьмина[1], С.Ю. Веселов [2]

[1]*Уфимский институт биологии РАН, г. Уфа, Россия; e-mail: arkhipova@anrb.ru*

[2]*Башкирский государственный университет, г.Уфа, Россия; e-mail: Veselov.stanislav5@yandex.ru*

Засоление почвы ингибирует рост гликофитных растений, к которым относятся возделываемые культуры, снижая их урожайность. Из-за аридности климата и применения поливного земледелия площади засоленных почв постоянно растут, что требует изучения механизма рост-ингибирующего действия засоления и повышения солеустойчивости растений. Одним из эффективных способов повышения устойчивости растений к засолению является интродукция в ризосферу растений рост стимулирующих бактерий [1]. Однако механизм защитного действия рост стимулирующих бактерий остается не до конца понятным. Оксидативный стресс сопровождает большинство стрессовых воздействий, включая засоление, и защита от него растений обеспечивает повышение солеустойчивости [2]. Цель данной работы состояла в проверке предположения о том, что повышение солеустойчивости растений под влиянием рост стимулирующих бактерий связано с защитой растений от оксидативного стресса. В коллекции Уфимского института биологии имеются штаммы, отобранные по способности продуцировать гормоны ауксины и цитокинины. Вместе с тем, данные литературы свидетельствуют о способности этих гормонов индуцировать защитные реакции, направленные на защиту растений от оксидативного стресса, повышая тем самым их стресс-устойчивость [3, 4].

В данной работе представлены результаты оценки влияния бактерий на рост растений в норме и при засолении. Для работы были выбраны штаммы рост стимулирующих бактерий рода *Bacillus, Pseudomonas, Advenella*, отобранных из коллекции Уфимского института биологии по фосфат мобилизующей способности (*Advenella kashmirensis* IB-K1), продукции ауксинов (*Pseudomonas extremaustralis* IB-K13-1A) и цитокининов (*Bacillus subtilis* IB-22). Для выявления роли оксидативного стресса в рост-ингибирующем действии засоления и защите от него с помощью бактерий оценивалось содержание в тканях растений малонового диальдегида (МДА) как показателя повреждения мембран в результате перекисного окисления липидов.

Бактериальные инокуляты для обработки семян получали культивированием штаммов как описано [5]. Биомассу отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 4000 об/мин, разводили в водопроводной воде, создавая плотность инокулята при обработке 10^6 КОЕ/семя. Бактеризацию семян проводили с добавлением Na-карбоксиметилцеллюлозы и воды. Численность интродуцированных микроорганизмов определяли на семенах и на корнях трехсуточных проростков пшеницы. Семена пшеницы сорта Омская 35 (*Triticum aestivum L.)* стерилизовали и раскладывали по 20 штук в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную 4 мл дистиллированной воды (контроль) или таким же количеством 100 мМ раствора NaCl. Часть семян обрабатывали суспензией клеток отобранных микроорганизмов. Чашки Петри находились в темноте при комнатной температуре в течение трех суток. На 2 и 3 сутки в чашки добавляли по 1,5 мл воды. На третьи сутки эксперимента оценивали вес проростков, концентрацию МДА в проростках пшеницы по [6] и степень колонизации корней.

На рисунке и в таблице представлены средние значения и ошибка средней. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

Все рассматриваемые бактерии колонизировали семена пшеницы и успешно развивались на корнях проростков как в отсутствии соли, так и в присутствии 100 мМ NaCl, так как, по предварительным данным, использованные в работе культуры микроорганизмов можно отнести к галотолерантным.

Таблица

Влияние бактеризации семян на рост 3-х суточных проростков пшеницы в норме и при 100 мМ NaCl

Показатели роста		Контроль, без бактеризации	Обработка семян суспензией клеток		
			A. kashmirensis	*Ps.extremaustralis*	*B.subtilis*
Сырая масса побега, мг	- NaCl	29.5±1.8	31.9±1.5	32.9±1.1	34.3±1.3*
	%	100	108	111	116
	+ NaCl	16.7±1.0	16.9±0.8	18.1±0.9	19.2±0.4*
	%	100	101	108	115
Сырая масса корней, мг	- NaCl	30.3±1.9	31.6±1.2	36.8±1.6*	36.2±1.1*
	%	100	104	121	119
	+ NaCl	21.2±1.3	21.9±1.4	24.4±0.8*	25.6±0.7*
	%	100	103	115	121

**Различия средних, приведенных в строке, по сравнению с контролем без бактеризации достоверны при $p \leq 0.05$, t-тест.*

Засоление тормозило рост растений пшеницы и в большей степени это относится к росту побегов, чем корней (табл.1). Результаты, полученные ранее [5] и в данных экспериментах, показали, что обработка семян выбранными PGP бактериями положительно сказывается на росте и продуктивности растений пшеницы. Как показали наши эксперименты, в присутствии 100 мМ NaCl обработка семян фосфатмобилизующей бактерией не оказывала влияния на рост проростков пшеницы (табл. 1). Но обработка гормонпродуцирующими бактериями на фоне засоления давала положительный эффект: в присутствии цитокининпродуцирующей бактерии наблюдалась достоверная прибавка сырой массы побегов и корней, в то время как присутствие ауксинпродуцирующей бактерии стимулировало только рост корней.

В нашем эксперименте внесение PGP бактерий защищало растения пшеницы от оксидативного стресса, о чем свидетельствуют более низкие по сравнению с контролем значения концентрации МДА (рис.1). В борьбе с последствиями оксидативного стресса наилучшее действие оказывают цитокининпродуцирующие бактерии.

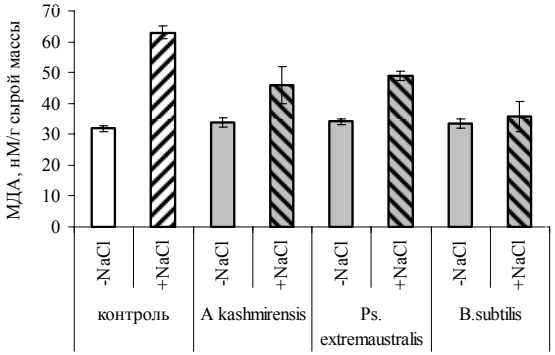


Рис. Влияние бактеризации семян на уровень малонового диальдегида в 3-х суточных проростках пшеницы в норме и при засолении (100 мМ NaCl).

1. Dodd I.C., Perez-Alfocea, F. Microbial amelioration of crop salinity stress // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 3415–3428.

2. Abd-Elgawad H., Zinta G., Hega M.M., Pandey R., Asard H., Abuelsoud W. High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs // Front Plant Sci. 2016. V. 7. 276.

3. Merewitz E. B., Gianfagna T., Huang B. Protein accumulation in leaves and roots associated with improved drought tolerance in creeping bentgrass expressing an *ipt* gene for cytokinin synthesis // J. Exp Botany. 2011. V. 62. P. 5311-5333.

4. Kim J. I., Baek D., Park H. C. et al. Overexpression of *Arabidopsis YUCCA6* in Potato Results in High-Auxin Developmental Phenotypes and Enhanced Resistance to Water Deficit // Molecular Plant. 2013. V. 6. N. 2. P. 337–349.

5. Кудоярова Г.Р., Высоцкая Л.Б., Архипова Т.Н., Кузьмина Л.Ю., Галимзянова Н.Ф., Сидорова Л.В., Габбасова И.М., Мелентьев А.И.. Влияние ауксинпродуцирующих и фосфатмобилизующих бактерий на подвижность почвенного фосфора, скорость роста растений пшеницы и усвоение ими фосфора // Агрохимия. 2016. № 5. С. 28–34.

6. Bezrukova M., Kildibekova A., Shakirova F. WGA reduces the level of oxidative stress in wheat seedlings under salinity // Plant Growth Regul. 2008. V. 54. P. 195–201.

ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА ФОСФОРА НА РОСТ КОРНЕЙ, ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И СОДЕРЖАНИЕ ГОРМОНОВ У РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ

Г.Р. Кудоярова[1], Л.Б. Высоцкая[1], А.В. Феоктистова[1], И.И. Иванов[1], Д.Ю. Зайцев[1], З.А. Ахтямова[2], С.Ю. Веселов[2]

[1] Уфимский институт биологии РАН, г. Уфа, Россия; e-mail: vysotskaya@anrb.ru

[2] Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия; e-mail: Veselov.stanislav5@yandex.ru

Изменение скорости роста и развития корневой системы – один из важных механизмов адаптации растений к дефициту фосфатов. Вместе с тем, механизм этой ростовой реакции остается не до конца понятным. Дефицит фосфатов влияет на концентрацию гормонов и продукцию активных форм кислорода (АФК), в то время как и гормоны, и АФК способны повлиять на рост и развитие корней [1]. Однако возможному взаимодействию этих факторов в регуляции роста корней при дефиците фосфатов не уделялось достаточно внимания. В данной работе было изучено влияние удаления фосфатов из питательной среды на содержание ауксинов и цитокининов в корнях, их удлинение и содержание АФК в их кончиках (до зоны корневых волосков).

Растения ячменя сорта Steptoe выращивали на модифицированной среде Хогланда-Арнона, в которой фосфат калия был заменен на фосфат натрия. После стратификации и проращивания семян половину проростков переносили на среду без фосфатов. В первый и второй день определяли содержание ауксинов методом иммуноферментного анализа и уровень АФК в корнях с помощью окрашивания диаминобензидином (ДАБ). Для иммунолокализации цитокининов и ауксинов кончики корней фиксировали смесью альдегидов [2] и карбодиимидом [3] на вторые сутки, длину корней измеряли через 4 дня после удаления фосфатов из питательной среды. Оценку интенсивности окрашивания корней на фотографиях проводили с помощью программы ImageJ в условных единицах, принимая за 0 % минимальное, а за 100 % – максимальное окрашивание.

Содержание ауксинов в корнях возрастало под влиянием дефицита фосфора (Р) и было в полтора раза выше, чем в контроле в первый и второй день после удаления фосфатов из среды (около 130 нг/г сырой массы корней на среде с Р и 230 нг/г сырой массы – на среде без Р). Эти результаты соответствуют данным литературы о повышении содержания ауксинов в корнях под влиянием фосфатного голодания [1].

Окрашивание с помощью ДАБ выявило повышенный уровень АФК в кончиках корней растений, росших на среде без Р в течение первого дня: интенсивность окрашивания вод влиянием дефицита Р возрастала примерно в 4 раза (рис. 1). На следующий день картина была обратной, и уровень окрашивания АФК был в 3,5 раза выше у растений, получавших фосфаты, по сравнению с растениями дефицитного по Р варианта.

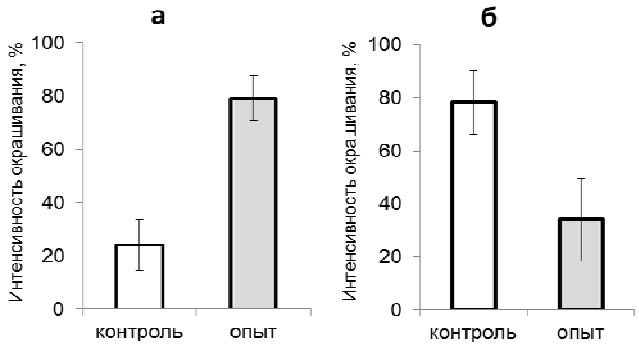


Рисунок 1. Уровень АФК в кончиках корней растений ячменя (интенсивность окрашивания с помощью ДАБ) через 5ч (а) и 1 сутки (б) после удаления фосфатов из питательной среды (опыт).

Известно, что ауксины, с одной стороны, могут индуцировать продукцию АФК, а с другой – способствовать их инактивации, повышая уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты антиоксидантной системы [4]. Первый их этих эффектов позволяет связать повышенную концентрацию ауксинов с первоначальным увеличением уровня АФК в корнях дефицитных по Р корней, а второй – с последующим понижением уровня АФК на фоне дефицита фосфатов.

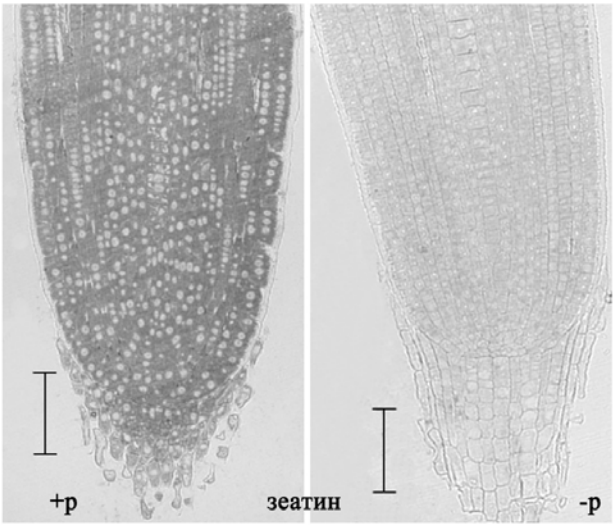


Рисунок 2 Иммуногистохимическая локализация цитокинина зеатина в корнях растений ячменя сорта Steptoe, выращенных на полной модифицированной среде Хогланада Арнона (фосфат калия заменен на фосфат натрия) (+P), и находившихся 2 суток на среде без фосфатов (-P).

В данных экспериментах дефицит фосфатов стимулировал удлинение корней, в результате на среде без фосфатов они были примерно на 12-16 % длиннее. Известно, что АФК способны влиять на рост клеток растяжением [1], что указывает на их возможное участие в изменении скорости удлинения корней в под влиянием дефицита Р. Вместе с тем данные на этот счет неоднозначны и есть сведения как о стимуляции роста, так и его подавлении под влиянием АФК.

Результаты иммунолокализации цитокининов в кончиках корней показали снижение содержания зеатина в клетках под влиянием дефицита Р. Поскольку известно, что цитокинины тормозят рост корней за счет ингибирования деления клеток корня [5], ускоренный рост корней на фоне дефицита Р можно объяснить пониженным уровнем цитокининов в клетках. Падение уровня этих гормонов могло быть следствием как транзиторного повышения уровня АФК, так и накопления ауксинов, поскольку известны как способность АФК непосредственно инактивировать цитокинины, так и способность ауксинов индуцировать ферментативный распад этих гормонов [6].

Таким образом, полученные результаты позволяют сформулиро-

вать предположение о возможной последовательности событий, когда дефицит фосфатов через накопление ауксинов может вызвать изменения в уровне АФК, что в свою очередь может повлиять на уровень цитокининов и удлинение корней. Требуются дальнейшие исследования для проверки этого предположения.

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке РФФИ, грант №15-04-04750.

1. Tyburski J., Dunajska K., Tretyn A. A role for redox factors in shaping root architecture under phosphorus deficieny // Plant Signaling and behavior. 2010. V. 5. P. 64-66.

2. Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Arkhipova T.N., Zaytsev D.Yu, Prinsen E., Egutkin N.L., Medvedev S.S. , Veselov S.Yu. Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) // Journal of Experimental Botany. 2014. V. 65. P. 2287-2294.

3. Высоцкая Л.Б., Веселов С.Ю., Веселов Д.С., Филиппенко В.Н., Иванов Е.А., Иванов И.И., Кудоярова Г.Р.. Иммуногистохимическая локализация и количественное определение ИУК при исследованиях регуляции роста корней // Физиология растений. 2007. Т. 54. С. 926-931.

4. Krishnamurthy A., Rathinasabapathi B. Oxidative stress tolerance in plants/ Novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling // Plant Signaling & Behavior. 2013. V. 8. e25761.

5. Ivanov V.B., Filin A.N. Cytokinins regulate root growth through its action on meristematic cell proliferation but not on the transition to differentiation // Functional Plant Biology. 2017. https://doi.org/10.1071/FP16340.

6. Hare P.D., van Staden J. Cytokinin oxidase: biochemical features and physiological significance // Physiol. Plant. 1994. V. 91. P. 128-136.

РОЛЬ ПЕРОКСИДАЗ И ИЗОФЛАВОНОВ В АДАПТАЦИИ СОИ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ

В.А. Кузнецова[1,3], М.П. Михайлова[2], Л.Е. Иваченко[3]

[1] Акционерное общество «Аметис», г. Благовещенск, Россия; e-mail: kuzvika3385@yandex.ru

[2] ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сои г. Благовещенск, Россия; e-mail: mihaylovamariya@mail.ru

[3]ФГБОУ ВО Благовещенский государственный педагогический университет г. Благовещенск, Россия; e-mail: ivachenko-rog@yandex.ru

Адаптация растений к окислительному стрессу является сложным процессом, протекающим на всех уровнях структурной организации организма и затрагивающим практически все функции растения. Растительная клетка содержит мощную и многообразную антиоксидантную систему защиты от окислительного стресса, которая включает группы ферментов и неэнзиматических соединений, проявляющих антиоксидантные свойства [2]. Считается, что для повышения устойчивости растения к действию стрессора протекают процессы фенольного метаболизма и происходит изменение активности антиоксидантных ферментов [1,3]. В настоящее время процесс формирования устойчивости растений к воздействию окислительного стресса изучен недостаточно полно. Поэтому детальное изучение физиологических процессов на биохимическом уровне представляет большой интерес для оценки адаптации растений к воздействию тяжелых металлов (ТМ), индуцирующих окислительный стресс [2]. Объектом исследования служили растения сои сорта Соната *Glycine max (L.) Merrill* селекции ФГБНУ ВНИИ сои, которые проращивали в растворах солей тяжелых металлов различных концентраций. Наличие окислительного стресса при воздействии солей ТМ определяли по уровню малонового диальдегида в растениях сои. В результате проведенных экспериментов установлено, что ТМ являются индукторами окислительного стресса в растениях сои. Получена зависимость между активностью пероксидаз сои и их множественными формами. Установлено, что повышение или понижение активности пероксидаз при стрессовом воздействии солей ТМ связано с появлением новых

форм фермента относительно контроля. При проращивании сои в присутствии ТМ появляются новые формы пероксидаз с высокой электрофоретической подвижностью, что свидетельствует об участии данных форм в устойчивости сои к окислительному стрессу. Также установлено участие низкомолекулярных антиоксидантов – изофлавонов сои в формировании защитного механизма при воздействии солей ТМ. Добавление в среду солей ТМ способствует протеканию фенольного метаболизма, при этом увеличивается количество даидзина, а содержание других изофлавонов уменьшается, что свидетельствует об ответной реакции растения на окислительный стресс, вызванный действием ТМ. Проведенные исследования влияния стрессового воздействия солей ТМ на активность и множественные формы пероксидаз, фенольный метаболизм изофлавонов сои показали изменения адаптационных процессов биохимической системы растения в ответ на влияние окислительного стресса. Полученные результаты могут быть использованы при разработке систем защиты растений от токсического воздействия ТМ, а также способствовать разработке методов повышения устойчивости растений к неблагоприятному действию высоких концентраций ТМ.

1. Кения, М.В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе / М.В. Кения, А.Н. Лукаш, Е.П. Гуськов // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113. – № 4. – С. 456-470.

2. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Меньщикова [и др.] − М.: Фирма «Слово», 2006. − 556 с.

3. Рогожин, В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / В.В. Рогожин. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 240 с.

ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ *Bacillus subtilis* НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС РАСТЕНИЙ, ВЫЗВАННЫЙ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

З.М. Курамшина[1], Ю.В. Смирнова[1], Р.М. Хайруллин[2]

[1] ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Стерлитамакский филиал, Стерлитамак, Россия, e-mail: kuramshina_zilya@.mail.ru

[2] ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа, Россия; e-mail: krm62@mail.ru

Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) в последние десятилетия достигло глобальных масштабов. В отличие от других загрязняющих веществ, например пестицидов, ТМ не разлагаются живыми организмами. Проникая и накапливаясь в растениях, ионы ТМ прямо или косвенно влияют на все физиологические процессы растительного организма: угнетается или полностью останавливается рост, нарушаются процессы дыхания, фотосинтеза, минерального питания, снижается продуктивность [1]. Помимо прямого воздействия на ростовые процессы, общим следствием токсичности тяжелых металлов является чрезмерное образование и накопление в растительных тканях активных форм кислорода (АФК) – H_2O_2, H_3O^+, $^1O_2^{\bullet}$, $OH^{:-}$, которые могут привести к инактивации ферментов, повреждению ДНК и РНК, разрушению цитоскелета [2, 3]. Увеличение пула АФК и их метаболических продуктов приводит к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ), в норме протекающего в растительных клетках на определенном стационарном уровне. Ускорение процессов ПОЛ является одной из причин дестабилизации клеточных мембран [4].

В настоящее время в отечественной и зарубежной литературе имеется небольшое количество работ, свидетельствующих о том, что некоторые эндофитные бактерии в условиях воздействия на растения абиотических факторов, в том числе ТМ, способны снижать интенсивность развития окислительного стресса в растительных тканях. Одними из таких микроорганизмов являются бактерии *Bacillus subtilis* 26Д. Данные микроорганизмы благодаря ряду своих свойств (продукции фитогормонов, ферментов, антибиотиков и др., устойчивости

к различным физико-химическим факторам, способности приспосабливаться к изменениям окружающей среды) широко применяются в сельскохозяйственной практике для защиты растений от болезней, вызываемых фитопатогенными грибами [5]. Несмотря на имеющиеся литературные данные о роли *B. subtilis* в повышении иммунитета растений и их антистрессовой активности, вопрос о влиянии бацилл на развитие окислительного стресса при действии ТМ остается открытым.

Целью работы явилось изучение влияния инокуляции семян клетками эндофитного штамма бактерий *B. subtilis* 26Д на рост растений пшеницы и уровень малонового диальдегида (МДА) в растительных тканях при воздействии ионов кадмия и никеля.

Объектом исследования служили растения пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Омская 35. Инокулированные спорами бактерий *B. subtilis* 26Д (ВНИИСХМ С.-Пб.- Пушкин, №128) в концентрации 10^6 кл/мл и контрольные (обработка водой) семена проращивали в вегетационных сосудах с почвой (чернозем выщелоченный). Растворы соли ТМ ($Cd(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ или $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) готовили в пересчете на концентрацию иона металла (10 и 200 мг/кг) и вносили в почву однократно после высева семян. Контрольные сосуды поливали дистиллированной водой. На 30 сутки проростки измеряли и отбирали для определения содержания МДА, об уровне которого в растительных тканях судили, используя метод Costa [6]. Все эксперименты проводили как минимум в трехкратной биологической повторности.

В ходе экспериментов было показано, что небольшие концентрации ТМ (10 мг/кг) стимулировали рост как обработанных, так и необработанных растений пшеницы, что хорошо согласуется с данными других авторов [1, 7]. Так кадмий стимулировал рост побегов необработанных растений на 2%, корней – на 12%, никель – на 24 и 14%, побегов и корней соответственно. Увеличение концентрации кадмия и никеля в почве до 200 мг/кг приводило к закономерному подавлению роста корней пшеницы.

Растения пшеницы, обработанные клетками эндофитного штамма бацилл, характеризовались более высокими ростовыми показателями, чем необработанные, как в присутствии ТМ, так и при росте в «чистой» почве. Следует отметить, что при воздействии высоких концентраций (200 мг/кг) и кадмия, и никеля угнетения роста корней

и побегов обработанных бактериями растений не наблюдали; напротив, была отмечена стимуляция роста в пределах 8-10% для кадмия и 20-30% для никеля.

Одним из показателей развития окислительного стресса является накопление в тканях малонового диальдегида (МДА), который образуется в результате ПОЛ, в основном мембран. Нами было установлено, что под действием ионов ТМ в небольших концентрациях (10 мг/кг) содержание МДА в тканях побегов необработанных растений снижалось, а при повышении концентрации металла (200 мг/кг) – увеличивалось. Этот факт может свидетельствовать о том, что при воздействии высоких концентрации ТМ интенсивность процессов ПОЛ в тканях пшеницы возрастала. В тканях растений, обработанных бактериями, при воздействии и кадмия, и никеля, содержание МДА было меньше, чем у необработанных растений.

На основе этих результатов можно полагать, что защитный эффект бактерий по отношению к растениям пшеницы в условиях воздействия никеля связан с сохранением стабильности мембран растительных клеток.

Таким образом, инокуляция клетками *B. subtilis* шт. 26Д уменьшала токсический эффект ТМ, что проявлялось не только в показателях лучшего роста при воздействии ионов кадмия и никеля, но и в уменьшении интенсивности ПОЛ.

1. Квеситадзе Г.И., Хатисашвили Г.А., Евстигенеева З.Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. М.: Наука, 2005. 199 с.

2. Gajewska E., Sk1odowska M. Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves // Bio. Metals. 2007. Vol. 20. P. 27–36.

3. Hossain M.A., Piyatida P., da Silva J.A.T., Fujita M. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation // J. Bot. 2012. Vol. 2012. P. 1-37.

4. Половинкина Е.О., Синицына Ю.В. Окислительный стресс и особенности воздействия слабых стрессоров физической природы на пероксидный гомеостаз растительной клетки: учебно-методическое пособие. Н. Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2010. 62 с.

5. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии

Bacillus Cohn в агроэкосистемах. М.: Наука, 2007. 147 с.

6. Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons // Plant Sci. 2002. Vol. 162. P. 939-945.

7. Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. 194 с.

ЭФФЕКТ ОБРАБОТКИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ЦИТОКИНИНОМ И МЕТИЖАСМОНАТОМ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОЛИНА В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ВЛАГИ

А.Р. Лубянова, А. Плотников, Ф.М. Шакирова

ФБГУН Институт биохимии и генетики Уфимский научный центр РАН, г. Уфа, Россия; e-mail: Lubyanova555@mail.ru

Одним из компонентов защитных реакций растений в ответ на воздействия разнообразных по природе стрессовых факторов является аминокислота пролин, который характеризуется свойством осмопротекторными свойствами, однако в последнее время получены убедительные доводы в пользу его вовлечения в защиту растений от повреждающего действия стресс-индуцированной продукции активных форм кислорода [1, 2].

Цель работы заключалась в сравнительной оценке влияния предобработки метижасмонатом (МеЖ) или цитокинином 6-бензиламинопурином (БАП) в регуляции содержания пролина в проростках пшеницы в норме и в условиях дефицита влаги, вызываемым 12%-ным полиэтиленгликолем 6 000 (ПЭГ), и выявлению роли эндогенной АБК в гормональной регуляции уровня пролина.

Работа проведена на проростках мягкой пшеницы сорта Салават Юлаев. Трехсуточные проростки изолировали от эндосперма, часть из которых переносили на раствор 1.5% сахарозы, а другую – на раствор ингибитора синтеза АБК флуридона (Фл) в концентрации 1 мг/л, приготовленный на 1.5%-ной сахарозе, который в данном варианте опыта присутствовал до его завершения. 4-суточные необработанные и предобработанные Фл проростки корнями помещали на раствор 1.5%-ной сахарозы на 24 ч в присутствие или отсутствии Фл, в кото-

рый вносили 10^{-7} М МеЖ или 44 нМ БАП, затем после тщательного отмывания корней дистиллированной водой контрольные и опытные проростки переносили на раствор 12%-ного полиэтиленгликоля 6 000 (ПЭГ) и после его воздействия в течение 3-х, 6-ти и 24-х ч проростки фиксировали в жидком азоте. Контрольные растения инкубировали на растворе 1.5%-ной сахарозы. Экстракцию и определение свободного пролина проводили согласно методу Bates et al. [3].

В литературе обсуждаются данные, свидетельствующие об участии не только АБК, но и жасмоновой кислоты в регуляции накопления пролина [4], при этом в основе формирования ответных реакций растений на разные по природе и по силе неблагоприятные воздействия лежит взаимодействие и взаимовлияние различных сигнальных путей [4]. Ранее нами было выявлено, что обработка проростков пшеницы МеЖ вызывает более чем 1.5-кратное транзиторное накопление гормонов цитокининовой природы, что позволило предположить, что эндогенные цитокинины могут служить интермедиатами в реализации защитного действия МеЖ [5]. В связи с этим проведен сравнительный анализ динамики содержания пролина в необработанных и предобработанных МеЖ или БАП проростках пшеницы, подвергнутых моделируемой 12%-ным ПЭГ засухи.

Из данных, приведенных на рис. 1, видно, что воздействие ПЭГ как на необработанные, так и предобработанные МеЖ или БАП проростки вызвало к концу опыта почти двукратное накопление пролина в побегах. При этом предобработка БАП способствовала интенсификации повышения содержания пролина в побегах растений в ответ на ПЭГ в начальный период.

АБК, как известно, отводится важная роль в контроле синтеза и накопления пролина как в норме, так и при стрессе [4, 6], в связи с чем, нами были проведены опыты с предобработкой растений флуридоном с целью оценки вклада эндогенной АБК в регуляцию МеЖ и БАП содержания пролина в них в условиях дефицита влаги.

Из данных, приведенных на рис. 2, видно, что присутствие Фл в среде инкубирования проростков предотвратило накопление пролина, вместе с тем, есть сведения о вовлечении и других фитогормонов в регуляцию синтеза и накопления этого ключевого осмопротектанта [7, 8, 9].

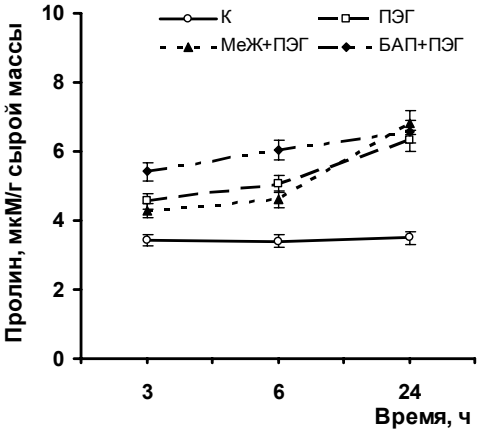


Рисунок 1. Влияние предобработки 4-сут проростков пшеницы МеЖ или БАП в течение 24-х ч на содержание пролина в условиях моделируемой 12%-ным ПЭГ засухи

Так, нами выявлено, что на фоне воздействия Фл обработка растений пшеницы МеЖ в течение 24 ч способствовала возрастанию содержания пролина до контрольного уровня, тогда как обработка проростков БАП в течение 24 ч вызвала заметное увеличение содержания этого осмопротектанта относительно контроля. Полученные результаты указывают на способность исследуемых фитогормонов регулировать содержание пролина в проростках пшеницы, причем в большей степени это касается БАП, а не МеЖ. Дефицит влаги, моделируемый 12% ПЭГ, при действии Фл увеличивал содержание в проростках пшеницы пролина, но в меньшей степени, чем без воздействия Фл. Обработка проростков пшеницы Фл и БАП в условиях воздействия ПЭГ вызвала накопление пролина, но в меньшей степени, чем без воздействия Фл. Под влиянием обработок Фл и МеЖ при дефиците влаги содержание пролина было практически таким же, как и в проростках, выросших при воздействии Фл и БАП.

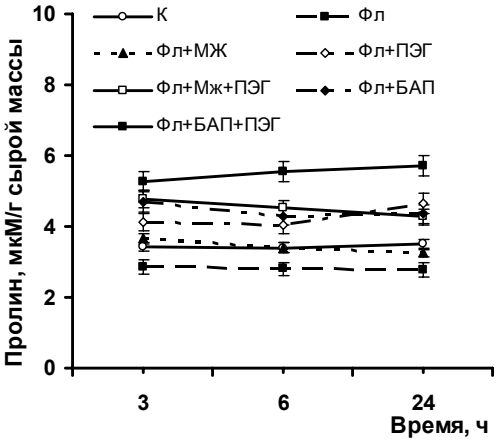


Рисунок 2. Влияние предобработки флуридоном и последующей обработки МеЖ или БАП на содержание пролина в условиях засухи, моделируемой 12% ПЭГ.

Ингибиторный анализ еще раз подтвердил ключевую роль АБК в регуляции синтеза и накопления пролина в проростках пшеницы. Однако сравнительный анализ влияния МеЖ и БАП на содержание пролина в норме и при дефиците влаги выявил, что оба фитогормона вызывают накопление этой аминокислоты в растениях пшеницы, причем 6-бензиламинопурин регулировал этот процесс в большей степени, чем МеЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-04-01853.

1. Kishor P.B.K., Sangam S., Amrutha R.N., Laxmi P.S., Naidu K.R., Rao S., Rao S., Reddy K.J., Theriappan P., Sreenivasulu N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implication in plant growth and abiotic stress tolerance // Current Science. 2005. V. 88. P. 424-438.

2. Szabados L., Savoute A. Proline: a multifunctional aminoacid // Trends Plant Science. 2010. V. 15. P. 89-97.

3. Bates L.S., Waldran R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. 1973. V. 39. P. 205–208.

4. De Ollas C., Arbona V., Gomez-Cadenas A. Jasmonic acid interacts with abscisic acid to regulate plant responses to water stress conditions // Plant Signalling and Behavior. 2015. V.10. e1078953.

5. Шакирова Ф.М., Масленникова Д.Р., Фатхутдинова Р.А., Авальбаев А.М., Юлдашев Р.А., Сомов К.А. Сравнительный анализ физиологического действия метилжасмоната и цитокинина на растения пшеницы // Агрохимия. 2013. №2. С. 49-55.

6. Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Ahmad A. Role of proline under changing environments. A review. // Plant Signaling & Behavior. 2012. V. 7. P. 1–11.

7. Ahmad P., Rasool S., Gul A., Sheikh S.A., Akram N.A., Ashraf M., Kazi A.M., Gucel S. Jasmonates: multifunctional roles in stress tolerance // Frontiers in Plant Science. 2016. V. 7: 830. |

8. Spripinyowanich S., Klomsakul P., Boonburapong B., Bangyeekhun T., Asami T., Gu H., Buaboocha T., Chadchawan S. Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oriza sativa* L.): the role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress // Environmental and Experimental Botany. 2013. V. 86. P. 94-105.

9. Dobra J., Motyka V., Dobrev V., Malbeck J., Prasil I.T., Haisel D., Gaudinova A., Havlova M., Gubis J., Vankova R. Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content // Journal of plant Physiology. 2010. V. 167. P. 1360-1370.

РОЛЬ АФК В СИГНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ФИТОИММУНИТЕТА

И.В. Максимов

ФБГУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия; e-mail: phyto@anrb.ru

Взаимодействие растения и патогена сопровождается сдвигами в окислительных реакциях, что приводит к образованию различных активных форм кислорода (АФК) и вызывает многочисленные быстро наступающие ответные реакции. Различные стрессы, нарушая балансовое соотношение в уровне АФК в растениях, приводят либо к нек-

розу тканей, либо к сверхчувствительной реакции (СВЧ-реакции), которые необходимо отличать друг от друга. Некроз в растениях вызывается патогеном, связан с неблагоприятными условиями среды и приводит к болезни, а СВЧ-реакция также инициируется грибом, но ее протекание запрограммировано в геноме хозяина и направлено на преодоление стрессового состояния.

Первые визуальные наблюдения феномена накопления АФК в растительных тканях было сделано на клубнях картофеля, инфицированных несовместимой расой возбудителя фитофтороза и растений риса при инфицировании возбудителем пирикуляриоза [1; 2]. Вскоре стало известно, что оксидативный взрыв как один из ранних ответов растений может быть вызван не только патогенами [3], но и их элиситорами [4]. Образующиеся АФК спонтанно взаимодействуют с различными субстратами, которые, окисляясь с их помощью, образуют полимеры, укрепляющие клеточную стенку [5]. То есть в зоне генерации АФК наблюдается ускорение окислительных процессов, названная «окислительным взрывом». Значительное повышение содержания АФК вне клетки оказывает прямое антифунгальное действие на развитие патогенов, которые, как показано, весьма чувствительны к ним [6]. Доказательства этого предположения были получены при исследовании влияния H_2O_2 на прорастание спор грибов и ингибиторов образования O_2^- - на перекисное окисление липидов у бактерий [7]. В первом случае наблюдалось подавление роста патогена, а во втором, активное развитие.

В образование АФК при окислительном взрыве вносят вклад главным образом НАДФН-оксидаза и пероксидаза [8; 9]. Так же вклад в генерацию АФК вносят различные оксидазы органических кислот, например, оксалатоксидаза, окисляющая щавелевую кислоту с образованием H_2O_2 [10]. Образующиеся в результате окислительного взрыва АФК, легко проникают в клетки растений, где в невысокой концентрации праймируют геном растений к последующему действию патогена [11]. Свидетельства их защитной роли против патогенов получены на растениях с повышенным уровнем H_2O_2 в тканях [12].

Включение АФК в систему сигнальной трансдукции, несомненно, связано с их способностью к миграции или с быстрым включением в определенные сигнальные системы. Такими свойствами в, первую оче-

редь, обладает H_2O_2, и может активировать киназы киназы МАР киназы [14]. Являясь высокоактивными соединениями, АФК могут выщеплять олигосахариды с поверхности клеточных стенок патогена посредством перекисного гидролиза структурных полисахаридов и, тем самым, способствовать выработке и олигосахаридных элиситоров [15, 16]. Этот эффект может усиливаться в присутствии пероксидазы [8]. Как и любая цепь биохимических реакций, СПУ может регулироваться, например, посредством подавления синтеза или усиления скорости деградации салициловой кислоты. Мутанты арабидопсиса с бактериальным геном *NahG* из *Pseudomonas putida*, кодирующим гидроксилазу салициловой кислоты, не накапливают ее и не способны индуцировать СПУ. Хотя салициловая кислота и является эндогенным сигналом, ее накопление индуцируется под влиянием патогенов [17]. Следовательно, у растений должен существовать более ранний предшественник СПУ, запускающий синтез салициловой кислоты, что позволяет считать ее вторичным мессенджером. Более ранний запуск системы генерации АФК, в сравнении с синтезом салициловой кислоты подтверждается тем, что первый пик ее накопления наблюдался только через 3 часа после начала генерации АФК и ингибировался экзогенной каталазой. Интересно то, что если добавление АФК в среду культивирования клеток сои индуцировала в них экспрессию гена β-1,3-глюканазы, салициловая и жасмоновая кислоты такого эффекта не вызывали, несмотря на то, что, например, первая, сама индуцирует быстрое накопление H_2O_2[8]. И наоборот, H_2O_2 может активировать бензоат-2-гидроксилазу, превращающую бензоат в салициловую кислоту. Совместное же воздействие и салициловой кислоты и H_2O_2 приводило к резкому усилению устойчивости растений табака против *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci.*

Следует обратить внимание на различия в ответной реакции растений, проявляющиеся в зависимости от места генерации H_2O_2. Так, обработка клеток сои элиситором из гриба *Ph. megasperma*, приводящая к эндогенной продукции H_2O_2, запускала синтез мРНК глутатион-S-трансферазы, хитиназы и фенилаланинаммиак-лиазы. Экзогенная же обработка клеток H_2O_2 индуцировала экспрессию только гена глутатион-S-трансферазы, что можно объяснить наличием в растениях множества сигнальных систем, взаимодействие которых между собой только начинает выясняться. Это согласуется с тем, что гене-

рация активных форм кислорода в клетке происходит только после открытия ионных каналов, изменения концентрации ионов Ca^{2+}, активации оксидоредуктаз и синтеза этилена. При этом ингибиторы протеинкиназ подавляют в растениях синтез H_2O_2, а ингибиторы фосфатаз, напротив, способствуют накоплению АФК, свидетельствуя о значимости киназно-фосфатазного комплекса в сигнальной системе, индуцируемой АФК [18]. Таким образом, в индукции сигналинга защитных реакций растений АФК также играют роль вторичных мессенджеров, проникающих в клетки растений и в невысокой концентрации способствующих предадаптации растений к последующему действию стрессора. Определение АФК в качестве вторичных мессенджеров предполагает наличие в растениях и систем, чутко реагирующих на изменение их уровня. Соответственно, в зависимости от их концентрации в растениях происходит активация различных ферментов, задействованных в их синтезе или же утилизации.

Таким образом, исследования по проблеме устойчивости растений акцентируют внимание на важности молекулярной множественности ферментов про-/антиоксидантной системы в повышении мобильности механизмов адаптации и устранения патологических последствий воздействия фитопатогенов.

1. Doke N. // Phisiol. Plant Pathol. 1983. V. 23. P. 345-357.
2. Николаев О.Н., Аверьянов А.А. // Физиология растений. 1991. Т. 38. № 3. С. 512–520.
3. Low P.S., Merida J.R. // Physiol. Plantarum. 1996. V. 96. P. 533-542.
4. Doares S.H., Syrovets T., Weiler E.W. // PNAS USA. 1995. V. 92. P. 4095-4098.
5. Mader M., Amberg-Fischer V. // Plant Physiol. 1982. V. 70. P. 1128-1131.
6. Ramputh A.I. et al., // Plant Sci. 2002. V. 162. P. 431– 440.
7. Keppler L.D., Baker C.J. // Phytopathology. 1989. V. 79. P. 555-562.
8. Kawano T. // Plant Cell Rep. 2003. V. 21. P. 829-837.
9. Wan J., Zhang S., Stacey G. // Mol. Plant Pathol. 2004. V. 5. P. 125-135.
10. Азаришвили Т.С., Евдотиенко В.Ю., Кудзина Л.Ю. // Физио-

логия растений. 1996. Т. 43. С. 196-200.

11. Pieterse C.M. et al., // Annu. Rev. Phytopathol. 2014. V. 52. P. 347–375.

12. Wu G. et al., // Plant Physiol. 1999. V. 120. P. 513-520.

13. Максимов И.В., Черепанова Е.А. // Успехи современной биологии. 2006. Т. 126. С. 250-261.

14. Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G., Sheen J. // PNAS. 2000. V.97. P.2940.

15. Муллагалиев И.Р., Галиаскарова Г.Г., Монаков Ю.Б. // Доклады АН. 1995. Т. 345. С.199-204

16. Schweikert C., Liszkay A., Schopher P. // Phytochem. 2002. V.61. P. 31.

17. Agrawal G.K., Rakwal R., Jwa N.-S. // Plant sci. 2002. V. 162. P. 49.

18. Mehdy M.C. // Plant Physiol. 1994. V.105. P.467.

УЧАСТИЕ АФК В РЕГУЛЯЦИИ ПРОРАСТАНИЯ ПЫЛЬЦЕВОГО ЗЕРНА ГОЛОСЕМЕННЫХ И ПОКРЫТОСЕМЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Н.М. Максимов[1], Д.В. Абрамочкин[1,2], М.А. Брейгина[1,2]

[1]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия; e-mail: pollen-ions@yandex.ru

[2] РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва, Россия.

Прорастание пыльцевого зерна – ключевой этап в жизненном цикле семенных растений, во многом определяющий их репродуктивный успех. Особенность этого этапа – процесс полярного роста, который обеспечивает доставку спермиев к яйцеклетке. Полярный рост свойственен также другим особым типам клеток эукариот, таким, как корневые волоски, ризоиды и аксоны. Пыльцевые трубки представляют собой удобную модель для изучения универсальных механизмов поддержания и регуляции полярного роста и широко используются в этом качестве.

Несмотря на несомненное сходство, полярный рост у голосеменных и покрытосеменных растений имеет ряд существенных отличий,

как цитологических, так и физиологических, предположительно, обусловленных более поздним возникновением и более продвинутым устройством репродуктивной системы Цветковых. Это позволяет говорить о пыльцевых трубках этих двух групп как о двух моделях полярного роста, одна из которых возникла позже в процессе эволюции. Следует отметить, что одна из этих моделей изучена значительно лучше, чем другая: изучение регуляции полярного роста у голосеменных находится на начальном этапе. В то же время, голосеменные растения играют важнейшую роль в лесных и лесотундровых экосистемах России и в лесном хозяйстве, поэтому изучение их репродукции имеет не только фундаментальное, но и практическое значение. Глубокое изучение и сравнительный анализ механизмов, контролирующих полярный рост, в рамках обеих моделей, позволяет говорить о становлении этого процесса в эволюции и оценивать универсальность регуляторных систем и отдельных модулей.

При изучении полярного роста у покрытосеменных было установлено, что одним из ключевых регуляторных модулей является система продукции и ликвидации активных форм кислорода (АФК). Количество, состав и локализация АФК имеет принципиальное значение для запуска, поддержания и окончания полярного роста трубки в тканях пестика. В настоящий момент исследования на покрытосеменных посвящены выявлению мишеней для регуляторного действия АФК и взаимодействия редокс-модуля с другими регуляторными модулями, такими, как ион-транспортный модуль (работа транспортных белков, мембранный потенциал и внутриклеточные градиенты ионов), а также с субклеточными системами, обеспечивающими механику роста (цитоскелет, клеточная стенка, везикулярный транспорт). В своем докладе я представлю актуальные данные, полученные в нашей лаборатории, в том числе в сотрудничестве с кафедрой Физиологии животных с использованием электрофизиологического метода «пэтч-кламп». Мы обнаружили, что ключевой мишенью для АФК в пыльце лилии и табака являются Ca^{2+}-каналы, хотя между двумя объектами были обнаружены отличия в фармакологической характеристике H_2O_2-чувствительных каналов [1], [2]. В пыльце лилии чувствительность к АФК проявляли также K^+-каналы, а в пыльце табака - мембранный потенциал на плазмалемме, изменения которого оценивали двумя независимыми методами. Тем самым была четко проде-

монстрирована тесная связь между редокс-модулем и ионным модулем как у однодольных, так и двудольных растений. Также, используя в качестве модельного объекта субпротопласты из пыльцевых трубок, мы обнаружили действие экзогенных АФК на строительство клеточной стенки, причем эффект был опосредован Ca^{2+}-каналами. Ранее в нашей лаборатории были получены данные о ключевой роли АФК в регуляции механических свойств клеточной стенки на начальных этапах прорастания [3]. Суммируя эти результаты, мы можем говорить о тесной взаимосвязи между редокс-модулем и системой формирования и поддержания свойств клеточной оболочки, которая, в свою очередь, обеспечивает механический аспект прорастания и полярного роста.

Изучение функционирования редокс-модуля в процессе полярного роста у голосеменных было начато в нашей лаборатории сравнительно недавно. В литературе данных на эту тему очень мало. Мы зафиксировали выход АФК из пыльцевых зёрен ели на раннем этапе прорастания. Кроме того, мы обнаружили, что эндогенные АФК необходимы для прорастания пыльцевого зерна. Детальное исследование с применением относительно специфичных антиоксидантов показало, что наиболее значимой АФК является супероксид-радикал, а гидроксил-радикал не является необходимым для этого процесса, как и апопластные АФК (в отличие от внутриклеточных). Эти данные демонстрируют существенные различия в системе редокс-регуляции начального этапа прорастания между покрытосеменными и голосеменными, т.к. те же антиоксиданты иначе влияли на прорастание пыльцы табака [3], [4]. Ингибиторный анализ показал, что ключевую роль в продукции АФК у ели, значимых для прорастания, в том числе, выделяемых в окружающую среду, играет НАДФ-оксидаза плазмаллеммы.

С использованием специфичных красителей и конфокальной микроскопии мы изучили распределение H_2O_2 и супероксид-радикала в пыльцевых трубках и коротких инициалях трубок ели, выявив градиент H_2O_2 в цитозоле и скопление обеих АФК в субапикальных митохондриях. Позже эти данные были подтверждены с помощью световой микроскопии и нитросинего тетразолия.

Эксперименты с добавлением экзогенного пероксида водорода, который является, по нашим данным, ключевой регуляторной моле-

кулой в репродукции покрытосеменных [1], [2], показали, что пыльца ели к нему нечувствительна. В то же время, на этапе роста трубки пероксид водорода оказывал чёткий положительный эффект. Оптическое картирование величины мембранного потенциала в сочетании с ингибиторным анализом выявило интересные закономерности регуляции этого показателя у голосеменных. В целом, градиент мембранного потенциала оказался более плавным, чем у покрытосеменных, которые были изучены нами ранее на табаке [5]. Однако, основные транспортные системы, отвечающие за поддержание этого градиента, сходны у табака и ели. Мы также продемонстрировали влияние экзогенного H_2O_2 и DPI на форму градиента, тем самым впервые выявив связь между редокс-модулем и ионным регуляторным модулем в мужском гаметофите голосеменных растений.

В работе с пыльцой голосеменных активное участие принимала студентка Евменьева А.А.; полученные ею данные она представляет в рамках Школе молодых ученых.

1. Н. М. Максимов, М. А. Брейгина, and И. П. Ермаков, “Регуляция ионного транспорта на плазмалемме пыльцевых трубок пероксидом водорода,” *Цитология*, vol. 57, no. 10, pp. 720–726, 2015.

2. M. A. Breygina, D. V. Abramochkin, N. M. Maksimov, and I. P. Yermakov, “Hydrogen peroxide affects ion channels in lily pollen grain protoplasts,” *Plant Biol.*, vol. 2, pp. 1–7, 2016.

4. A. Smirnova, N. Matveyeva, and I. Yermakov, “Reactive oxygen species are involved in regulation of pollen wall cytomechanics.,” *Plant Biol. (Stuttg).*, vol. 16, pp. 252–257, Apr. 2013.

5. А. В. Смирнова, Н. П. Матвеева, О. Г. Полесская, and И. П. Ермаков, “Образование активных форм кислорода при прорастании пыльцевого зерна,” *Онтогенез*, vol. 40, no. 6, pp. 425–435, 2009.

6. М. А. Брейгина, А. В. Смирнова, Н. П. Матвеева, and И. П. Ермаков, “Изменения мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки,” *Цитология*, vol. 51, no. 10, pp. 815–823, 2009.

РЕДОКС-РЕАКЦИИ В ЛИСТЬЯХ *Ceratophyllum demersum* L. ПРИ ДЕЙСТВИИ МОЧЕВИНЫ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ (Ni^{2+} и Cu^{2+})

М.Г. Малева, Н.В. Чукина, Г.Г. Борисова

Уральский федеральный университет им. Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия; e-mail: maria.maleva@mail.ru

В естественной среде обитания растения могут подвергаться действию поллютантов различной природы, которые оказывают как синергические, так и антагонистические эффекты на физиолого-биохимические процессы.

Никель и медь являются важными микроэлементами, однако их избыток негативно влияет на функционирование растений. Никель не относится к редокс-активным тяжелым металлам (ТМ), однако он способен вызывать дисбаланс между продукцией и утилизацией таких АФК, как пероксид водорода, синглетный кислород и супероксидрадикал [1]. Медь, как металл с переменной валентностью, способен напрямую продуцировать гидроксил-радикалы в реакциях Фентона и Хабера-Вейса [2].

В водных экосистемах урбанизированных территорий часто в повышенных концентрациях встречаются различные азотсодержащие соединения, включая мочевину. Мочевина широко используется как азотсодержащее удобрение, что влечет ее масштабное поступление в водные объекты с сельскохозяйственными стоками. Известно, что высокие концентрации мочевины оказывают токсический эффект на растения. Исследования, проведенные ранее на бразильской элодее, показали, что мочевина (5 мМ) вызывает деградацию хлорофилла *a*, усиление процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), снижение активности антиоксидантных ферментов, при этом в растениях увеличивается синтез пролина и аскорбата [3].

Известно, что при интенсивных и/или продолжительных стресс-реакциях в клетках растений происходит активация процессов свободно-радикального окисления, внутриклеточная кальциевая перегрузка, угнетение энергопродукции, снижение синтеза белка и его денатурация [4]. В этих условиях важную роль играет способность растений противостоять неблагоприятным факторам среды, в том

числе действию органических и неорганических поллютантов. Однако данные о совместном влиянии мочевины и ТМ весьма ограничены.

Цель работы – изучить влияние мочевины и ТМ (Ni^{2+} и Cu^{2+}) в умеренных концентрациях на функционирование антиоксидантной системы и активность уреазы в листьях водного макрофита *Ceratophyllum demersum* L. (роголистник погруженный).

Побеги *C. demersum* длиной 15–20 см в течение 48 часов инкубировали на питательной среде при 23–25°С в условиях естественного освещения. Варианты опыта: мочевина (2 мМ); Ni^{2+} (10 мкМ); мочевина + Ni^{2+} (2 мМ + 10 мкМ); Cu^{2+} (10 мкМ); мочевина + Cu^{2+} (2 мМ + 10 мкМ). Все металлы вносили в форме сульфатов; в контрольный вариант поллютанты не добавляли. После инкубирования побеги промывали 0.01% раствором Na_2ЭДТА и дважды дистиллированной водой.

Содержание никеля и меди в побегах *C. demersum* определяли атомно-абсорбционным методом после мокрого озоления HNO_3(осч). Интенсивность ПОЛ, содержание неферментативных антиоксидантов (каротиноиды, пролин, аскорбат), растворимого белка, активность уреазы и антиоксидантных ферментов определяли в соответствии с общепринятыми методиками [5, 6]. Статистическую достоверность результатов оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, при уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты исследования показали, что побеги роголистника активно аккумулировали ионы (коэффициент биологического накопления составил для Ni^{2+} 1658, для Cu^{2+} – 2428). Добавление мочевины к металлам увеличивало аккумуляцию никеля на 34%, а меди – на 19%.

Уровень ПОЛ в листьях роголистника при действии мочевины достоверно не изменялся, в то время как ТМ при раздельном внесении усиливали этот процесс (в среднем на 23%). Между накоплением меди и содержанием продуктов ПОЛ была обнаружена положительная корреляция (0.60, $p < 0.05$). Добавление мочевины к металлам снижало количество продуктов ПОЛ.

Как известно, растения обладают эффективной многоуровневой системой антиоксидантной защиты, включающей синтез низкомолекулярных антиокислителей (пролин, аскорбат и др.) и ферментов-антиоксидантов. Эти соединения поддерживают редокс-статус клетки на оптимальном для функционирования растения уровне, эффективно

регулируя продукцию и утилизацию внутриклеточных АФК [2, 3]. При инкубации роголистника с мочевиной и Ni^{2+} (раздельной и совместной) содержание каротиноидов и пролина в листьях достоверно возрастало. При действии Cu^{2+} количество каротиноидов снижалось, а пролина – не изменялось. Во всех вариантах наблюдалось значительное уменьшение количества аскорбата по сравнению с контролем. Наибольшее снижение содержания аскорбиновой кислоты (71% от контроля) наблюдалось при совместном присутствии мочевины и Cu^{2+}.

Мочевина и Ni^{2+}, а также их совместное присутствие в среде не оказывали влияния на содержание растворимого белка. Медь усиливала процесс его деградации, однако добавление мочевины в значительной степени ослабляло данный негативный эффект.

Присутствие мочевины в среде вызывало усиление активности уреазы почти в 3 раза. Отдельное внесение никеля слабее активировало этот фермент, в то время как добавление мочевины к Ni^{2+} приводило к возрастанию активности почти в 5 раз. Медь, напротив, на 25% снижала уреазную активность; добавление мочевины в большей степени усиливало ингибирующий эффект.

Мочевина (отдельно и совместно с Ni^{2+}) не оказывала существенного влияния на активность супероксиддисмутазы. При совместном действии Cu^{2+} с мочевиной активность этого фермента повышалась (на 52% от контроля). Инкубация с ионами никеля и меди (при отдельном действии) вызывала увеличение его активности на 41% и 29% соответственно.

Активность каталазы ингибировалась действием всех поллютантов, за исключением мочевины (при раздельном внесении). Ионы меди (как отдельно, так и совместно с мочевиной) полностью ингибировали активность этого фермента.

Инкубирование роголистника с мочевиной и ионами ТМ приводило к уменьшению активности аскорбатпероксидазы. Максимальное снижение ее активности (в 6.7 раз по сравнению с контролем) наблюдалось при совместном действии мочевины и Cu^{2+}. При этом активность гваяколпероксидазы достоверно возрастала. Максимальный рост активности этого фермента наблюдался при действии ионов меди (в 2 раза от контроля).

Таким образом, *C. demersum* демонстрировал высокую аккуму-

лятивную способность в отношении никеля и меди. Исследуемые металлы действовали на компоненты антиоксидантной системы не однозначно, что, вероятно, связано с их разными окислительно-восстановительными способностями. Мочевина при умеренной концентрации (2 мМ) не оказывала негативного влияния на редокс-метаболизм роголистника, даже в некоторой степени активировала процессы синтеза растворимого белка, неферментативных антиоксидантов и вызывала активацию уреазы и пероксидаз. Однако в сочетании с редокс-активными ионами меди приводила к значительному усилению окислительных деструкционных процессов на фоне повышенной аккумуляции этого металла.

Исследования редокс-реакций растений при комплексном действии поллютантов позволяют уточнить адаптивные механизмы и оценить пределы толерантности конкретного вида к загрязнителям, а также прогнозировать изменения в структуре гидроценозов при антропогенных воздействиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-08380 А) и программы 211 Правительства Российской Федерации, соглашение № 02.A03.21.0006.

1. Yilmaz D.D., Parlak K.U. Nickel-induced changes in lipid peroxidation, antioxidative enzymes, and metal accumulation in *Lemna gibba* // International Journal of Phytoremediation. 2011. V. 13(8). P. 805–817.

2. Maksymiec W. Effect of copper on cellular processes in higher plants // Photosynthetica. 1997. V. 34. P. 321–342.

3. Maleva M., Borisova G., Chukina N., Kumar A., Prasad M.N.V. High dose of urea enchances the nickel and copper toxicity in Brazilian elodea (*Egeria densa* Planch. Casp.) // Revista Brasileira de Botanica. 2016. V. 39(3). P. 965–972.

4. Курганова Л. Н. Перекисное окисление липидов – одна из возможных компонент быстрой реакции на стресс // СОЖ. 2001. № 6. С. 76–78.

5. Методы оценки антиоксидантного статуса растений: учеб.-метод. пособие / Г.Г. Борисова и др.; отв. ред. Н.В. Чукина. – Екатеринбург: Изд-во Урал. Ун-та, 2012. 72 с.

6. Jayaraman J. Laboratory Manual in Biochemistry. Wiley Eastern Ltd, New Delhi, 1981.

РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ АСКОРБАТ - ГЛУТАТИОНОВОГО ЦИКЛА В ПРОЯВЛЕНИИ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА РАСТЕНИЯ ПШЕНИЦЫ ПРИ ЗАСОЛЕНИИ

Д.Р. Масленникова, Ф.М. Шакирова

ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН Россия, Республика Башкортостан, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, тел./факс: +7 (347) 235 60 88; e-mail: dishaoil@mail.ru

Салициловая кислота (СК) – эндогенный регулятор роста растений является признанным индуктором системной устойчивости, обладающий способностью повышать устойчивость растений к неблагоприятным факторам разной природы. Однако механизмы, лежащие в основе защитного действия СК на растения, подвергнутые воздействию абиотических стрессов, пока в полной мере не изучены [1, 2]. В ходе предыдущих исследований нами было выявлено, что обработка проростков пшеницы СК приводит к изменениям в балансе активных форм кислорода и активности антиоксидантных ферментов, что играет важную роль в проявлении предадаптирующего и антистрессового действия этого фитогормона на растения пшеницы [3, 4]. Важное участие в нейтрализации АФК принимает аскорбат - глутатионовый цикл, механизм которого заключается в восстановлении перекиси водорода до воды с участием аскорбата и аскорбат пероксидазы (АП), с образованием дегидроаскорбата, который вновь превращается в восстановленную форму с участием глутатиона восстановленного (GSH). Окисленная форма глутатиона (GSSG), восстанавливается в НАДФ(Н) – зависимой реакции с участием глутатион редуктазы (ГР) [5]. Из литературы известно, что обработка растений карликовой пшеницы 500 мкМ СК в условиях воздействия солей марганца, вызывающих сильный окислительный стресс, приводила к дополнительному накоплению аскорбата и GSH, а также сбалансированной активации АП и ГР, что способствовало снижению степени повреждающего действия этого стресса на ростовые процессы [6].

В ходе работы предстояло выяснить роль компонентов аскорбат - глутатионового цикла в проявлении защитного действия СК на растения пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Башкирская 26, подвергну-

тых воздействию 2%-ного NaCl. Семена после стерилизации 96%-ным этанолом проращивали в кюветах на фильтровальной бумаге в течение 3-х суток. После отделения эндосперма часть проростков помещали в стаканы с 2%-ным раствором сахарозы, содержащим 50 мкМ СК на 24 ч. Затем предобработанные и необработанные СК 4-х суточные проростки переносили на смесь 2%-ной сахарозы и 2%-ного NaCl на разные промежутки времени. Контролем во всех опытах служили растения, инкубированные на растворе 2%-ной сахарозы. Содержание GSH и GSSG анализировали согласно [7], аскорбата - [8]. Активность ферментов ГР и АП определяли согласно [9].

Анализ содержания аскорбата и соотношения GSH/GSSG показал, что засоление приводит к значительному падению уровня этих важнейших восстановителей растительной клетки (рис. 1, 2).

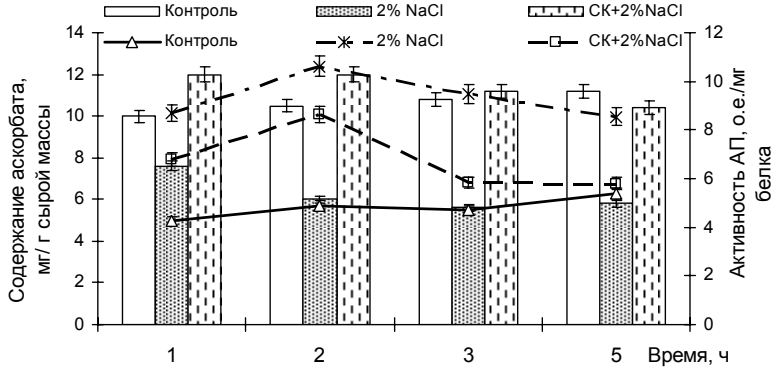


Рисунок 1. Влияние СК на содержание аскорбата и активность аскорбат пероксидазы в корнях 4-х суточных проростков пшеницы в условиях засоления.

Это вполне закономерно, поскольку окислительный стресс, вызванный натрий - хлоридным засолением истощает пул аскорбата и глутатиона, а также приводит к значительному повышению активности АП и ГР (рис. 1, 2).

Предобработка СК способствовала существенному снижению активности АП и поддержанию повышенного содержание аскорбата (рис. 1) посредством позитивной регуляции активности ГР, дополнительное усиление работы которой позволяет достаточно быстро восполнять и практически предотвращать стресс - индуцированное ис-

тощение пула GSH при стрессе (рис. 2).

Полученные результаты указывают на способность СК регулировать состояние основных компонентов аскорбат - глутатионового цикла, таких как содержание аскорбата и соотношение GSH/GSSG, активность его ключевых ферментов - аскорбат пероксидазы и глутатион редуктазы в корнях проростков пшеницы при стрессе, что расширяет спектр проявлений протекторного действия СК на растения пшеницы.

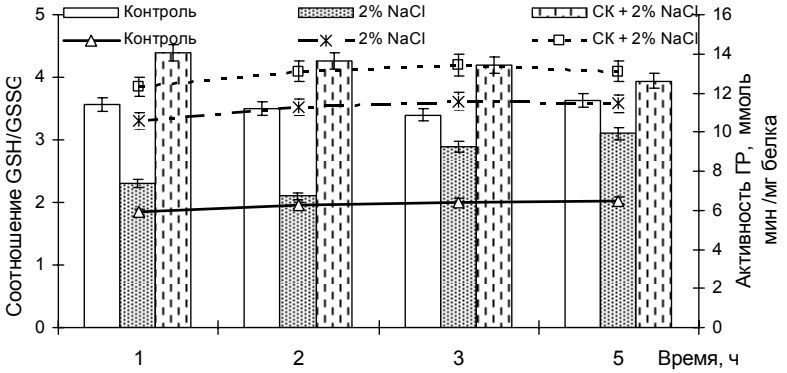


Рисунок 2. Соотношение GSH/GSSG и активность глутатион редуктазы в корнях предобработанных и необработанных СК растениях пшеницы в ходе воздействия 2% NaCl.

1. Wani A. B., Chadar H., Wani A. H., Singh S., Upadhyay N. Salicylic acid to decrease plant stress // Environmental Chemistry Letters. 2017. V. 15. P. 101-123.

2. Vicente M. R.-S., Plasencia J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development // Journal of Experimental Botany. 2011. V. 62. P. 3321–3338.

3. Shakirova F.M., Bezrukova M.V., Maslennikova D.R. Endogenous ABA as a Hormonal Intermediate in the Salicylic Acid Induced Protection of Wheat Plants Against Toxic / In book: Salicylic Acid, (S. Hayat et al. (eds.). Springer Science+Business Media Dordrecht, 2013. Chapter 7. P. 119-140.

4. Масленникова Д.Р., Шакирова Ф.М. Роль компонентов глутатионового цикла в проявлении защитного действия салициловой ки-

слоты на растения пшеницы при воздействии токсических ионов // Вестник Башкирского Университета. 2015. Т. 20. № 1. С. 127-130.

5. Latowski D., Surówka E., Strzałka K. Regulatory role of components of ascorbat – glutathione pathway in plant stress tolerance // in book Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants, N.A. Anjum et al. (eds.), Springer Science+Business Media B.V. 2010. Chapter 1. P. 1-53.

6. Sheng H., Zeng J., Yan F.,.Wang X., Wang Y., Kang H., Fan X., Sha L., Zhang H., Zhou Y. Effect of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, mineral nutrients translocation and antioxidative system in polish wheat (*Triticum polonicum* L.) // Acta Physiologia Plantarum. 2015. 37:32. doi 10.1007/s11738-015-1783-1.

7. Шалыго Н.В., Щербаков Р.А., Доманская И.Н., Радюк М.С. Спектрофлуориметрический метод определения окисленного и восстановленного глутатиона в растениях // Физиология и биохимия культурных растений. 2007. Т. 39. №3. С. 264-270.

8. Физиологические и биохимические методы анализа растений: Практикум / Калинингр. ун-т; Авт.-сост. Г.Н. Чупахина. – Калининград. 2000. 59 с.

9. Акулов А.Н., Гумерова Е.А., Костюкова Ю.А., Никанорова Н.А., Румянцева Н.И., Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений. Учебно – методическое пособие. Казань. Казанский университет. 2012. 51 с.

АФК, АУТОФАГИЯ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ ПРИ СТРЕССЕ

Ф.В. Минибаева[1,2]

[1]ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, Россия; e-mail: minibayeva@kibb.knc.ru

[2]Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия

Универсальными маркерами стресса в растениях являются повышение уровня активных форм кислорода и азота (АФК и АФА) и

накопление в клетках окисленных макромолекул. Развивающийся окислительный стресс, как правило, сопровождается энергетическим дефицитом вследствие необходимости активизации антиоксидантной защиты. К интегральным элементам антиоксидантной защиты клеток относится аутофагия – эволюционно консервативный путь деградации окисленных, поврежденных клеточных структур и органелл. У эукариот аутофагическая деградация необходима для поддержания метаболического гомеостаза, формирования иммунитета и жизнеспособности организма. В 2016 году Нобелевская премия в области физиологии и медицины была вручена Yoshinori Ohsumi за открытия в области изучения механизмов аутофагии. Несмотря на большой прогресс, достигнутый в последние годы в изучении механизмов аутофагии в клетках дрожжей и млекопитающих, наше понимание относительно того, как этот процесс функционирует в растениях, остается чрезвычайно ограниченным. Это обусловлено сложностью генома растений, отличием ряда биохимических процессов, значительным разнообразием метаболитов и защитных механизмов ввиду автотрофности и прикрепленного образа жизни растений. Так, у ряда видов растений, в отличие от дрожжей, показано наличие множества изоформ маркерного белка аутофагии ATG8, выявлена дифференциальная экспрессия генов *Atg8* при сдвигах редокс-гомеостаза. Кроме того, в клетках растений редокс-органеллы и редокс-комплексы, такие как хлоропласты, Рубиско-содержащие тельца, гем-содержащие комплексы, являются одними из основных мишеней для селективного удаления в ходе аутофагии. Аутофагическая деградация митохондрий и пероксисом характерна для всех эукариот. Существует сложная взаимосвязь метаболических и сигнальных путей, контролирующих редокс-статус, аутофагию и энергетический статус в растениях при стрессе. Анализ физиологического состояния растений при действии абиотических стрессовых факторов, таких как голодание, окислительный стресс, засуха, температурный стресс, выявил наличие взаимосвязи между накоплением окислительных маркеров, индукцией аутофагии и энергетическими изменениями в клетках стрессированных растений. Нами показано, что образование аутофагосом и активация экспрессии аутофагических генов при стрессе, как правило, сопровождаются падением митохондриального мембранного потенциала и подавлением интенсивности дыхания растений. Кроме того,

некоторые фармакологические агенты, такие как ингибиторы митохондриальной ЭТЦ и мембранотропы, значительно повышающие проницаемость мембран, не только вызывают энергетический дефицит, но и способствуют накоплению АФК и индукции образования аутофагосом. Падение уровня АТФ является триггером, активирующим АМФ-зависимую протеинкиназу, которая, в свою очередь, снимает блокирующее на аутофагию действие комплекса TOR (Target of Rapamycin) и, взаимодействуя с аутофагическим белком ATG1, способствует запуску формирования аутофагосомы. Обсуждается вклад других возможных энергетических сенсоров аутофагии в стрессовые ответы растений, а также роль аутофагии в тонком балансе между выживанием и гибелью растительного организма.

ДЕЙСТВИЕ СТЕВИОЗИДА НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС КЛЕТОК РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

А.Л. Михайлов, Ю.Ю. Невмержицкая, О.А. Тимофеева
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия; e-mail: almihailov@bk.ru

В связи с широким спектром биологической активности сладких гликозидов получаемых из экстракта травы *Stevia Rebaudiana* Bertoni, в том числе и стевиозида, проводится большое количество разноплановых исследований. Согласно исследованиям, проведенным нашей группой, стевиозид проявляет не только ростстимулирующую активность, но и антистрессовую, так как повышает морозоустойчивость проростков озимой пшеницы.

Активные формы кислорода (АФК) представляют собой группу свободных радикалов, являющиеся производными от кислорода (O_2). В зависимости от концентрации АФК могут играть двоякую роль. При высоких концентрациях они приводят к повреждению биомолекул, тогда как при низких концентрациях – могут выступать как вторичный мессенджер во внутриклеточных сигнальных каскадах [1].

В наших экспериментах объектом исследований служили корни озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казанская 560. В качестве контрольного варианта послужили проростки, выращенные на

водопроводной воде, а в качестве опытных использовали проростки, выращенные на растворе стевиозида в концентрации 10^{-8} М, кадмия в концентрации 1 мМ как стрессового фактора и на растворе кадмия с предобработкой стевиозидом.

В начале исследований мы измерили содержание одной из форм АФК – перекиси водорода. Как видно на рис. 1, стевиозид не повлиял на содержание исследуемого АФК. А вот в варианте с кадмием, как и следовало ожидать, мы получили значительное увеличение содержание перекиси водорода на 67%, что говорит развитии стресса у растений. Предобработка дитерпеновым гликозидом уменьшила негативное влияние ТМ на растения, о чем говорит снижение содержания H_2O_2 на 18% по сравнению с вариантом без предобработки. Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что стевиозид проявляет протекторную роль от избытка АФК в проростках пшеницы и на содержание перекиси водорода влияет опосредованно.

Образование и распространение АФК должны строго контролироваться во избежание окислительного стресса. Растения обладают сложной системой антиоксидантной защиты, включающей неферментативные и ферментативные компоненты детоксикации АФК [2]. Необходимо было выяснить, через какую из систем стевиозид влияет при стрессе на уровень H_2O_2.

К неферментативным компонентам системы антиоксидантной защиты относят пролин, каротиноиды, токоферолы, фенольные соединения и др. [3].

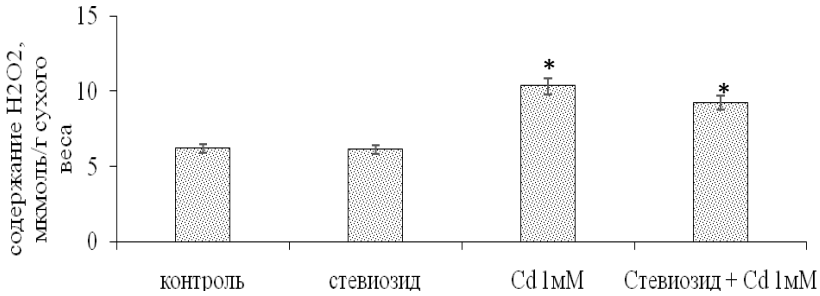


Рисунок 1. Содержание перекиси водорода в корнях проростков озимой пшеницы. * – вариант достоверно отличающийся от контроля (значение $p < 0,05$).

Исходя из вышесказанного нами был проведен опыт по определению содержания пролина. При стрессовых условиях он может составлять около 5% от всего пула свободных аминокислот клеток растений [4].

Как показали результаты (табл.) стевиозид стимулировал накопление пролина в корнях проростков пшеницы в 4 раза по сравнению с растениями, выросшими на воде. Вероятно, уровень пролина в данном случае может свидетельствовать о повышении адаптивного потенциала растений, обработанных стевиозидом.

Таблица

Содержание пролина (мкг/г сух.веса) в корнях озимой пшеницы. * – вариант достоверно отличающийся от контроля (значение $p < 0,05$).

варианты	– стевиозид	+ стевиозид
контроль	4,0±1,1	16,05±1,2*
Cd^{2+} (1 мМ)	56,07±2,1*	63,9±2,3*

При добавлении ТМ в среду выращивания растений уровень пролина возрастал, что является быстрой ответной реакцией растений на стресс, вызванный поллютантом (табл.). Кадмий вызывал повышение содержания исследуемой аминокислоты в 14 раз.

На фоне стевиозида в проростках, обработанных ТМ, концентрация пролина возросла еще больше, по сравнению с действием только ТМ. Вероятно, стевиозид индуцирует образование этого низкомолекулярного антиоксиданта, направленного на защиту клетки и ее компартментов от воздействия ТМ. При окислительном стрессе антиоксидантные ферменты могут инактивироваться АФК, и для восстановления их синтеза требуется определенное время. В этом случае, на первый план выходят низкомолекулярные метаболиты-антиоксиданты [5].

Ферментативная антиоксидантная системы состоит из нескольких ферментов таких, как аскорбатпероксидаза, супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, гваякол пероксидаза, ферменты аскорбат-глутатионового цикла, глутатионредуктаза и др. [2].

Исходя из полученных результатов, необходимо было выяснить, действует ли стевиозид также на ферментативную антиоксидантную

систему. С этой целью провели эксперимент по определению активности аскорбатпроксидазы.

Стевиозид (10^{-8} М) мало влиял на активность исследуемого фермента (рис. 2). Высокая концентрация ТМ вызывала повышение активности аскорбатпероксидазы по сравнению с контролем на 61%.

На фоне стевиозида активность АПО под влиянием ТМ была ниже и разница с контролем составила 51%. Вероятно, что данный эффект стевиозида связан с его снижением уровня АФК за счет увеличения содержания пролина.

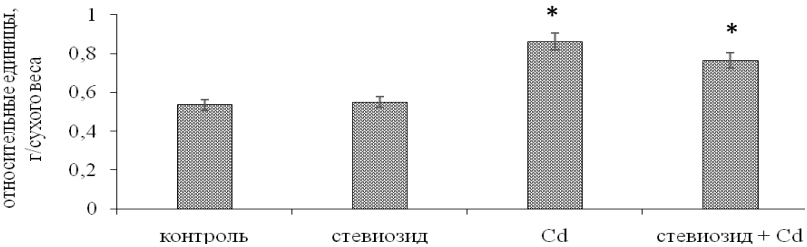


Рисунок 2. Активность аскорбатпероксидазы в корнях проростков озимой пшеницы. * – вариант достоверно отличающийся от контроля (значение $p < 0,05$).

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что дитерпеновый гликозид стевиозид не оказывает непосредственного влияния на образование или «тушение» АФК. Однако значительное увеличение содержания низкомолекулярного антиоксиданта пролина под действием стевиозида, говорит о его опосредованном влиянии на окислительный статус клеток растений. Также об этом свидетельствует снижение активности аскорбатпероксидазы под действием стевиозида.

1. Lidon F.C., Henriques F.S. Oxygen metabolism in higher plant chloroplasts // Photosynthetica. 1993. V. 29. P. 249-279.

2. Pang C.H., Wang B.S. Oxidative stress and salt tolerance in plants // Progress in Botany. 2008. V. 355. P. 231-245.

3. Smirnoff N., Cumbes Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes // Phytochemistry. 2009. V. 28. P. 1057-1060.

4. Matysik J., Alia, Bhalu B., Mohanty P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants // Current Science. 2002. V. 82. P. 525-532.

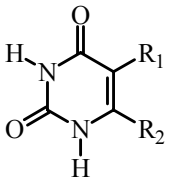
5. Mitteler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends in Plant Science. 2002. V. 7. P. 405-409.

ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА КОМПЛЕКСАХ CU(II) С ПИРИМИДИНОВЫМИ ОСНОВАНИЯМИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В.Ю. Мишинкин, Т.Р. Нугуманов, О.В. Акчурина, С.П. Иванов, С.А. Грабовский, Н.Н. Кабальнова, Ю.И. Муринов

ФГБУН Уфимский Институт химии Российской академии наук, г. Уфа, Россия; e-mail: mishinkin@anrb.ru

В настоящее время интерес к активации молекулярного кислорода в присутствии ионов меди связан с необходимостью понимания роли, которую играют ферменты, содержащие медь в живых системах. В клетках растений супероксиддисмутаза (СОД) представлена тремя изоформами [1], которые различаются входящими в состав активных центров ионами металлов: Cu Zn–СОД, Mn–СОД и Fe–СОД. Механизм действия СОД включает последовательное восстановление и окисление металла активного центра фермента супероксидными анион–радикалами. Супероксид–радикал и пероксид водорода в присутствии ионов железа (Fe^{2+}, Fe^{3+}) и/или меди (Cu^{2+}) могут вступать в реакции Фентона и Габера-Вайса и образовывать гидроксильный радикал, который является самым мощным известным окислителем. Полагают [2], что медь и цинк участвуют в регуляции программируемой смерти клеток – фундаментального процесса, обеспечивающего селективное и упорядоченное "удаление" клеток и играющего критическую роль в контроле над формированием и развитием организмов.



1: $R_1=R_2=H$
2: $R_1=H$, $R_2=CH_3$
3: $R_1=OH$, $R_2=CH_3$
4: $R_1=NH_2$, $R_2=H$
5: $R_1=H$, $R_2=COOH$
6: $R_1=OH$, $R_2=COOH$
7: $R_1=NH_2$, $R_2=COOH$
8: $R_1=NH_2$, $R_2=NH_2$
9: $R_1=H$, $R_2=NH_2$

В данной работе показано, что ионы меди(II) с производными пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот образуют

комплексы, на которых происходит фиксация и активация молекулярного кислорода.

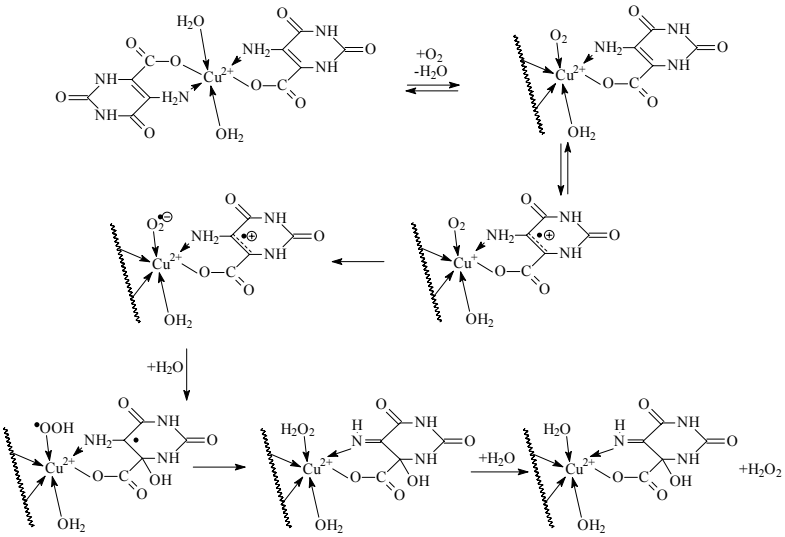
Реакция изученных производных урацила с молекулярным кислородом в присутствии хлорида меди(II) протекает через стадию образования координационных соединений. Методами электронной, ИК и ^{13}C ЯМР спектроскопии определены состав комплексов и донорные центры лиганда, участвующие в образовании связей с ионами меди(II) [3, 4]. Активация молекулярного кислорода происходит только на шестикоординационных комплексах ионов меди(II) с соединениями **3**, **4**, **6**–**8**, при этом молекулы воды входят в координационную сферу комплекса.

Определено количество поглощенного в реакции кислорода, показано образование пероксида водорода. Предложен механизм реакции окисления изученных производных пиримидиновых оснований, который включает комплексообразование, перенос электрона от лиганда через ион металла на кислород, образование активных форм кислорода. В качестве примера приведена схема окисления 5-аминооротовой кислоты (**7**):

Выделены и охарактеризованы продукты реакции окисления.

При фиксации и активации молекулярного кислорода на шестикоординационных комплексах изученных производных урацила с ионами меди(II) происходит внутрисферное окисление лиганда и расходование кислорода. Стадия комплексообразования в реакции окисления молекулярным кислородом является определяющей и зависит от донорных свойств и редокс потенциала лиганда.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00141).



1. Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999. V. 50. P. 601–639.

2. Смирнова Т.А., Коломийцева Г.Я., Прусов А.Н., Ванюшин Б.Ф. Содержание цинка и меди в развивающемся и стареющем колеоптиле проростков пшеницы // Физиология растений. 2006. Т. 53. С. 597–603.

3. Мишинкин В.Ю., Грабовский С.А., Кабальнова Н.Н., Муринов Ю.И. Комплексообразование 5-аминооротовой кислоты с ионами меди(II) растворе ДМСО // ЖОХ. 2015. Т. 85. №7. С. 1166–1171.

4. Мишинкин В.Ю., Грабовский С.А., Кабальнова Н.Н., Муринов Ю.И. Комплексообразование 5-гидроксиоротовой кислоты с ионами меди (II) в водном растворе // ЖОХ. 2012. Т. 82 С. 650–652.

УЧАСТИЕ КОМПОНЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ ФУЛЛЕРЕНОЛОМ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ПРОРОСТКАХ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР

О.В. Молчан, Д.С. Мороз, Т.А. Скуратович, П.А. Драгун

ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь; e-mail: olga_molchan@mail.ru

Наноматериалы все чаще используются в различных сферах деятельности человека, поскольку обладают принципиально новыми физико-химическими свойствами и биологическим действием. Нанотехнологии могут быть направлены и на решение многих актуальных задач растениеводства: повышение урожайности и устойчивости культур к болезням и неблагоприятным условиям окружающей среды, совершенствование технологических процессов производства, переработки и хранения сельскохозяйственного сырья и т.д. Таким образом, ни оценка экологических рисков при накоплении наночастиц в окружающей среде, ни целенаправленное использование нанотехнологий в растениеводстве невозможны без изучения механизмов их влияния на физиолого-биохимические процессы в растениях. Особую роль в большом кластере наноматериалов играют фуллерены, которые представляют собой аллотропическую форму углерода. Анализ литературных данных показывает, что опубликованные к настоящему времени результаты исследований о влиянии фуллеренов и их производных на растительный организм не только малочисленны, но и весьма противоречивы. Так, показано, что фуллерен C_{60} (500 мг $кг^{-1}$) редуцирует прирост биомассы проростков кукурузы и сои [1]. Установлен ингибиторный эффект одной из водорастворимых форм фуллерена $C_{70}(C(COOH)_2)_{4\text{-}8}$ (0,005-0,02 мг/мл) на рост проростков арабидопсиса [1]. С другой стороны, обнаружено, что полигидроксилированный фуллерен $C_{60}(OH)_{20}$ (0,9-47,2 нМ) стимулирует прорастание семян, накопление биомассы и метаболитов в тканях тропической лианы *Momordica charantia* [1]. Противоречия могут быть обусловлены как видоспецифичностью и физиологическим состоянием исследуемых растений, так и особенностями химической структуры или концентрацией используемых наночастиц.

Поскольку регуляция антиоксидантной системы является одним из важнейших компонентов адаптационных механизмов растений, целью работы было установление ее участия в модификации фуллеренолом физиолого-биохимических процессов проростков злаковых культур, в том числе в условиях водного дефицита. В работе использовали фуллеренол [$C_{60}(OH)_{24-26}$] – полигидроксилированный фуллерен (НПК «Нео-ТекПродакт», г. Санкт-Петербург). Оценивали влияние фуллеренола в широком (10^{-6}-10^{-1} мг/мл) диапазоне концентраций. Объектами исследования являлись семена и проростки ячменя и пшеницы. При определении энергии прорастания и всхожести оценку и учет проросших семян проводили согласно ГОСТ 12038-84 на 3 и 7 сутки, соответственно. В первые сутки прорастания подсчитывали количество наклюнувшихся семян. Проростки выращивали также в условиях водного стресса с использованием ПЭГ 20%. Морфометрические параметры, сумму фенольных соединений, антирадикальную активность, содержание эндогенного NO, активность фенилаланинаммиаклиазы, пероксидазы и каталазы определяли согласно [2-6].

В результате было установлено, что фуллеренол (особенно в низких концентрациях, 10^{-6}-10^{-3} мг/мл) стимулирует прорастание семян ячменя и пшеницы уже на начальных этапах. К 3-м и 7-м суткам эффект не так ярко выражен – энергия прорастания и всхожесть для всех вариантов составляют 85-90 и 90-100%, соответственно. При этом длина колеоптиля 3-дневных проростков, обработанных фуллеренолом, может быть выше в 1,5-2 раза по сравнению с контрольными. Стимуляция фуллеренолом ростовых процессов 7-дневных проростков не столь эффективна и составляет 10-25% в зависимости от концентрации наночастиц. Схожие эффекты наблюдаются при стимуляции фуллеренолом накопления сырой массы корневой системы и надземной части проростков. При этом следует отметить, что прирост массы под действием наночастиц (особенно в высокой концентрации) происходит в большей степени за счет водообменных процессов, чем накопления сухого вещества. Наблюдается видоспецифичность влияния фуллеренола на рост проростков.

Таким образом, анализ морфометрических показателей позволяет предположить, что фуллеренол оказывает воздействие на водопоглощающую способность семян и проростков. Стимулирующее влияние на прорастание семян может быть обусловлено, как интен-

сификацией фаз водопоглощения и набухания, так и активацией процессов метаболизма. Фуллеренол водорастворим и может поступать в семена с током воды уже на первых этапах прорастания. Возможно, молекулы фуллеренола способны инициировать образование проколов в оболочке семени, ускоряя, таким образом, поступление воды. Подобный эффект был установлен при исследовании влияния углеродных нанотрубок на прорастание семян томата [1]. Кроме того, за счет большего водопотребления может увеличиться и количество поглощенного растением фуллеренола. С другой стороны, поступая в прорастающие семена, и в зависимости от уровня накопления фуллеренол может воздействовать на процессы, связанные с активной структурной, физиологической и биохимической перестройкой.

Неотъемлемой частью стимуляции метаболизма при выходе из состояния покоя является повышение концентрации активных форм кислорода и активация антиоксидантной системы. В данной работе установлено влияние фуллеренола на содержание эндогенного NO, фенольных соединений и антирадикальную активность, а также активность ферментов антиоксидантных систем – пероксидазы, каталазы и фенилаланинаммиаклиазы корней и надземной части проростков. Отмечено, что фуллеренол в низкой (10^{-6}-10^{-5} мг/мл) и высокой (10^{-2}-10^{-1} мг/л) концентрации либо не влияет, либо незначительно повышает содержание эндогенного NO и суммы фенольных соединений в корнях и надземной части проростков. В то время как, в промежуточных концентрациях 10^{-4}-10^{-3} мг/л на 15-20% снижает содержание данных низкомолекулярных антиоксидантов в колеоптиле. Схожие закономерности отмечаются при оценке влияния фуллеренола на активность фенилаланинаммиаклиазы, пероксидазы и каталазы. Наночастицы в низких концентрациях (10^{-6} и 10^{-5} мг/л) стимулируют увеличение активности фенилаланинаммиаклиазы в гипокотилях и пероксидазы в корнях и в надземной части 3-х дневных этиолированных проростков. Высокие концентрации фуллеренола заметно снижают активность данных ферментов. Каталазная активность была в меньшей подвержена влиянию наночастиц. Влияние фуллеренола на 7-дневные проростки было менее выраженным. Отмечается видоспецифичность наблюдаемых эффектов и зависимость от освещения.

В условиях водного дефицита фуллеренол (10^{-4}-10^{-2} мг/л) также оказывал стимулирующее действие на рост колеоптилей. Макси-

мальная длина, а также сырая и сухая массы колеоптилей отмечены в варианте с использованием 10^{-3} мг/л фуллеренола. Так же как в контрольных условиях выращивания, в условиях водного дефицита фуллеренол снижал содержание фенольных соединений, что может быть обусловлено его собственной антиоксидантной активностью. В то же время отмечено, что уровень эндогенного NO в колеоптилях проростков, семена которых были обработаны фуллеренолом (10^{-3} мг/л), при водном дефиците может увеличиваться по сравнению с контролем. Можно предположить, что активация NO-зависимых компонентов антиоксидантной системы является одним из промежуточных этапов повышения адаптивного потенциала проростков под действием фуллеренола в условиях водного стресса.

Полученные данные позволяют заключить, что модификация фуллеренолом скорости прорастания семян, водообмена и ростовых процессов проростков злаковых культур, в том числе в условиях водного дефицита, сопровождается изменением содержания эндогенного NO, фенольных соединений, а также активности ферментов антиоксидантных систем – пероксидазы, каталазы и фенилаланинаммиаклиазы корневой системы и надземной части проростков.

1. Husen A., Siddiqi K. S. Carbon and fullerene nanomaterials in plant system // Journal of Nanobiotechnology. 2014. V. 12. P. 16-26.

2. Folin, O., Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins // J. Biol. Chem. 1927. V. 73. №2. P. 627-650.

3. Blois M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical // Nature. 1958. V. 181. P. 1199-1200.

4. Запрометов М.Н., Шипилова С.В. Фенилаланин-аммоний лиаза и образование фенольных соединений в проростках кукурузы // Физиология растений. 1972. Т. 19. Вып. 3. С. 498-503.

5. Jaleel C.A., Manivannan P., Kishorekumar et al. Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit // Colloids and surfaces B: Biointerfaces. 2007. V. 59(2). P. 150-157.

6. Murphy M.E., Noack E. Nitric oxide assay using haemoglobin method // Methods Enzymol.1994. V. 233. P. 241–250.

ВЛИЯНИЕ СТЕВИОЗИДА НА ПРО- И АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ФИТОПАТОГЕНАМИ

Ю.Ю. Невмержицкая, Г.Х. Шаймуллина, О.А. Тимофеева
ФГАО ВО Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия; e-mail: nuu76@mail.ru

Одним из перспективных способов защиты растений от фитопатогенов является использование экологически безопасных физиологически активных соединений, действие которых направлено на индуцирование устойчивости и стимулирование защитных реакций растительного организма. Особый интерес в связи с этим вызывает дитерпеновый гликозид стевиозид, агликон которого стевиол долгое время считался предшественником гиббереллловой кислоты.

Известно, что инфицирование растений сопровождается усилением окислительных процессов, которые имеют большое значение для реализации защитных реакций. Образующиеся активные формы кислорода могут влиять на метаболические процессы, как растения, так и фитопатогена. Однако у устойчивых растений окислительные процессы могут компенсироваться за счет большего содержания антиоксидантов.

Цель нашей работы заключалась в выяснении влияния стевиозида на патоген-индуцированные изменения про-/антиоксидантного статуса растений яровой пшеницы.

Объектом исследования являлись корни проростков яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Омская 33. В качестве инфекционных агентов использовали *Fusarium oxysporum Schlectend.:Fr.* и сапрофитный плесневый гриб *Aspergillus niger*. Выбор фитопатогенов был обусловлен их специализацией, т.е. приуроченностью к определенному питательному субстрату – грибы рода *Fusarium spp* (*F. oxysporum, F. culmorum, F. avenaceum, F. moniliforme*) являются возбудителями корневой фузариозной гнили пшеницы, тогда как *A.niger* – это возбудитель черной плесневидной гнили лука и чеснока. Грибы были выделены из семян пшеницы, районированных для Республики Татарстан сортов и селекционных линий. Семена опытных вариантов предварительно замачивали в растворе стевиозида в концентрации

10^{-8} М. Инфицировали 7-суточные проростки спорами грибов в концентрации (1-3)•10^4 КОЕ/см3 в течение часа. Последующие образцы отбирали через 1 час, 3 часа, 6 часов и далее через каждые 24 часа в течение четырех дней. Опыты были проведены в трех биологических повторностях.

Инфицирование как неспецифическим патогеном *A.niger*, так и специфическим *F.oxysporum* повышало содержание малонового диальдегида в проростках, что свидетельствует об активации процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ), и, следовательно, развитии инфекционного процесса в растении. В варианте с *A.niger* повышение ПОЛ наблюдалось уже через час после инфицирования, и сохранялось на том же уровне еще в течение двух часов, далее наблюдалось его снижение, и на 4-е сутки после инфицирования уровень МДА достигал уровня контроля.

При инфицировании растений пшеницы патогеном *F. oxysporum* мы наблюдали 1-ый пик повышения содержания МДА через час после инфицирования и второй – через 6 часов. На 4 сутки после инфицирования уровень содержания МДА был как у контрольных растений.

Предварительная обработка семян стевиозидом заметно снижала уровень МДА в обоих вариантах. Таким образом, дитерпеновый гликозид уменьшал повреждение мембран, что может свидетельствовать о его протекторной роли при инфицировании патогенами. Возможно, этот эффект обусловлен мембраностабилизирующими свойствами стевиозида. Кроме того, было показано, что стевиозид является хорошим утилизатором таких АФК как гидроксил радикал OH и супероксидный радикал O [1].

Инфицирование как специфическим, так и неспецифическим патогенами сопровождалось значительным повышением активности цитоплазматической пероксидазы в корнях проростков через 24 часа (рис.1). При этом в проростках, зараженных *A. niger*, активность исследуемого энзима была выше в 2 раза по сравнению с вариантом *F. oxysporum*.

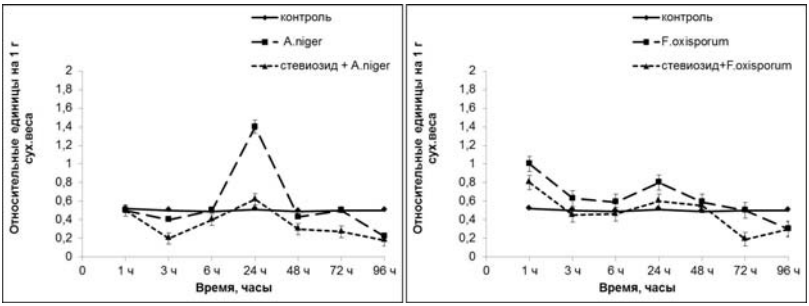


Рисунок 1. Динамика активности растворимой пероксидазы в растениях пшеницы при инфицировании *A. niger* (А) и *F.oxysporum* (Б).

Индуцирование активности пероксидазы при заражении неспецифическим патогенным грибом *A. niger*, может представлять один из ключевых защитных механизмов растений против патогена. Высокая активность пероксидаз обеспечивает инактивацию поступающих извне токсинов и других физиологически активных соединений [2]. Предварительная обработка стевиозидом (10^{-8} М) заметно уменьшала эффект обоих возбудителей фитозаболеваний на активность пероксидазы в проростках пшеницы.

Еще один фермент, задействованный в детоксикации H_2O_2 в клетке –аскорбатпероксидаза. Фермент имеет высокое сродство к субстрату и способен нейтрализовать перекись в очень низких концентрациях.

Через час после инокуляции растений суспензией спор *A. niger* активность аскорбатпероксидазы значительно повышалась, но в ходе дальнейшего эксперимента активность аскорбатпероксидазы в варианте с *A. niger* не отличалась от контрольных незараженных растений (рис. 2).

Под влиянием *F. oxysporum* активность аскорбатпероксидазы возрастала только через 48 ч после инфицирования, что может свидетельствовать о развитии инфекционного процесса в растительном организме (рис.2).

Предварительная обработка стевиозидом (10^{-8} М) заметно уменьшала эффект обоих возбудителей фитозаболеваний на активность аскорбатпероксидазы в проростках пшеницы. Можно предположить, что это служило для предотвращения утилизации перекиси водорода из клеток растения, так как H_2O_2 играет важную роль в процессе патогенеза растений.

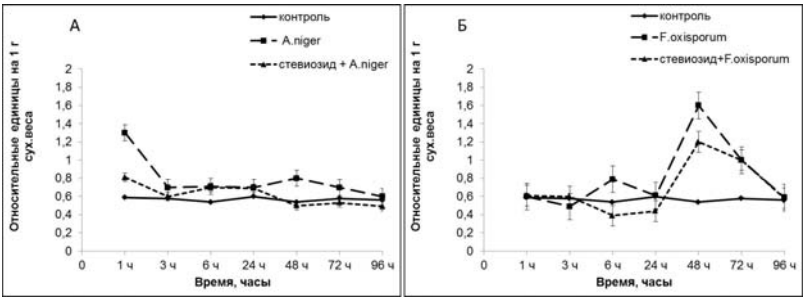


Рисунок 2. Динамика активности аскорбатпероксидазы в растениях пшеницы при инфицировании *A. niger* (А) и *F.oxysporum* (Б).

Таким образом, в результате проведенных нами исследований, мы установили, что при инфицировании *F. oxysporum* и *A. niger*, развивается сходный спектр ответных биохимических реакций. Однако, при инфицировании неспецифическим патогеном, данные процессы возникают значительно быстрее и протекают более интенсивно, в отличие от специфического. Высокая скорость защитных реакций обеспечивается распознаванием растительной клеткой патогена на самых ранних этапах их взаимодействия.

1. Stoyanova S., Genus J., Heideg E. 2011. The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress // International journal of Food Science and Nutrition 2011. V. 62. P.207-214.

2. Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И. Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным фитопатогенам. – Уфа: Изд-во «Гилем», 2006. 232 с.

ВЛИЯНИЕ ЗАСУХИ НА РЕДОКС-РЕАКЦИИ В РАСТЕНИЯХ ВИНОГРАДА

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

ФГБНУ Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, г. Краснодар, Россия; e-mail: nenko.nataliya@yandex.ru

В связи с потеплением климата на планете, на юге России отмечается ужесточение гидротермических условий в летний период, что приводит к снижению продуктивности растений, в том числе винограда [1, 2]. Экстремальное повышение температуры вызывает окислительные повреждения растений из-за индуцированного жарой дисбаланса между фотосинтезом и дыханием. Окислительный стресс – это сдвиг к преобладанию пероксидантов над антиокисдантами и их соотношение лежит в основе внутриклеточной редокс-регуляции [3].

Исследования проводили на ампелоколлекции Анапской зональной опытной станции виноградарства и виноделия на сортах винограда Кристалл (евро-амуро-американского происхождения) раннего срока созревания и Достойный и Красностоп АЗОС (евро-американского происхождения) среднего срока созревания.

Для характеристики устойчивости сортов винограда к окислительному стрессу определяли такие показатели, как содержание общей, свободной и связанной воды, пигментов, пролина, абсцизовой кислоты, малонового диальдегида, аскорбиновой кислоты в листьях винограда, а также размеры замыкающих клеток устьиц [4].

За период 2014-2016 гг. в условиях лета на территории анапо-таманской зоны отмечалось постепенное снижение количества выпавших осадков в июне на 72,3 %, в июле – на 83,3 %, в августе 2014 -2015 гг. отмечалась засуха, при этом максимальная температура воздуха в июне повысилась на 7°С, в июле – на 7°С и в августе – на 4°С, соответственно. Перегрев растений оказывает влияние на водный режим растений винограда, повышая интенсивность транспирации.

За анализируемый период в 2016 г. в сравнении с 2014 г. оводненность листьев у изучаемых сортов в июне снизилась на 0,6 – 2 %, в июле - на 0,68 – 1,85 % и в августе - на 4,39 – 11,37 %. Содержание свободной формы воды в июне у сорта Кристалл снизилось на 59,9 % и у сортов Достойный и Красностоп АЗОС – на 122,4 и 106,4 %, соответственно, что может быть связано с увеличением содержания пролина в листьях в 3,7 -5,7 раза, способствующего повышению содержания связанной формы воды в листьях.

Большую роль в терморегуляции листа имеет устьичная апертура. Закрытие устьиц снижает потерю растением способности транспортировать воду. На размер замыкающих клеток устьиц большое

влияние оказывает абсцизовая кислота - стрессовый гормон, играющий ключевую роль в механизмах устойчивости растений к абиотическим стрессорам.

Меньшее содержание АБК в листьях сортов Кристалл и Красностоп АЗОС (2,5 и 1,3 мкг/г) и большее - у сорта Достойный (4,3 мкг/г) согласуется с большим размером замыкающих клеток устьиц у первых двух сортов (26,4 и 30,3 мкм) и меньшим – у сорта Достойный (22,1 мкм) при большем содержании свободной формы воды у последнего. Следовательно, большее содержание абсцизовой кислоты в листьях сорта Достойный позволяет уменьшить размер замыкающих клеток устьиц и снизить потери воды в условиях засухи.

Однако, при уменьшении размеров устьиц и недостатке CO_2 в клетках может образовываться перекись водорода – сигнальная молекула, переносчик стрессового сигнала. Она участвует в образовании гидроксильного радикала, вызывающего окислительный стресс, который, внедряясь в липидный слой клеточных мембран, запускает реакции перекисного окисления липидов, что приводит к повреждению мембран с образованием малонового диальдегида. У сорта Кристалл содержание малонового диальдегида в листьях составляет 185 мкг/г и у сортов Достойный и Красностоп АЗОС –244 и 160 мкг/г, соответственно. Следовательно, у сортов Кристалл Красностоп АЗОС липиды мембран меньше подвержены окислительной деструкции, чем у сорта Достойный, что также характеризует сорт Достойный, как более устойчивый к окислительному стрессу.

Перекисное окисление липидов нарушает процессы фотосинтеза, что согласуется с меньшим содержанием суммы хлорофиллов (а+б) и липофильных антиоксидантов - каротиноидов у сорта Достойный.

Проявлением защитной реакции при активации перекисного окисления липидов служит увеличение содержания водорастворимого антиоксиданта - аскорбиновой кислоты, которое составило у сорта Достойный 29,9 мкг/г и у сортов Кристалл и Красностоп АЗОС – 8,3 и 6,2 мкг/г, соответственно.

Таким образом, изучаемые сорта винограда отличаются интенсивностью протекания ред-окс реакций и характеризуются различными механизмами устойчивости к окислительному стрессу в условиях засухи.

1. Егоров Е.А., Серпуховитина К.А., Петров В.С. Концепция развития виноградарства в южных регионах России // Виноделие и виноградарство, 2006.- № 4.- С. 4-7.

2. Ненько Н.И., Ильина И.А., Петров В.С. Физиолого-биохимические методы управления устойчивостью растений винограда к абиотическим и биотическим стрессорам // Виноделие и виноградарство, 2016.- № 4.- С. 51-54

3. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур.- М. : Дрофа, 2010.- 638 с.

4. Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда. Учебно-методическое пособие / Под общей редакцией Н.И. Ненько.- Краснодар: ООО Просвещение – Юг, 2015.- 115 с.

ФЕРМЕНТЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В РАЗНЫХ СЦЕНАРИЯХ КСИЛОГЕНЕЗА

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

ФГБУН Институт леса Карельского научного центра Российской академии наук, г. Петрозаводск, Россия; e-mail: knikerova@yandex.ru

Ксилогенез, или процесс формирования древесины, - это фиксация углерода в составе структурных полимеров углеводной и фенольной природы в клеточных стенках древеснеющих тканей растений, который обеспечивает образование структурных элементов ксилемы (древесины) и синтез полимерных компонентов клеточной стенки. Понимание основ ксилогенеза имеет большое значение в связи с необходимостью эффективного управления процессами образования древесины с целью повышения продуктивности древесных растений [1].

Образование древесины у некоторых древесных растений может происходить с заметными внешне отклонениями от нормы. Так, ярким представителем аномального ксилогенеза является карельская береза.

Карельская береза (*B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti) – форма березы повислой, у которой в результате отклонений в деятельности камбия формируется узорчатая древесина, которая морфологически выражена наличием большого количества паренхимных клеток из-за нарушения дифференцировки проводящих элементов ксилемы и флоэмы. Важно, что при любом варианте скрещивания родительских форм в потомстве появляются особи как с узорчатой, так и безузорчатой текстурой древесины [2].

Обнаружено, что причиной развития структурных аномалий является наличие разных путей расщепления сахарозы. В ряду деревьев карельской березы с увеличением признака узорчатости происходит снижение активности сахарозосинтазы (СС) в ксилеме, которая отвечает за формирование клеточных стенок при формировании нормальной древесины, и повышение активности апопластной инвертазы (АпИнв) во флоэме. Такая перестройка ферментов углеводного обмена является следствием паренхиматизации тканей, которая наблюдается при формировании узора [2].

Переориентация ферментов углеводного обмена при формировании узорчатости влечет за собой изменение активности ферментов антиоксидантной системы – пероксидазы (ПОД) и каталазы (КАТ) – путем цепочки метаболических реакций. Было обнаружено, что в период активного камбиального роста в ряду растений карельской березы с разной степенью узорчатости активность ПОД возрастает, что коррелирует с возрастанием активности АпИнв. [3]. Причиной данной корреляции является образование избытка гексоз, который появляется при расщеплении сахарозы по апопластному пути. Гексозы, вовлекаясь в Цикл Кребса и пентозофосфатный путь, дают начало реакциям образования АФК [4] и синтезу веществ фенольной природы. Глюкоза самостоятельно может взаимодействовать с АФК и образовывать субстраты пероксидазного окисления [5]. Таким образом, значительно более высокая активность ПОД у узорчатых растений, по сравнению с безузорчатыми, весьма закономерна. Более того, полученные данные по закономерностям активности ПОД делают возможным ее использование для диагностики признака узорчатости [6]. При изучении активности КАТ также обнаружено, что активность фермента в ряду увеличения признака узорчатости возрастает (неопубликованные данные).

Интересно, что изучение ферментов антиоксидантной системы в сезонной динамике у узорчатой и безузорчатой форм карельской березы выявило некоторые особенности в ферментативных моделях поведения ПОД и КАТ. Показано, что активность ПОД достоверно более высокая у узорчатых растений карельской березы на протяжении всего сезона, по сравнению с безузорчатыми, в тканях ксилемы (p = 0.0007) и флоэмы (p = 0.00000000006).

КАТ, наоборот, имела более высокие значения у безузорчатых растений карельской березы по сравнению с узорчатыми. Особенно эта разница заметна на примере тканей флоэмы, где эти отличия значимы в течение всего сезона (p = 0.003). У безузорчатых растений формирование нормальной древесины сопряжено с активными ростовыми процессами. Активизация работы меристем связана с увеличением уровня дыхания, затрат энергии на метаболизм, которые сопровождаются высокой каталазной активностью, которая может служить показателем формирования новых жизнеспособных органов и тканей. Кроме того, высокие концентрации перекиси водорода токсичны для клеток паренхимы [7] и могут ингибировать белок фермента КАТ. Учитывая эти факты, становится понятным, почему в нейтрализации избытков перекиси у узорчатых растений преобладает роль ПОД, а у безузорчатых – КАТ. Можно отметить и компенсаторную роль ПОД и КАТ, что не редко встречается у разных растений [7], [8].

Таким образом, различный способ утилизации сахарозы у узорчатых и безузорчатых деревьев карельской березы, лежащий в основе проявления структурных аномалий ствола и выраженный внешне наличием признаков узорчатости, сказывается и на механизме утилизации перекиси водорода, что отражается в разных стратегиях поведения ПОД и КАТ.

Отметим, что биохимические и молекулярные различия начинают формироваться уже на самых ранних этапах онтогенеза, даже у сеянцев в возрасте нескольких месяцев, это биохимически выражено в разной активности ферментов углеводного обмена и, как следствие, ферментов антиоксидантной системы [9], [10].

Исследование причин формирования узорчатости необходимо осуществлять на самых разных уровнях (биохимический, молекулярно-генетический, анатомический) и на разных этапах онтогенеза, так

как эти исследования могут стать хорошей основой для обнаружения механизмов управления аномальным ксилогенезом.

1. Никишов В.Д. Комплексное использование древесины. - Москва: Лесная промышленность, 1985. 264 с.

2. Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Никерова К.М. Избыток экзогенных нитратов подавляет формирование аномальной древесины у карельской березы // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 2. С. 83–91. doi:10.7868/S047514501602004X.

3. Галибина Н.А., Мошкина Е.В., Никерова К.М., Мощенская Ю.Л., Знаменский С.Р. Активность пероксидазы как индикатор степени узорчатости древесины карельской березы // Лесоведение. 2016. № 4. С. 294–304.

4. Couee I., Sulmon C., Gouesbet G., Amrani El A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. № 3. P. 449–459. doi: 10.1093/jxb/erj027.

5. Синькевич М.С., Дерябин А.Н., Трунова Т.И. Особенности окислительного стресса у растений картофеля с измененным углеводным метаболизмом // Физиология растений. 2005. Т. 56. № 2. С. 186–192.

6. Способ диагностики узорчатой текстуры древесины карельской березы: Патент 2596013 Российской Федерации. № 2015114510/13; заявл. 17.04.2015; опубл. 27.08.2016. Бюл. № 24. 4 с.

7. Fernández-García N., Carvajal M., Olmos E. Graft union formation in tomato plants. Peroxidase and catalase involvement // Ann. Bot. 2004. V. 93. № 1. P. 53–60. doi: 10.1093/aob/mch014.

8. Chen Y., Zhang M., Chen T., Zhang Y., An L. The relationship between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of Sabina // S. Afr. J. Bot. 2006. V. 72. № 2. P. 272–279. doi: 10.1016/j.sajb.2005.09.004.

9. Никерова К.М., Галибина Н.А., Мощенская Ю.Л., Новицкая Л.Л., Подгорная М.Н., Софронова И.Н. Каталазная активность в листовом аппарате у сеянцев березы повислой разных форм (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* и var. *carelica* (Mercklin) // Труды КарНЦ РАН. 2016. Серия: Экспериментальная биология. № 11. С. 68–77. doi: 10.17076/eb460.

10. Мощенская Ю.Л., Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Никерова К.М. Активность ферментов диссимиляции сахарозы в раннем онтогенезе разных форм березы повислой // Труды КарНЦ РАН. 2016. Серия: Экспериментальная биология. № 11. С. 78–87. doi: 10.17076/eb461.

РЕДОКС РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА У РАСТЕНИЙ

Г.В. Новикова, К.С. Миронов, А.В. Носов, А.А. Фоменков

ФБГУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия; e-mail: gv.novikova@mail.ru

При окислительном стрессе в клетках происходят периодические изменения редокс состояния, результатом которых является, в том числе, переход клеток от состояния покоя к делению. В отсутствие редокс контроля клеточный цикл может останавливаться, что ведёт к аберрантной пролиферации, характерной для многих серьёзных патологий.

Существует представление, что в клетках высших эукариот активные формы кислорода (АФК) и активные формы азота (АФА) способны регулировать деление клеток. Реализация этих событий зависит от типа и количества образующихся АФК/АФА, места из генерации, продолжительности образования, а также эффективности работы систем внутриклеточной антиоксидантной защиты. Таким образом, признаётся, что АФК/АФА – сигнальные молекулы, работа которых может определять пролиферацию, дифференцировку и/или клеточную смерть.

Индуцировать образование АФК/АФА в клетках и животных, и растений могут, в широком смысле, регуляторы роста и развития, включая, гормоны/фитогормоны. В этом случае связывание гормона/фитогормона с его рецептором ведёт к существенному росту уровня АФК/АФА, которые работают как вторичные посредники, влияющие на функционирование пути передачи сигнала, воспринятого рецептором.

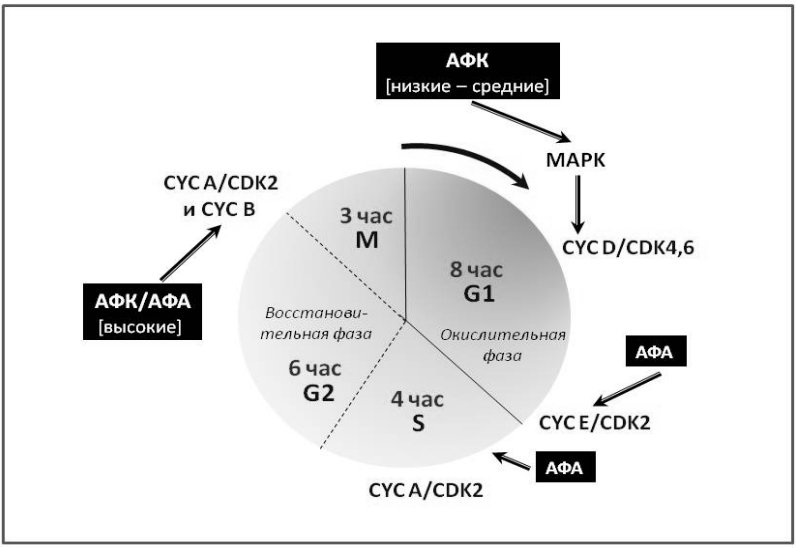
Увеличение продукции АФК/АФА может происходить и в ответ

на внеклеточные сигналы, как биотической, так и абиотической природы. В этом случае наблюдаются изменения активности соответствующих ферментов и метаболизма, и – как результат – инициируется работа дополнительных путей передачи сигналов, отличающихся от лиганд-инициируемых.

АФК/АФА могут напрямую активировать Сер/Тре/Тир протеинкиназы. Такой вариант работы АФК/АФА получил название «трансактивация», которая включает лиганд-независимую стимуляцию рецептора. Следовательно, редокс механизм – одна из важнейших составляющих молекулярного механизма, обеспечивающего энзиматическую активацию внутриклеточных событий, которые могут инициироваться как гормонами, так и другими сигналами.

Важнейшее положение в регуляции клеточного цикла занимают модули МАРК, функционирование которых, как правило, ведёт к усилению опознанного рецепторами сигнала. Между тем, сами МАРК чувствительны к действию АФК/АФА, что отражается на их способности фосфорилировать факторы транскрипции, обеспечивающие экспрессию белков, работа которых определяет успешное осуществление клеточного цикла и/или пролиферации. Поскольку белки-контролёры клеточного цикла, а именно: циклины (CYC), циклин-зависимые протеинкиназы (CDK), белки ретинобластомы (Rb), ингибиторы циклин-зависимых протеинкиназ (CKI), – могут быть мишенями МАРК, то работа МАРК диктует вклад АФК/АФА в работу машины клеточного деления. Следовательно, клеточный цикл – заключительный этап работы сигнальных путей, обеспечивающих судьбу клеток: либо их пролиферацию и рост, либо терминальную дифференцировку, старение и гибель.

Все фазы клеточного цикла (G0, G1, S, G2 и M) подвергаются действию внеклеточных сигналов, которые, в свою очередь, регулируют белки, которые регулируют и контролируют рост клеток и их пролиферацию. В каждой фазе клеточного цикла специфические циклины (см. рисунок) образуют комплексы и активируют циклин-зависимые протеинкиназы, которые приобретают способность фосфорилировать свои белки-мишени, что ведёт к активации мишени или ингибированию её работы.



Отсюда понятно, что экспрессия циклинов – ключевое событие для осуществления клеточного цикла, а пост-трасляционная модификация факторов транскрипции, отвечающих за активацию экспрессии циклинов, должна происходить так, чтобы экспрессия циклинов регулировалась соответствующим образом.

Действительно, МАРК (см. рисунок) индуцируют экспрессию CYCD, который активирует CDK4 и CDK6, формируя комплекс CYCD/CDK4,6, фосфорилирующий Rb, что ведёт к образованию комплекса CYCE/CDK2. Фосфорилирование, осуществляемое этим комплексом в G1, способствует образованию комплекса CYCA/CDK2, что ускоряет выход в S-фазу (синтез ДНК). Изменение редокс состояния клеток, например, в случае снижения уровня глутатиона ведёт к замедлению G1–S перехода и остановке клеток в фазе G2. В зависимости от концентрации АФК могут снижать активность CYCE/CDK2, что замедляет выход клеток в S-фазу, а снижение активности комплекса CYCB/CDK1 влияет на эффективность G1–G2 перехода. Это событие связано с инактивацией фосфатазы Cdc25, которую фосфорилирует протеинкиназа Chk-1 (Checkpoint-activated kinase1).

Комплекс CYCB/CDK1 вместе с CYCA/CDK1 регулирует G2–M переход. В активированном состоянии CYCB/CDK1 способствует митозу (M). Ингибитор CDK CKI p16 блокирует G1 посредством

снижения активности CYCD/CDK4,6, что предотвращает фосфорилирование Rb. Ингибитор CDK CKI p21 индуцируется АФА, что ведёт в зависимости от типа клеток либо к снижению активности CYCE/CDK2 и выходу клеток в G0, либо к остановке клеток в G1.

Активные формы азота подавляют активность рибонуклеотидредуктазы, которая необходима для синтеза ДНК, что также задерживает клетки в G1. Отсюда понятно, что работа АФА в регуляции клеточного цикла направлена, скорее, на изменение активности CKI.

Возвращаясь к МАРК заметим, что низкие и средние концентрации АФК/АФА индуцируют работу МАРК. Это ведёт к усилению пролиферации, тогда как при высоких концентрациях АФК/АФА наблюдаются повреждения в ДНК, а в результате работы МАРК индуцируется экспрессия ингибиторов клеточного цикла. Следствие этих событий – нарушения сбалансированного функционирования клеточного цикла, что, в конечном счёте, может привести к старению и гибели клеток.

Таким образом, при окислительном стрессе в делящихся клетках АФК/АФА при помощи разных механизмов могут контролироваться события, происходящие как на границах перехода из одной в другую фазу клеточного цикла, так и на протяжении, собственно, фаз клеточного цикла. Функционирование этих механизмов либо блокирует, либо восстанавливает повреждения, вызванные АФК/АФА, обеспечивая поддержание генетической стабильности. Элементами таких механизмов могут быть ферменты антиоксидантной защиты (СОД, каталаза, глутатионредуктаза), антиоксиданты, ферменты репарации ДНК. Тем не менее, высокие неконтролируемые уровни АФК/АФА могут серьёзно повреждать клеточные функции, вызывая повреждения ДНК и работы путей передачи сигналов, что ведёт к хроническим нарушениям клеточного деления, а в целом – нормального функционирования клеток. Следовательно, умея манипулировать редокс состоянием эукариотического организма, можно снизить негативные последствия влияния стрессоров, которые являются причиной нарушения пролиферации.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-00834 для А.А. Фоменкова) и Российского научного фонда (грант № 14-24-00020 для Г.В. Новиковой и К.С. Миронова).

УЧАСТИЕ РЕДОКС-ПРОЦЕССОВ В СТАРЕНИИ ЛЕПЕСТКОВ И ВРЕМЯ ЖИЗНИ ЦВЕТОВ В ВАЗЕ

О.Ф. Панфилова, Н.В. Пильщикова

ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва, Россия; e-mail: panfilova.of@yandex.ru

Активные формы кислорода (АФК) играют ключевую роль в регуляции многих процессов развития, в том числе старения, и в реакциях растений на стрессовые воздействия. Вместе с тем генерация АФК может быть причиной повреждения мембранных структур и преждевременной гибели клеток. До сих пор остается открытым вопрос, как складывается баланс между образованием АФК с его сигнальной ролью и функционированием антиоксидантных систем, представленных антиоксидантными ферментами и защитными веществами. Старение часто рассматривается как дегенеративный процесс. Однако, это часть генетической программы развития, при которой активируется синтез многих ферментов, что обеспечивает синхронизацию старения с ремобилизацией питательных веществ. В связи с этим на заключительном этапе развитии органов растения необходимо четко выделять регулируемый процесс старения, который требует живых клеток, и необратимую терминальную фазу запрограммированной клеточной гибели. Хотя эти два процесса могут идти одновременно в разных клетках одного органа.

Наиболее изучено старение листа как основного органа, обеспечивающего продукционный процесс растения. В стареющем листе снижается содержание хлорофилла, теряется способность к фотосинтезу и усиливаются гидролитические процессы, обеспечивающие отток сахаров, аминокислот, ионов и других соединений в более молодые органы. Усиление генерации хлоропластами АФК, согласованное с изменениями в гормональном комплексе, активирует большое количество генов [1]. Лепестки цветков имеют листовое происхождение, их старение также сопровождается реутилизацией питательных веществ. Поэтому можно ожидать общность механизмов старения. Тем не менее, листья и лепестки выполняют разные функции, отличаются по продолжительности жизни, характеру развития и зависи-

мости от внешних условий. Уже тот факт, что на ранних стадиях развития и окрашивания лепестка происходит деградация хлоропластов, а в листьях этот процесс сопровождает старение, может свидетельствовать о различиях в сигнальных системах и регуляции генов в процессе старения этих органов. Опыление является основным триггером, регулирующим гибель околоцветника. У многих видов растений его влияние опосредовано этиленом, который первоначально образуется в гинецее и вызывает автокаталитический синтез этилена в лепестках, приводящий к их завяданию.

Целью настоящей работы явилось изучение динамики и регуляции утраты декоративных качеств срезки альстромерии (*Alstroemeria L.)* сортов Virginia, Cosmo, Tornado, Granada и Nadya, окраска лепестков которых связана с наличием флавоноидов. Исследования проводили в осенне-зимний период 2014-2016 годов на облиственных цветущих побегах в лаборатории с естественным рассеянным светом при температуре воздуха 18-20°С. Выделено 7 стадий развития цветка. Первая стадия соответствует плотному бутону с пигментацией внешнего кольца околоцветника, 3 и 4 - открыванию пыльников внешнего и внутреннего колец при полном открытии околоцветника, 7 – осыпанию лепестков. Показатели водного обмена, активности антиоксидантных ферментов и состояния мембран определяли общепринятыми методами [2]. Повторность в опытах – 5-ти кратная.

Опадение околоцветника определяет функциональную жизнь цветка. У альстромерии развитие цветка от стадии плотного бутона до опадения околоцветника проходит примерно за 12 дней. При этом, чем длительнее лепестки не опадают, тем больше возможность для реутилизации веществ. К началу завядания лепестков сырая масса уменьшалась до 41%, а сухая – до 70% от максимальной величины на стадии полностью открытого цветка. Старение лепестков не является следствием постепенного использования ресурсов и истощения клеток. Установлено, что видимым признакам старения предшествуют изменения активности антиоксидантных систем клетки и стабильности мембран [3]. Проведенное нами изучение параметров водного обмена листа, активности антиоксидантных ферментов и стабильности мембран показало, что ключевые события старения лепестков происходят на 4-5 стадиях. Активность пероксидазы по мере развития цветка постепенно возрастала и снижалась после полного рас-

крытия цветка. Ее максимальное значение, превосходящее в 1,5-2 раза уровень состояния бутона, было на 4 этапе развития цветка. Активность каталазы постепенно снижалась от 2 до 6 стадий развития цветка. Индекс стабильности мембран сохранялся на уровне 82% на ранних стадиях развития цветка, на 5 стадии наблюдалось его падение до 42%. Представляют несомненный интерес работы по изучению мест генерации АФК при старении лепестков. Показана высокая активность пероксисом и участие цитозоля в редокс-процессах стареющих лепестков гвоздики [5].

На 4-5 стадиях развития цветка наблюдалось явное усиление окраски лепестков, связанное с накоплением и переводом в активную форму полифенолов, которые включают в себя более 10 000 соединений и являются одними из самых важных природных антиоксидантов. Это своеобразная защита цветка в наиболее ответственный период жизни, связанный с оплодотворением и формированием зародыша. Дальнейшие исследования должны показать происходит ли в это время новообразование антиоксидантов или активируется имеющийся пул. Вторая фаза старения связана с серьезными нарушениями в регуляции окислительно-восстановительных процессов, утратой пигментации, появлением прозрачных пятен, размеры которых быстро увеличиваются. Это может свидетельствовать о нарушении тонопласта и вакуолей клеток, содержащих пигменты. Ранее было показано, что сульфосалицилова кислота и бензоат натрия в вазовом растворе задерживали старение цветков на 3-5 дней. Это, вероятно, связано с блокированием АФК и перекисного окисления липидов, что могло обеспечить лучшее сохранение мембранных структур клетки. В опытах с использованием ингибиторов действия этилена показано, что у альстремерии, в отличие от гвоздики, этилен не является основным триггером включения программы, но участвует в координации процессов старения и финальной стадии осыпания лепестков [4]. В литературе есть данные о том, что сигналы АФК предшествуют изменению гормонального статуса растений [5, 6].

Дальнейшие исследования с использованием физиологических, биохимических и генетических подходов должны дать более четкую картину старения и его регуляции. Изучение роли АФК и антиоксидантных систем необходимо для оценки общих и различающихся сигнальных путей в разных органах растения, что поможет лучше

понимать и управлять физиологическими процессами. Это имеет большое значение для решения практических проблем послеуборочной физиологии растений, в том числе сохранения и продления жизни цветов в вазе.

1. Кошкин Е.И. Адрианов В.Н., Панфилова О.Ф., Пильщикова Н.В. Физиологические основы качества продукции цветоводства – М.: РГАУ-МСХА, 2012, 295 с.

2. Панфилова О.Ф. Пильщикова Н.В., Фаттахова Н.К. Практикум по физиологии растений – М.: РГАУ-МСХА, 2010. 110 с.

3. Панфилова О.Ф., Пильщикова Н.В. Жизнь в вазе срезанных цветов гвоздики садовой и альстромерии //Научные труды Субтропическое и декоративное садоводство. – Сочи: ВНИИЦиСК. 2014. Вып. 51. С. 248-255.

4. Пильщикова Н.В., Панфилова О.Ф. Чувствительность к этилену и регуляция старения лепестков гвоздики и альстромерии. //Доклады ТСХА. 2016. Вып. 288. Часть I. С. 68-72.

5. Cavaiuolo M., Cocetta G., Ferrante A. The Antioxidants Changes in Ornamental Flowers during Development and Senescence //Antioxidants (Basel). 2013. Vol. 2(3). P. 132-155.

6. Rogers H., Munne-Bosch S. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species and Redox Signaling during Leaf and Flower Senescence: Similar but Different //Plant Physiol. 2016. Vol. 171(3). P. 1560–1568.

ХЕЛАТНЫЕ МИКРОУДОБРЕНИЯ С АНТИОКСИДАНТНЫМ ЭФФЕКТОМ

В.М. Пахомова[1], А.И. Даминова[1], И.А. Гайсин[2]

[1] ФГБОУ ВО Казанский государственный аграрный университет, г. Казань, Россия; e-mail: pahomovav@mail.ru

[2] ФГБНУ Татарский НИИ агрохимии и почвоведения, г. Казань, Россия

Нами разработаны технологии получения новых жидких хелатных форм микроудобрений марки ЖУСС, содержащие одно-, двойные и тройные сочетания различных микроэлементов. Такие сочета-

ния микроэлементов подобраны из числа наиболее дефицитных для данной культуры в конкретных почвенных условиях (в условиях конкретного поля), т.е. на основе принципов точного земледелия и учета действия «Закона минимума». В качестве лигандов данных микроудобрений использованы моноэтаноламин и одновременно лимонная кислота и моноэтаноламин. Ценность этих препаратов определяется рядом свойств: они устойчивы в широком диапазоне значений pH, достаточно хорошо растворимы в воде и обладают хорошими адгезионными свойствами; практически нефитотоксичны; в меньшей степени, чем ионы микроэлементов, сорбируются почвой, что позволяет им длительное время удерживаться на обрабатываемой поверхности; хорошо совместимы с пестицидами. В настоящее время ЖУССы включают 15 различных комбинаций питательных элементов, и все они вошли в «Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации» (рег. № 19-8002 (9333) – 0309 – 1). Широкомасштабные испытания данных препаратов, пригодных для разнопланового применения, показали высокую эффективность их применения не только в почвенно-климатических условиях Республики Татарстан, но и в различных регионах России, Украины, Туркменистана, Белоруссии и т.д. Применение ЖУСС в полевых условиях обеспечивает возрастание симбиотического потенциала бобовых культур, фотосинтетической деятельности и устойчивости различных сельскохозяйственных растений, всхожести семян, снижение пестицидной нагрузки в севооборотах за счет активизации защитных ферментов растений и проявления фунгистатического действия, запуска активных и пассивных форм иммунитета к различным инфекционным заболеваниям, повышение количественных и качественных характеристик урожая, в том числе антимутационного потенциала, а также использования почвенных элементов питания и, в итоге, чистого дохода. Результаты получены в полевых опытах на различных культурах разных сортов (озимая рожь и пшеница, яровая пшеница, ячмень и кукуруза, горох, тарелочная чечевица, клевер луговой, яровая вика, вико-овсяная смесь, картофель, сахарная и столовая свекла, подсолнечник, яровой рапс, томаты и огурцы защищенного грунта, хмель, женьшень, расторопша, лендолгунец и др.). Лучшими способами применения этих микроудобрений являются инкрустация семян, клубней, посадочных материалов и

некорневые подкормки, а так же внесение с поливной водой при капельном орошении. Для каждого способа применения и для каждой культуры разработаны оптимальные дозы воздействия микроудобрений [1].

Изучение физиолого-биохимических механизмов действия данных микроудобрений показало, что они являются полифункциональными составами, проявляющими ростстимулирующее, адаптогенное, мембраностабилизирующее, регуляторное, протекторное, антимутагенное действие и последействие. Показано, что в основе этих эффектов лежит их антиоксидантное действие.

Изучение в полевых опытах в разные годы исследований показало снижение содержания малонового диальдегида (МДА) в листьях растений яровой пшеницы при одно-, двух и трехкратной обработке медь, молибденсодержащим микроудобрением ЖУСС-2 (0,1 % раствор) в фазы кущения, выхода в трубку и колошения – цветения. Данные полевых экспериментов подтверждены модельными опытами. Эффект снижения образования МДА в полевых опытах наблюдался, по крайней мере, в течение 4 суток после обработки. В модельном опыте обработка 6-дневных проростков пшеницы ЖУСС-2 (расход препарата аналогичен расходу в полевом опыте) приводила к снижению образования супероксиданионрадикала (показания снимали через сутки после опрыскивания). Обработка растений ЖУСС-2 во всех трех опытных вариантах полевого опыта приводила к росту активности супероксиддисмутазы (СОД) в листьях. Добавление в среду инкубации 1 мМ диэтилдитиокарбомата натрия (ДДК) сопровождалось значительным снижением активности СОД, что свидетельствует об ее активировании экзогенной медью, поскольку этот ингибитор действует на медьсодержащие ферменты.

Известно, что утилизация образующегося в ходе работы СОД пероксида осуществляется комплексом ферментов: каталазой, семейством пероксидаз и др. Поэтому в наших экспериментах одновременно с увеличением активности СОД наблюдалась и активизация пероксидазы листьев растений пшеницы в посеве во всех изучаемых вариантах. В модельном эксперименте после обработки растений ЖУСС-2 наблюдалось снижение содержания в корнях проростков одной из активных форм кислорода (АФК) перекиси водорода и активизация каталазы.

Антиоксидантное действие обработки ЖУСС-2 имеет пролонгированный эффект (последействие). Для изучения этого эффекта исследовали семена и растения, выросшие из семян пшеницы, созревшие на растениях после обработки ЖУСС-2 различной кратности. Установлено, что последействие ЖУСС-2 приводило к снижению образования МДА в клетках корней проростков яровой пшеницы в модельном эксперименте, а следовательно к снижению перекисного окисления липидов (ПОЛ). Известно, что ПОЛ может быть вызвано АФК. Как известно, основную роль в снижении АФК играют ферменты антиоксидантной (АО-) защиты, одним из которых является СОД. Нами установлено, что последействие ЖУСС-2 приводило к росту активности СОД листьев пшеницы в полевом эксперименте. Добавление в среду инкубации ДДК сопровождалось снижением ее активности. Активизация СОД, по всей вероятности, связана с кумулятивным эффектом меди в семенах пшеницы. Нами показано, что содержание меди в зерне пшеницы и в надземных органах увеличивалось после всех трех обработок в полевом опыте, но не превышало ПДК.

Активизация СОД листьев растений яровой пшеницы наблюдалась при обработке вегетирующих растений хелатными микроудобрениями марки ЖУСС, содержащими не только медь, но также цинк, железо и марганец, поскольку известны разные металлсодержащие формы этого защитного фермента. При действии железосодержащего микроудобрения марки ЖУСС имело место возрастание активности также железосодержащих протекторных ферментов каталазы и пероксидазы.

Таким образом, для повышения устойчивости сельскохозяйственных культур очевидна необходимость обработки вегетирующих растений микроудобрениями, содержащими медь, цинк, железо и марганец, особенно в стрессовых условиях произрастания при подавлении поглотительной активности корней.

1. Гайсин И.А., Пахомова В.М. Полифункциональные хелатные микроудобрения: практика применения и механизм действия. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2016. 316 с.

СВЯЗАНА ЛИ РЕДОКС-МОДУЛЯЦИЯ ОСМОТИЧЕСКОЙ ВОДНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ПЛАЗМАЛЕММЫ С ИЗМЕНЕНИЕМ РЕДОКС-СТАТУСА PIP-АКВАПОРИНОВ?

М.С. Пиотровский, Н.К. Лапшин, М.С. Трофимова

ФБГУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия; e-mail: agro-ministr@yandex.ru

Результаты проведенных нами ранее исследований показали, что водная проницаемость плазмалеммы чувствительна к изменению редокс-условий ее окружения [1]. Получение плазматических мембран в присутствии окислителей (диамид) или восстановителей (дитиотреитол) тиоловых групп приводило к смещению в белках изолированных мембран соотношения между содержанием окисленных и восстановленных SH-групп, а также сопровождалось изменением коэффициента осмотической водной проницаемости плазмалеммы. При увеличении доли восстановленных цистеинов в мембранных белках эта величина снижалась, что указывает на уменьшение водной проницаемости плазмалеммы, окисление приводило к противоположному результату. Было высказано предположение, что мишенями эндогенных систем редокс-регуляции могут выступать цистеин-содержащие белки плазмалеммы, в том числе, PIP-аквапорины. Известно, что аквапорины PIP1 и PIP2 семейств растений содержат по 4 консервативных цистеина. Согласно данным рентгеноструктурного анализа и симуляции пространственной организации молекул PIP2-аквапоринов шпината и кукурузы один цистеин локализован в петле A, обращенной в апопласт, второй – на границе второго трансмембранного домена и цитозольной петли B, два остальных – в третьем трансмембранном сегменте [2, 3]. Показано также, что только цистеины петли A способны и участвуют в образовании гомо- или гетеродимеров PIP-аквапоринов через переход тиол–дисульфид. Тем не менее, димеризация аквапоринов не является причиной редокс-модуляции осмотической водной проницаемости плазмалеммы [1, 2]. Таким образом, нельзя исключить возможность того, что в основе редокс-модуляции водной проницаемости плазмалеммы может лежать обратимое окисление какого-либо из трех цистеиновых остатков, локализованных внутри молекулы PIP-аквапоринов.

Для проверки этого предположения был использован метод кросс-сшивки доступных тиоловых групп белков плазмалеммы ПЭГ-малеимидом (5 кДа) с последующей иммунодетекцией и регистрацией сдвига молекулярной массы PIP-аквапоринов [4]. Сдвиг молекулярной массы регистрировали вестерн-блот анализом с первичными консервативными антителами против PIP-аквапоринов. Для этого контрольную и обработанную диамидом плазмалемму, а также, мембраны, предварительно солюбилизированные в присутствии SDS – ионного денатурирующего белки детергента или додецилмальтозида – неионного детергента, сохраняющего белок-белковые связи, инкубировали с ПЭГ-малеимидом. Реакцию останавливали внесением денатурирующего буфера с дитиотреитолом и проводили SDS-PAGE электрофорез. Анализ блотов показал, что только после денатурации у PIP-аквапоринов плазмалеммы как контрольного варианта, так и с измененным содержанием тиоловых групп, высвобождается восстановленный цистеин, способный связываться с ПЭГ-малеимидом. Сдвиг молекулярной массы строго на 5 кДа указывает на то, что кросс-сшивке в денатурирующих условиях подвергается единичный цистеин молекулы PIP-аквапоринов. Аналогичные результаты, полученные как с дитиотреитолом, так и с диамидом, позволяют исключить окисление тиоловых групп PIP-аквапоринов как причину изменения осмотической водной проницаемости плазмалеммы.

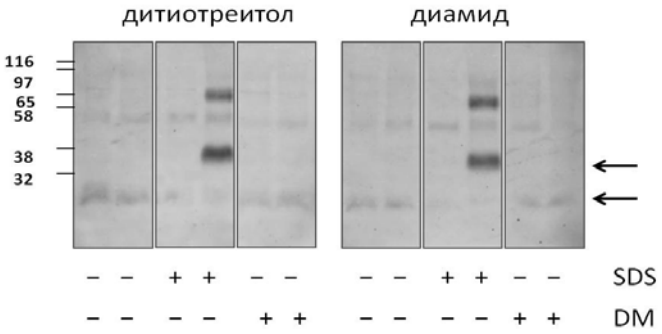


Рисунок. Иммунодетекция PIP-аквапоринов в плазмалемме этиолированных побегов гороха, полученной с дитиотреитолом или диамидом. Исходную или солюбилизированную в присутствии SDS или додецилмальтозида (DM) плазмалемму инкубировали в присутствии ПЭГ-малеимида (5 кДа) в течение 0 или 30 мин для каждого варианта. Реакцию останавливали внесением буфера Laemmli. Стрелками обозначен сдвиг молекулярной массы мономера.

Таким образом, модуляция осмотической водной проницаемости плазмалеммы, связанная с редокс-статусом мембранных белков, может быть обусловлена другими посттрансляционными модификациями в молекуле PIP-аквапоринов.

1. Ампилогова Я.Н., Жесткова И.М., Трофимова М.С. Редокс-модуляция осмотической водной проницаемости плазмалеммы, изолированной из корней и стеблей проростков гороха // Физиология растений. 2006. Т. 53. С..703−710.

2. Bienert G.P., Cavez D., Besserer A. et al. A conserved cysteine residue is involved in disulfide bond formation between plant plasma membrane aquaporin monomers // Biochem. J. 2012. Vol. 445. P..101−111.

3. Frick A., Jarva M., Ekvall M. et al. Mercury increases water permeability of plant aquaporin through a non-cysteine-related mechanism // Biochem. J. 2013. Vol. 454. P.491−499.

4. Makmura L., Hamman M., Areopagita A. et al. Development of a sensitive assay to detect reversibly oxidized protein cysteine sulfhydryl groups // Antioxid. Redox Signal. 2001. Vol. 3. P. 1105−1118.

РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЗАЩИТЕ ПШЕНИЦЫ С ЧУЖЕРОДНЫМИ ГЕНАМИ ОТ БИОТРОФНОГО РЖАВЧИННОГО ГРИБА *Puccinia triticina* ERIKSS.

Л.Я. Плотникова, В.Е. Пожерукова

ФГБОУ ВО Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, г. Омск, Россия; e-mail: lplotnikova2010@yandex.ru

Бурая ржавчина – одно из наиболее распространенных и экономически значимых заболеваний пшеницы. Возбудителем болезни является биотрофный гриб *Puccinia triticina* Erikss., отличающийся высокой пластичностью и быстрыми микроэволюционными процессами в популяциях, приводящими к регулярному преодолению генов устойчивости хозяина. Для защиты от болезни в сорта вводят гены устойчивости, преимущественно от родственных видов злаков. Большая часть идентифицированных *Lr*-генов, эффективных в различных странах и регионах России, была интрогрессирована из отдаленных видов, имеющих геномы, отличающиеся от пшеничных. Известные

гены *Lr19*, *Lr24*, *Lr38* были перенесены от видов родов *Agropyron*, а *Lr9*, *Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr37* – от *Aegilops* [1]. Часть из них проявляется на стадии проростков (*Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr28*, *Lr36*, *Lr38*), а другие определяют возрастную устойчивость (*Lr35*, *Lr37*). При заражении авирулентными изолятами линии яровой мягкой пшеницы сорта Тэтчер (Тс) с проростковыми генами были иммунны. Линии с возрастными генами TcLr35 и TcLr37 показали количественную устойчивость, что проявлялось в снижении числа пустул гриба при восприимчивом типе реакции растений, при этом резистентность повышалась с возрастом.

Для определения значения активных форм кислорода (АФК) в устойчивости интрогрессивных линий изучена динамика накопления супероксид-аниона $O_2^{\bullet-}$ и перекиси водорода H_2O_2 в тканях растений в ходе патогенеза на стадиях проростков, выхода в трубку и колошения. Результаты исследований показали различный характер генерации АФК в линиях. На линиях с проростковыми генами *Lr9*, *Lr19*, *Lr28*, *Lr36* и *Lr38* отмечена кратковременная генерация $O_2^{\bullet-}$ через 0,5 сут после инокуляции, позже АФК не накапливались. В линии TcLr24 не обнаруживалась генерация $O_2^{\bullet-}$, но установлено накопление H_2O_2 через 2-5 сут после инокуляции. С возрастом на растениях с проростковым генами реакции качественно не изменялись, но интенсивность накопления АФК снижалась на 10-20%. У линий с возрастными генами отмечена другая динамика генерации АФК. У линии TcLr35 отмечены слабые пики генерации $O_2^{\bullet-}$ через 0,5 сут после инокуляции на всех стадиях развития растений, а у TcLr37 такой пик проявлялся только на стадии кущения и усиливался с возрастом. На линиях TcLr35 и TcLr37 отмечено накопление H_2O_2 на поздних этапах патогенеза, предшествующее образованию пустул.

Для выявления причин различных биохимических реакций линий были проведены цитологические исследования развития патогена и локализации АФК в листьях с помощью специфических красителей на $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 (нитросинего тетразолия и 3,3'-диаминобензидина соответственно). Установлено, что в растениях всех линий генерацию $O_2^{\bullet-}$ индуцировал контакт аппрессориев гриба с устьицами, причем на листьях TcLr37 такой эффект проявлялся начиная с кущения и усиливался по мере взросления растений. В тканях TcLr24 накопление H_2O_2 совпадало с развитием реакции СВЧ, вслед за которой

гриб отмирал. Накопление H_2O_2 на поздних стадиях болезни в листьях растений с генами возрастной устойчивости коррелировало с лигнификацией и сокращением спорогенеза гриба. Кроме того, на всех линиях отмечено подавление образования аппрессориев, что приводило к отмиранию значительной доли инокулюма (от 20 до 60%) на поверхности листа до окислительного взрыва. Такие проявления несовместимости характерны для растений-нехозяев, а также для генов возрастной устойчивости к бурой ржавчине [2, 3]. На примере взаимодействия устойчивой к ржавчине пшеницы Тимофеева с популяцией *P. triticina*, включающей клоны с различной степенью совместимости, показано, что в разных участках листьев могут генерироваться разные АФК, в зависимости от клона и патогенеза [4].

В настоящее время на основании исследования коллекции мутантов модельного вида *Arabidopsis thaliana* сформулировано мнение о том, что устойчивость видов-нехозяев контролирует система генов *PTI*, направленная на узнавание консервативных молекул, а хозяев – система *ETI* (effector-triggered immunity), определяющая специфические эффекторы патогенов. Причем предполагается, что в сортах *PTI*-система не проявляется, а устойчивость нехозяев к отдельным патогенам могут определять обе системы [5]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что защитные реакции, характерные для растений-нехозяев, могут проявляться у растений пшеницы с единичными генами устойчивости, интрогрессированными от иммунных видов. Причем гены одного и того же вида (*Lr19* и *Lr24* – от *Agropyron elongatum*; *Lr28*, *Lr35*, *Lr36* – от *Aegilops speltoides*) могут активировать накопление разных форм АФК на различных стадиях патогенеза, что обеспечивает эффективную защиту от биотрофного патогена. Таким образом, АФК являются важными компонентами защиты пшеницы от бурой ржавчины.

1. McIntosh R .A., Yamazaki Y., Devos K. M., Dubcovsky J., Rogers W. J. Catalogue of gene symbols for wheat. MACGENE. 2003. (CD Version). User Manual.

2. Плотникова Л.Я., Кнаус Ю.К. Клеточные механизмы иммунитета к бурой ржавчине видов-нехозяев и устойчивых видов злаков // Микология и фитопатология. 2007. Т. 41. №5. С. 461–470.

3. Плотникова Л.Я., Штубей Т.Ю. Эффективность генов воз-

растной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине *Lr22b*, *Lr34*, *Lr37* в Западной Сибири и цитофизиологическая основа их действия // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2012. Т. 16. № 1. С. 123–131.

4. Пожерукова В.Е., Плотникова Л.Я., Дегтярев А.И. Устойчивость пшеницы Тимофеева к бурой ржавчине определяется генерацией активных форм кислорода и подавлением образования гаусторий гриба *Puccinia triticina* // Фундаментальные исследования. 2015. № 2–2. С. 285–292.

5. Gill U. S, Lee S., Mysore K.S. Host Versus Nonhost Resistance: Distinct Wars with Similar Arsenals // Phytopathology. 2015. V. 105. N. 5. P. 580–586.

РЕДОКС-ЗАВИСИМАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА КЛЕТОК КОРНЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СТРЕССОВЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Г.А. Пожванов[1]*, С.С. Медведев[1], К. Виссенберг[2], В.В. Демидчик[3]

[1]Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия; e-mail: g.pozhvanov@spbu.ru

[2]Университет Антверпена, г. Антверпен, Бельгия.

[3]Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь.

Актиновый цитоскелет играет исключительно важную роль в жизни растительной клетки, будучи вовлеченным в практически все виды регуляторных и стрессовых ответов. В настоящей работе мы приводим доказательства того, что актиновый цитоскелет претерпевает перестройки при солевом и окислительном стрессе, а также гравитропической реакции в результате АФК-зависимых процессов. В работе были использованы линий растений *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующие GFP-меченый актин. Действие сублетальной концентрации NaCl (100 мМ) запускало полимеризацию актина в зоне растяжения в течение 10 мин. после начала воздействия иприводило к замедлению либо остановке роста корня. Угловое распределение микрофиламентов изменялось от первоначального (аксиальная ориентация) к широкому спектру направлений с пиками при 15°, 45° и

90° относительно оси корня. Этот эффект удалось блокировать обработкой полиаминами (спермин, спермидин), блокаторами Ca^{2+}-проницаемых каналов или гасителями активных форм кислорода. Следовательно, реорганизация цитоскелета при солевом стрессе могла быть вызвана образованием гидроксильных радикалов и входом Ca^{2+} в клетку. Обработка корней смесью, генерирующей гидроксильные радикалы (1 мМ Cu^{2+}, 1 мМ L-аскорбат и 1 мМ H_2O_2), вызывала сходный характер реорганизации актинового цитоскелета, которая, однако, развивалась в 10 раз быстрее (по сравнению с действием NaCl). Гасители гидроксильных радикалов, полиамины, EGTA и модуляторы активности неселективных катионных каналов тормозили развитие реорганизации цитоскелета, вызванное гидроксильными радикалами. Более того, мелиорирующие действие полиаминов и гасителей гидроксильных радикалов также предотвращало остановку роста корня, вызванную NaCl или окислительным стрессом.

Среди направленных факторов среды, вектор силы тяжести имеет особенное значение для растений, поскольку сохраняет направление и течение всего онто- и филогенеза растений. В регуляции гравитропизма – направленного роста растения относительно вектора силы тяжести – принимают участие ауксин и система его полярного транспорта, ряд вторичных посредников и цитоскелет [1]. Показано, что при гравистимуляции (поворот в вертикальной плоскости на 90º) происходит реорганизация актинового цитоскелета в клетках зоны растяжения корня *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh: уменьшается доля аксиально ориентированных и возрастает доля наклонно и поперечно ориентированных микрофиламентов [2]. В работах Д.Н. Нелюбова этилен был открыт как фитогормон, регулирующий гравитропическую реакцию побегов специфическим образом – изменяя направление роста на 90º, однако механизм этого феномена оставался неизвестным. В настоящей работе изучали эффект этилена и ингибиторов его синтеза на реорганизацию актинового цитоскелета *in vivo* в ходе гравитропической реакции проростков *A. thaliana fABD2-GFP*, экспрессирующих 2-й актин-связывающий домен белка фимбрина, слитый с зелёным флуоресцентным белком. Обработка растений этилен-продуцентом этефоном вызывала разборку микрофиламентов и значительное расширение спектра их ориентации в клетках зоны растяжения корней. Эффект перестройки актиновых микрофиламентов,

индуцированной гравистимуляцией, снимался при обработке растений ингибитором синтеза этилена – аминоэтоксивинилглицином (АВГ). Более того, АВГ стабилизировал аксиальную ориентацию микрофиламентов при гравистимуляции. Салициловая кислота – также негативный регулятор синтеза этилена – вызывала нарушение реорганизации актиновых микрофиламентов [3].

Возникает вопрос, является ли повышение уровня АФК фактором, способствующим реорганизации актина в ходе гравитропической реакции? Эксперименты с трансгенными растениями арабидопсиса, экспрессирующими H_2O_2-чувствительную конструкцию HyPer, показали, что при гравистимуляции в кончике корня растёт уровень H_2O_2-зависимого сигнала в течение первых 15 мин., что предшествует реорганизации актина.

Предложена гипотетическая модель, связывающая наблюдаемые перестройки актинового цитоскелета с другими ранними физиологическими процессами, индуцированными солевым стрессом в клетках растения.

Работа выполнена при поддержке РФФИ №№ 14-04-01624, 17-04-00862 и СПбГУ №№ 1.38.233.2014, 1.57.1157.2014, 1.42.1282.2014, 1.57.163.2015 и с использованием оборудования Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

1. Медведев С.С. Механизмы формирования и физиологическая роль полярности в растениях // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 543–556.

2. Пожванов Г.А., Суслов Д.В., Медведев С.С. Перестройки актинового цитоскелета в ходе гравитропической реакции корней арабидопсиса // Цитология. 2013. Т. 55. С. 28–35.

3. Пожванов Г.А., Гобова А.Е., Банкин М.П., Виссенберг К., Медведев С.С. Этилен вовлечён в реорганизацию актинового цитоскелета в ходе гравитропической реакции корней Arabidopsis thaliana // Физиология растений. 2016. Т. 63. С. 624–635.

ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ХЛОРОПЛАСТОВ РАСТЕНИЙ ТАБАКА В ПРОЦЕССЕ ЗАЩИТЫ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ГИПОТЕРМИИ

В.Н. Попов, О.В. Антипина, Н.В. Астахова

ФГБУН Институт физиологии растений им. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия; e-mail: vnpopov@mail.ru

Низкие температуры относятся к числу наиболее распространенных неблагоприятных условий окружающей среды, оказывающих воздействие на растительный организм [1]. Практически все растения на Земле могут подвергаться действию холода (низких положительных температур) и мороза (температуры ниже 0ºС) [2]. В связи с большими потерями, которые несет сельское хозяйство в результате периодических снижений температуры, заморозков и критических морозов, проблема адаптации растений к гипотермии является весьма актуальной [3]. В литературе широко распространено представление о том, что при охлаждении растений в их клетках развивается окислительный стресс. Он инициируется активными формами кислорода (АФК) и приводит к различным проявлениям холодового повреждения [4].

Адаптация растений к гипотермии всегда сопровождается перестройкой ультраструктуры клеток и хлоропластов. В литературе имеются многочисленные и довольно противоречивые сведения о реорганизации ультраструктуры хлоропластов в условиях низких температур [5,6]. Как правило, такие изменения в ультраструктурной организации хлоропластов обсуждаются с позиции сохранения способности к фотосинтезу и обеспечения растения ассимилятами при низких температурах, что рассматривается как необходимое условие приобретения устойчивости к холоду [7]. Поэтому целью нашей работы было исследование изменений ультраструктурной организации хлоропластов табака (*Nicotiana tabacum* L., сортотип Samsun) в качестве одного из возможных механизмов защиты растений от окислительного стресса при гипотермии.

Электронно-микроскопические наблюдения показали, что в процессе закаливания (6 суток при 8°С), наблюдалось снижение числа хлоропластов в клетке, увеличение площади хлоропласта на 40% и

площади крахмального зерна более чем в 2 раза. При этом площадь пластоглобул в хлоропласте оставалась неизменной. Что касается изменения количества структурных элементов хлоропластов, то за время низкотемпературного закаливания произошло 20% увеличение числа крахмальных зерен и снижение числа пластоглобул на 10%. Особый интерес представляет реорганизация мембранной системы хлоропластов в условиях гипотермии. Установлено, что за время низкотемпературного закаливания происходило значительное снижение числа гран в хлоропласте одновременно с уменьшением площади одной граны, что приводило к 30% снижению суммарной площади гран в хлоропластах табака. Закаливание растений табака сопровождалось почти двукратным уменьшением скорости генерации супероксидного анион-радикала и 30% снижением содержания перекиси водорода, что свидетельствует о торможении окислительных процессов в клетках растений за время холодовой экспозиции. Известно, что электронтраспортные цепи хлоропластов, локализованные в тилакоидных мембранах, являются одним из главных источников АФК в клетке [8]. Поэтому обнаруженное нами уменьшение площади фотосинтетических мембран при закаливании, по-видимому, приводит к снижению интенсивности генерации АФК в хлоропластах и, тем самым, обеспечивает торможение свободно-радикальных процессов в клетках растений табака. Высказано предположение, что обнаруженные изменения ультраструктурной организации хлоропластов, могут быть направлены на предотвращение перевосстановления электронтранспортной цепи в условиях гипотермии, когда способность цикла Кальвина утилизировать АТФ и НАДФ·Н значительно снижена. Сбалансированная работа компонентов световой и темновой фаз фотосинтеза может предотвращать избыточную генерацию активных форм кислорода и обеспечивать формирование устойчивости растений табака к гипотермии.

1. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 54 с.

2. Larcher W. Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. Springer: Berlin, Heidelberg, New York. 2003. 513 pp.

3. Сандухидзе Б.И., Рыбакова М.И., Морозова З.А. Научные ос-

новы селекции озимой пшеницы в нечерноземной зоне России. М., РАСХН. 2003. 426 с.

4. Suzuki N., Mittler R. Reactive Oxygen Species and Temperature Stresses: A Delicate Balance Between Signaling and Destruction // Physiol. Plantarum. 2006. V. 126. P. 45-51.

5. Kratsch H.A., Wise R.R. The Ultrastructure of Chilling Stress // Plant, Cell and Environment. 2000. V. 23. P. 337-350.

6. Трунова Т.И., Астахова Н.В. Роль ультраструктуры клеток в формировании морозостойкости озимой пшеницы // Докл. РАН. 1998. Т. 359. С. 120-122.

7. Margesin R., Neuner G., Storey K.B. Cold-Loving Microbes, Plants, and Animals – Fundamental and Applied Aspects // Naturwissenschaften. 2007. V. 94. P. 77-99.

8. Бухов Н.Г. Динамическая световая регуляция фотосинтеза // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 825-837.

РЕДОКС-АКТИВНЫЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ВАКУОЛЕЙ

Е.В. Прадедова[1], О.Д. Нимаева[1], А.Б. Карпова[2], Р.К. Саляев[1]

[1]ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия; e-mail: praded@sifibr.irk.ru

[2]ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», г. Иркутск, Россия; e-mail: KarpovaAB@yandex.ru

В каждом компартменте эукариотической клетки формируются определенные окислительно-восстановительные условия, которые влияют на активность белков и величину электрохимического градиента на мембране [1]. Редокс-состояние внутренней среды компартментов обусловлено редокс-состоянием локализованных в них редокс-соединений. Повсеместное присутствие и высокая концентрация глутатиона (γ-глутамил-цистеинил-глицина) позволили использовать его в качестве основного маркера редокс-состояния клеточных структур. Например, интенсивность редокс-процессов в митохондриях, пластидах и цитозоле зачастую оценивается редокс-соотношением (GSH/GSSG) восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глута-

тиона [1, 2]. Редокс-потенциал этих клеточных структур также характеризуется редокс-потенциалом глутатиона. В норме, как правило, поддерживается относительно высокий восстановленный потенциал [1]. Одновременно в этих клеточных структурах функционируют элементы, чувствительные к «избыточному окислению», обычно возникающему при интенсивном образовании активных форм кислорода (АФК) [1-3]. Центры генерации АФК хорошо известны, они находятся на мембране (в электрон-транспортных системах) и водной фазе. АФК и система GSH в последние годы рассматриваются как главные регуляторы окислительно-восстановительных процессов в цитозоле, пластидах и митохондриях [2]. Согласно сложившимся представлениям, в клеточных структурах, в которых поддерживаются кислые условия, например, клеточной стенке, лизосомах и вакуолях, GSH и особенно GSH-зависимые системы, из-за низкой активности в кислой среде, могут быть малоэффективными [1]. По всей видимости, в таких компартментах основным редокс-буфером служит аскорбиновая кислота (АК), которая обратимо окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты (ДГА) [4]. Элементы систем аскорбиновой кислоты, а также системы глутатиона, регулируют редокс-состояние пула АК (АК/АК+ДГА), которое также служит характеристикой редокс-состояния компартментов.

В системе глутатиона и аскорбиновой кислоты основные доноры электронов (e^-) – НАДФН и НАДН. С другой стороны, эти динуклеотиды могут быть донорами e^- для O_2 и способствовать образованию АФК [5]. В связи с этим редокс-состояние компартментов клетки обусловлено не только редокс-состоянием глутатиона и аскорбиновой кислоты, но и в определенной мере редокс-состоянием динуклеотидов НАД(Ф)Н/НАД(Ф)$^+$.

Настоящая работа посвящена изучению редокс-состояния вакуолей клеток покоящихся корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). Для этого в изолированных органеллах определяли содержание восстановленной и окисленной форм глутатиона, аскорбиновой кислоты и НАД. Одновременно для сравнения определяли все перечисленные соединения в изолированных митохондриях и пластидах – клеточных структурах, которые в отличие от вакуолей характеризуются слабощелочными условиями внутренней среды. По редокс-соотношению перечисленных соединений оценивали редокс-

состояние исследуемых органелл.

Детали методов изолирования органелл описаны в ранее опубликованной работе [6]. Содержание глутатиона и аскорбиновой кислоты определяли с помощью методов ВЭХЖ [7, 8], а НАД(Н) – с помощью спектрофотометрического метода и комплекса реактивов (NAD/NADH Quantification Kit, «Sigma», США).

Таблица 1

Содержание глутатиона в исследуемых образцах

Объект исследования	Глутатион, нМ на 1 мг белка				
	$GSH_{общ}$ (GSH+GSSG)	GSH	GSSG	GSH/GSSG	GSH/ $GSH_{общ}$
Вакуоли	231,3±33,5	182,3±31,9	24,5 ± 0,8	7,4	0,79
Пластиды	124,2±8,5	112,8±7,1	5,7 ± 0,7	19,8	0,91
Митохондрии	246,7±33,9	227,5±35,8	9,6 ± 1,1	23,7	0,92
Экстракт ткани	432,6±64,6	378,4±51,2	27,1 ± 6,7	13,9	0,87

Полученные в ходе исследования результаты свидетельствовали о разном распределении GSH, АК и НАД по внутриклеточным структурам клеток корнеплодов столовой свеклы (Табл. 1, 2, 3). Наибольшее содержание глутатиона выявлено в митохондриях, а наименьшее – в пластидах (Табл. 1). Пул глутатиона в вакуолях оказался наименее восстановленным, тогда как митохондрии характеризовались наиболее восстановленным пулом.

Из всех исследуемых органелл вакуоли содержали наибольшее количество аскорбиновой кислоты (Табл. 2). Наименьшее количество АК выявлено в митохондриях. Однако величины редокс-соотношений АК/$АК_{общ}$ и АК/ДГА так же, как и в случае с редокс соотношениями GSH/$GSH_{общ}$ и GSH/GSSG, были наиболее высокими у митохондрий и наименее высокими – у вакуолей. Пул аскорбиновой кислоты в вакуолях оказался более окисленным, чем в пластидах и митохондриях.

Согласно сложившимся представлениям, существенный вклад в вакуолярные редокс-процессы может вносить НАД(Н). Результаты настоящего исследования показали, что в клетках корнеплодов столовой свеклы этот динуклеотид в относительно высоких концентрациях сосредоточен в пластидах и вакуолях (Табл. 3). Вакуоли харак-

теризовались наиболее восстановленным НАД(Н), по сравнению с пластидами и митохондриями.

Таблица 2

Содержание аскорбиновой кислоты в исследуемых образцах

Объект исследования	Аскорбиновая кислота (АК), мкМ на 1 мг белка				
	$АК_{общ}$ (АК+ДГА)	АК	ДГА	АК/ДГА	АК/ $АК_{общ}$
Вакуоли	4,96±0,78	3,19±0,19	1,76±0,39	1,81	0,64
Пластиды	0,41±0,02	0,27±0,01	0,14±0,01	1,85	0,66
Митохондрии	0,19±0,03	0,14±0,03	0,05±0,01	2,8	0,74
Экстракт ткани	12,11±1,9	4,74±0,3	7,36±0,9	0,64	0,39

Таблица 3

Содержание НАД(Н) в исследуемых образцах

Объект исследования	НАД(Н) нМ на 1 мг белка				
	$НАД_{общ}$ (НАД+НАДН)	НАД	НАД(Н)	НАДН/ НАД	($НАД_{общ}$-НАДН)/ НАДН
Вакуоли	3,01±0,42	1,86 ±0,19	1,15±0,23	0,62	1,63
Пластиды	2,74±0,23	1,98±0,21	0,76±0,02	0,38	2,61
Митохондрии	1,28±0,12	0,85±0,05	0,44±0,07	0,51	1,94
Экстракт ткани	2,75±0,32	1,77±0,42	0,98±0,22	0,55	1,81

В вакуолях более окисленное состояние глутатиона и аскорбиновой кислоты на фоне высокого содержания и более восстановленного состояния НАДН, по всей видимости, является следствием низкой эффективностьи внутривакуолярных НАДН-зависимых систем, восстанавливающих GSSG и ДГА. В то же время более окисленное состояние НАД в лейкопластах, в которых GSH было заметно меньше, а восстановленной АК, напротив, значительно больше, чем в митохондриях, могло свидетельствовать о высокой эффективности восстанавливающих эти соединения НАДН-зависимых систем.

Полученные результаты позволили прийти к заключению, что у клеток корнеплодов столовой свеклы внутренняя среда вакуолей – более окисленная по сравнению с такими клеточными структурами,

как пластиды и митохондрии.

1. Go Y.M., Jones D.P. Redox compartmentalization in eukaryotic cells // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1780. P. 1273−1290.

2. Noctor G., Queval G., Mhamdi A. Glutathione // The Arabidopsis Book. 2011. V. 9. P. 1–32.

3. Koffler B.E., Bloem E., Zellnig G., Zechmann B. High resolution imaging of subcellular glutathione concentrations by quantitative immunoelectron microscopy in different leaf areas of Arabidopsis // Micron. 2013. V. 45. P. 119–128.

4. Pignocchi C., Foyer C.H. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling // Curr. Opin. Plant Biol. 2003. V. 6. P. 379–389.

5. López-Mirabal H.R., Winther J.R. Redox characteristics of the eukaryotic cytosol // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1783. P. 629–640.

6. Прадедова Е.В., Нимаева О.Д., Саляев Р.К. Супероксиддисмутаза вакуолей клеток растений // Биологические мембраны. 2009. Т. 26, С. 21–30.

7. Rellan-Alvarez R., Hernandez L.E., Abadia J., Alvarez-Fernández A. Direct and simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione and homoglutathione by liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry in plant tissue extracts // Anal. Biochem. 2006. V. 356. P. 254–264.

8. Alos E., Rodrigo M.J., Zacarias L. Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis, recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) // Plant Science. 2013. V. 207. P. 2–11.

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕНИТ- ЙОНОВ И КОФЕЙНОЙ КИСЛОТЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ ВОДООБМЕНА *Solanum tuberosum* В УСЛОВИЯХ ДЕСТРУКЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК

Т.И. Пузина, И.Ю. Макеева, Н.С. Власова

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», г. Орёл, Россия; email: tipuzina@gmail.com

Водообмен растений – важнейшая физиологическая функция, от которой во многом зависит ход и направленность продукционного процесса. Поэтому важно знать пути его регуляции. Сведения об участии антиоксидантов в регуляции водного режима растений малочисленны. При этом известно, что стрессовые условия вызывают изменения в поступлении и транспорте воды. Антиоксидантные функции селена показаны в ряде работ [1]. В наших предыдущих исследованиях выявлено, что кофейная кислота – представитель гидроксикоричных кислот, также обладает антиоксидантными свойствами [2]. К малоисследованной области физиологии растений относится изучение роли элементов цитоскелета в регуляции водного обмена растений, а также транспорта воды через аквапорины [3].

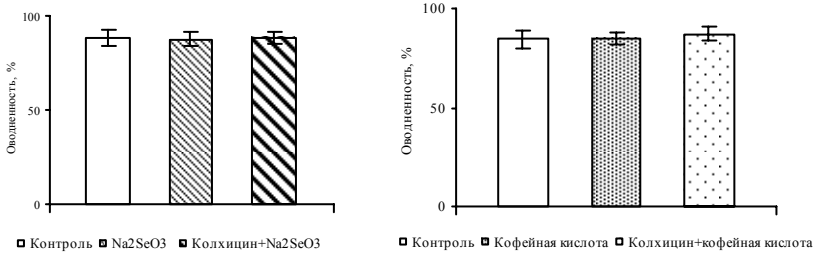


Рисунок 1. Влияние селенит-йонов и кофейной кислоты на оводненность листьев в зависимости от целостности тубулинового цитоскелета.

Цель работы состояла в исследовании действия антиоксидантов селена и кофейной кислоты на показатели водообмена, а также на транспорт воды через аквапорины в зависимости от структурного состояния тубулинового цитоскелета в растении картофеля.

Объектом исследования служили растения картофеля сорта Жуковский ранний, выращиваемые в почвенной культуре на серой лесной среднесуглинистой почве в условиях вегетационного домика. В сосуде в 10 кг почвы выращивали одно растение и поддерживали влажность 60% от полной влагоёмкости. Варианты опытов включали опрыскивание растений через 15 суток после появления всходов $5.8 \cdot 10^{-3}$ мМ раствором Na_2SeO_3 или 0.1 мМ раствором кофейной кислоты (Sigma, США). Деструкцию микротрубочек проводили 1 мМ раствором колхицина (Fluka, Швейцария), который связываясь с гетероди-

мером тубулина, предотвращает его полимеризацию и вызывает быструю разборку микротрубочек. Контрольные растения обрабатывали водой. О водоудерживающей способности судили по водоотдаче листьев, помещённых на час в эксикатор с серной кислотой.

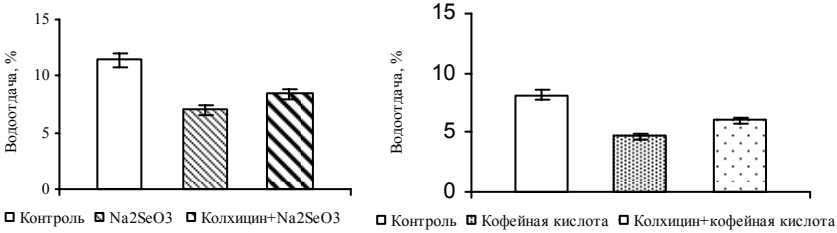


Рисунок 2. Действие селенит-йонов и кофейной кислоты на водоудерживающую способность листьев в зависимости от целостности тубулинового цитоскелета.

В качестве блокаторов водных каналов использовали 100 мкМ раствор $HgCl_2$, который является эффективным для большинства аквапоринов. Обогащение растений картофелем изучаемыми антиоксидантами не повлияло на оводнённость листьев как в оптимальных условиях, так и при фармакологическом стрессе, вызванном действием колхицина (рис.1).

Вместе в тем, к обработке селенитом и кофейной кислотой был чувствителен такой интегральный термодинамический показатель водного обмена как водоудерживающая способность клеток. Изучаемые антиоксиданты уменьшили водоотдачу листьев приблизительно в равной степени (селенит-йоны – на 38%, кофейная кислота – на 43%) (рис.2). Полученные результаты свидетельствуют об увеличении связанной воды, что возможно обусловлено повышением уровня эндогенных ауксинов. Такие данные были получены нами в предыдущих исследованиях [2]. Известно, что ауксины увеличивают количество коллоидно связанной воды. При деструкции тубулинового цитоскелета в вариантах с кофейной кислотой и селенитом натрия сохранился стимулирующий эффект на водоудерживающую способность листьев, однако в меньшей степени по сравнению с оптимальными условиями. Известно, что разборка элементов цитоскелета повышает количество свободной воды [3].

В настоящее время практически отсутствуют сведения об участии антиоксидантов в трансмембранном потоке воды через аквапорины. Между тем, они участвуют в регуляции реакций ПОЛ, от которых во многом зависит целостность мембран. Результаты показали (рис. 3), что селенит-йоны существенно увеличивают долю транспорта воды через аквапорины.

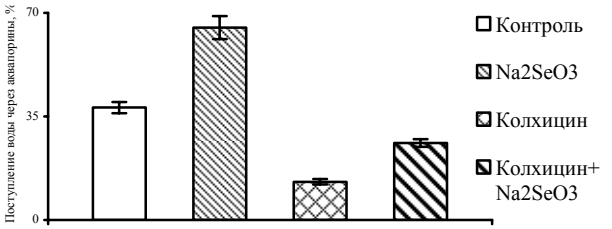


Рисунок 3. Влияние селенит-йонов на поступление воды через аквапорины в зависимости от целостности тубулинового цитоскелета.

Деполимеризация микротрубочек колхицином значительно уменьшила участие аквапоринов в поступлении воды в клетки листа. По-видимому, это связано с тем, что деструкция элементов цитоскелета нарушает транспорт везикул с белками водных каналов и встраивание их в мембраны. Такие данные на примере животных клеток имеются в литературе [4]. В условиях фармакологического стресса селенит-йоны (вариант колхицин+Na_2SeO_3) в 2 раза по сравнению с колхицином восстановили транспорт воды через аквапорины, однако уровень контрольного варианта не был достигнут.

Таким образом, проделанная работа показала, что изученные антиоксиданты увеличивают в листьях растений картофеля водоудерживающую способность при неизменной оводненности, а также сохраняют своё протекторное действие в условиях деструкции тубулинового цитоскелета. Селенит-йоны усиливают трансмембранный поток воды через аквапорины и стабилизируют его в условиях стресса.

1. Прудников П.С. Влияние селена на физиолого-биохимические процессы при адаптации растений картофеля к гипотермии: Автореф. дис. … канд. биол. наук. М.: МСХА. 2007. 23 с.

2. Пузина Т.И., Макеева И.Ю. Участие кофейной кислоты в регуляции продукционного процесса картофеля *Solanum tuberosum* // Агрохимия. 2015. № 6. С. 63-68.

3. Веспер М.В., Бочкарёва М.А., Хохлова Л.П. Цитоскелет и водный обмен растений // Учёные записки Казанского государственного университета. Естественные науки. 2008. Т.150. № 2. С. 22-42.

4. Снигиревская Е.С. Изменения ультраструктуры клеток вазопрессин- чувствительных эпителиев при стимуляции транспорта воды // Цитология. 1990. Т. 32. №8. С. 766-794.

ГЕНЕРАЦИЯ АФК, РЕДОКС-СОСТОЯНИЕ ПЛАСТОХИНОНОВ И ТИОРЕДОКСИНА И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ПУТЕЙ ТРАНСПОРТА ЭЛЕКТРОНОВ В ХЛОРОПЛАСТАХ В НОРМЕ И ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ

Н.Л. Пшибытко

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Световая стадия фотосинтеза характеризуется множественностью путей электронного транспорта. Классический нециклический электронный транспорт обеспечивается последовательным функционированием ФС2 и ФС1. Кроме того, электронное донирование к ФС1 может осуществляться и от источников, отличных от ФС2. К альтернативным электронным потокам можно отнести циклический электронный транспорт вокруг ФС1, включающий отток электронов от ферредоксина или НАДФН/НАДН к пластохиноновому пулу и дальнейший поток электронов через цитохром b_6/f комплекс и пластоцианин к Р700. Ферредоксин-зависимый светозависимый транспорт электронов катализируется Фд:НАДФ-оксидоредуктазой, Фд:пластохинон-оксидоредуктазой и регулируется мембранными белками тилакоидов PGR5 и PGRL1. Кроме того, Фд:НАДФ-оксидоредуктаза может поставлять электроны для восстановления пластохинонов в темноте через НАД(Ф)Н дегидрогеназу.

С целью выявления ключевых механизмов редокс-регуляции в хлоропластах с использованием ряда биохимических, биофизических и молекулярных методов исследованы процессы термоинактивации тилакоидных мембран. Установлено, что при тепловой обработке интактных проростков ячменя через 30 мин теплового воздействия из-

меняется редокс-состояние растительной клетки и хлоропластов, происходящее в результате генерации пероксида водорода, супероксидного радикала, а также повышения транстилакоидного протонного градиента. В результате изменения редокс-состояния растительной клетки активируются протекторные механизмы, такие как перераспределения ССК от ФС2 к ФС1 для предотвращения перевосстановления электрон-транспортной цепи, активизация альтернативных потоков электронов. Показана регуляторная роль пластохинонового пула в ответной реакции электрон-транспортной цепи хлоропластов на тепловое воздействие. Перераспределение пластохиноновых молекул между фотоактивным и нефотоактивным пулами является адаптационной реакцией на снижение уровня активных реакционных центров ФС2 при тепловом шоке. Установлена определяющая роль ферредоксина в термоиндуцированном подавлении электронного транспорта в хлоропластах. Показано, что повышение уровня восстановленности ферредоксина является причиной подавления линейного и циклического электронного транспорта. Выявлена регуляторная роль редокс-состояния ферредоксина в формировании размера фотоактивного пластохинонового пула, а также его редокс-состояния при тепловом стрессе. В то же время обнаружено, что пул аскорбата и глутатиона при умеренном тепловом воздействии (40ºС, 3ч) выполняет антиоксидантную функцию и не участвует в термоиндуцированном изменением редокс-статуса растительной клетки и редокс-регуляции ответной стрессовой реакции. Рассмотрено взаимодействие пероксида водорода и пластохинонового пула в стрессовых условиях.

ВЛИЯНИЕ НИТРАТА СВИНЦА НА АКТИВНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНОЙ КАТАЛАЗЫ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ

Г.В.Решетник[1], Н.С.Задиранова[2]

[1]ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского», Таврическая академия, г. Симферополь, Республика Крым, Россия; e-mail:gvresh@ukr.net

[2]ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского», Таврическая академия, г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Среди токсических веществ, загрязняющих окружающую среду, особое место занимают тяжелые металлы. Многие из них, такие как железо, медь, цинк, участвуют в биологических процессах и в определенных количествах являются для функционирования растений микроэлементами. С другой стороны, тяжелые металлы и их соединения могут оказывать вредное воздействие на растительный организм. Повреждающее действие избыточных концентраций проявляется в нарушении поступления и распределения других минеральных элементов, ингибировании фотосинтеза, нарушении транспорта ассимилятов, изменении водного и гормонального статуса, торможении роста [3].

Свинец весьма распространенный природный токсикант и относится к числу высоко опасных химических элементов. Свинец не является необходимым для жизнедеятельности растений элементом. Опасность свинца усугубляется тем, что он сохраняет свои токсические свойства в течение продолжительного времени и обладают кумулятивным действием. Изучение реакции растений на присутствие повышенных концентраций тяжелых металлов в окружающей среде вызывает большой научный и практический интерес [4].

Ответной реакцией на воздействие неблагоприятных антропогенных факторов среды является образование активных форм кислорода и происходит смещение баланса оксидантов/антиоксидантов в сторону оксидантов, что и является причиной внутреннего окислительного стресса [2]. Во время этого стресса образуется супероксид аниона, который ведет к продуцированию гидроксильных радикалов и перекиси водорода. Перекись водорода является сигналом для активации защитных систем. Одним из ферментов таких защитных систем является каталаза [2].

Каталаза – фермент, который в растительной клетке, ответственный за разложение перекисей. Изменение активности оксидаз может служить показателем реакции растительного организма к неблагоприятным факторам среды и для оценки приспособления растений к условиям существования.

Целью нашей работы является изучение влияния различных концентраций нитрата свинца на активность растительной каталазы прорастающих семян *Triticum aestivum* L. сорта «Куяльник».

Пшеница – одна из древнейших культур земного шара. По по-

севным площадям пшеница занимает первое место среди всех культур, возделываемых на земном шаре, кормит значительную часть населения планеты. Она является главным продуктом питания на севере Китая, в североафриканских и ближневосточных странах, в некоторых областях Индии.

Исследования активности каталазы под воздействием возрастающих концентраций нитрата свинца (10^{-5} – 10^{-1}М) проводились в течение трех суток.

Для опытов отбирали сходные по виду и массе семена. Перед проращиванием их стерилизовали, используя 1%-ный раствор перманганата калия. Семена раскладывали в кюветы на фильтровальную бумагу для прорастания. В качестве контроля семена проращивались на отстоянной водопроводной воде. Кюветы помещали в термостат ТС-80М-2 при температуре 20^0С.

В ходе исследования действия свинца на прорастание семян *Triticum aestivum* L. оценивали энергию прорастания на 4 сутки и лабораторную всхожесть на 8 сутки согласно ГОСТу 12038-84[1].

Активность каталазы прорастающих семян определяли газометрическим методом, который основан на определении объема кислорода после прибавления к растительной вытяжке, содержащей каталазу, H_2O_2 [5].

В процессе эксперимента установили, что максимальная концентрация свинца в растворе (10^{-1}М) полностью ингибирует процесс набухания и прорастания семян пшеницы. Всхожесть семян при концентрации металла 10^{-2} и 10^{-3}М в среднем на 25% была ниже контрольных значений. Минимальное (10^{-5}М) содержание металла в среде не оказало достоверного влияния на энергию прорастания и всхожесть семян по сравнению с контролем.

Скорость набухания семян в растворах различной концентрации нитрата свинца соответствует классическим представлениям и имеет S-образную кривую. Наиболее интенсивное водопоступление отмечается в первые 8 часов.

Одновременно с оводненностью семян происходит активация метаболических процессов, обусловленная интенсификацией дыхания с образованием H_2O_2. Токсическое действие активных форм кислорода снижается за счет антиоксидантной системы, которая включает в себя ряд ферментов, в том числе и каталазу.

В ходе проведенных исследований было обнаружено, что действие нитрата свинца на активность каталазы зависело от концентрации соли в среде прорастания семян (табл.1). Через одни сутки активность фермента возрастает во всех вариантах опыта. С повышением концентрации соли в среде, активность фермента понижается. Максимальные значения активности отмечены в 10^{-5}М растворе $Pb(NO_3)_2$ и составляют 7,2 $см^3$/г, а при концентрации соли 10^{-2}М активность каталазы составляет 3,2 $см^3$/г.

Во временном диапазоне активность фермента повышается во всех вариантах опыта. На третьи сутки прорастания семян *Triticum aestivum* L. активность фермента снижается относительно контроля. Значение активности фермента в варианте с минимальным количеством металла (10^{-5}М) в растворе приближается к показаниям контроля. Следует отметить, что на третьи сутки растворы с максимальным количеством $Pb(NO_3)_2$ (10^{-2} – 10^{-3}М) резко снижают активность фермента в среднем на 72% по отношению к контрольному варианту.

Таблица 1

Влияние нитрата свинца на активность каталазы прорастающих семян *Triticum aestivum* L. ($см^3O_2$/г)

Варианты опыта	Время проращивания семян					
	1сутки	% к контролю	2 сутки	% к контролю	3 сутки	% к контролю
Контроль	3,2 ± 0,1	100,0	11,3±0,4	100,0	24,7 ± 0,4	100,0
10^{-2}М р-р $Pb(NO_3)_2$	3,9 ± 0,1	121,9	7,5 ± 0,2	66,4	6,7 ± 0,2	27,1
10^{-3}М р-р $Pb(NO_3)_2$	5,3 ± 0,2	165,6	10,9±0,1	96,5	7,5 ± 0,2	30,4
10^{-4}М р-р $Pb(NO_3)_2$	6,1 ± 0.4	190,6	13,8±0,5	122,1	22,7 ± 0,6	91,9
10^{-5}М р-р $Pb(NO_3)_2$	7,2 ± 0,3	225,0	13,9±0,4	123,0	24,0 ± 0,3	97,2

Обобщая результаты эксперимента можно отметить, что проращивание семян в растворах нитрата свинца каталазная активность повышается за первые сутки и резко понижается на третьи по срав-

нению с контролем. При прорастании семян в растворах с высокой концентрацией металла происходит накопления токсиканта в клетках эндосперма, в результате чего ингибируются метаболические процессы, снижается, уровень процессов дыхания, что объясняет снижение активности фермента и низкую лабораторную всхожесть семян. Ткани семян пшеницы испытывают стресс в ответ на действие ионов свинца, что влияет на каталазную активность.

1. ГОСТ 12038-84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. – М. Межгосударственный стандарт: Издательство стандартов, 2011. – 29 с.

2. Деви С. Р., Прасад М.Н.В. Антиокислительная активность растений Brassica juncea, подвергнутых действию высоких концентраций меди // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 2. С. 233–237.

3. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессов. Киев: Основа, 2010. 352 с.

4. Кулешов М. Н., Полуянов В. П.. Роль тяжелых металлов в природной системе почва – растения и методы их определения. Харьков, 1995. С. 15.

5. Третьяков Н.Н. Практикум по физиологии растений. – М. : Агропромиздат, 1990. – 271 с.

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ *Artemisia santonica* В УСЛОВИЯХ ПРИЭЛЬТОНЬЯ

О.А. Розенцвет, В.Н. Нестеров, Е.С. Богданова

ФГБУН Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти, Россия; e-mail: olgarozen55@mail.ru

Полынь сантонинная (*Artemisia santonica* L.) является характерным компонентом галофильно-луговостепной растительности юго-восточного региона Европейской части России. *A. santonica* проявляет высокую устойчивость и высокую конкурентную способность на сухих, засоленных местообитаниях [1]. В условиях Приэльтонья она входит в состав сообществ, формирующихся на солонцевых и солон-

чаковых почвах [2]. Растения Приэльтонья в течение большей части вегетационного периода, кроме засоления, испытывают действие высокой солнечной инсоляции и температуры. В таких условиях солеустойчивость галофитов обусловлена необходимостью адаптации к осмотическому, токсическому и окислительному воздействию [3].

Образование избыточного количества активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительных процессов является одним из токсических проявлений внутриклеточного действия солей. В случае контролируемого уровня, АФК играют ключевую роль в росте и развитии растений, а при нарушении баланса между их генерацией и утилизацией становятся причиной повреждения клетки и ее смерти. АФК вызывают окисление липидов, белков, Fe-S-центров ферментов, фрагментацию пептидных цепей, оказывают прямое и опосредованное действие на ДНК [4].

Галофиты обладают физиологическими и биохимическими механизмами, позволяющими справляться с высокой засоленностью почвы [5]. Среди этих механизмов наряду со способностью контролировать поступление ионов в органы растений, важная роль принадлежит процессам антиоксидантной защиты, а также структурным и функциональным модуляциям биологических мембран клетки.

Цель данной работы состояла в исследовании биохимических особенностей метаболизма, позволяющих гликогалофитам (на примере *A. santonica*) реализовывать их солеустойчивость и высокую конкурентную способность в естественных условиях произрастания, отличающихся засушливостью, засолением и высокой степенью инсоляции. Одной из задач работы было изучение окислительно-восстановительного гомеостаза клеток листьев *A. santonica* при адаптации к абиотическим факторам среды.

Растительный материал – листья гликогалофита *A. santonica* собирали в июне 2015 г. в районе соленого оз. Эльтон (Волгоградская область) в утренние (9:00), дневные (14:00) и вечерние (20:00) часы. Значения солнечной инсоляции и температуры воздуха в исследуемый период варьировали в интервалах 1000-2000 мкмоль $м^{-2}с^{-1}$ и 30-35/25-30°C (день/ночь). Засоленность почвы в данном регионе обусловлена сильно минерализованными (15–30 г/л) грунтовыми водами, залегающими на глубинах 0-3 м.

Функциональное состояние фотосинтетическог аппарата (ФА)

растений оценивали по скорости CO_2 газообмена листьев и содержанию фотосинтетических пигментов, а состояние окислительно-восстановительных процессов – по содержанию ТБК-реагирующих продуктов, активности антиокислительных ферментов и низкомолекулярных антиоксидантов. В середине дня, при повышении интенсивности света и температуры, происходило снижение скорости фотосинтеза, а в вечерний период (в темноте) наблюдали только темновое дыхание. Наиболее высокое содержание зеленых пигментов в листьях наблюдалось в утренние часы. В послеполуденные и в вечерние часы их содержание было достоверно ниже. Соотношение хлорофилла (Хл) *a/b* в течение суток изменялось незначительно, хотя доля пигментов, принадлежащих ССК, к полудню несколько снижалась. Количество каротиноидов (Кар) было 4,6-4,9 раз ниже, чем Хл, и их содержание уменьшалось в вечернее время. В фонде Кар подавляющая часть представлена ксантофиллами, которая составляла 69-71%, β-каротин - 29-31%. Доля ключевых пигментов ВКЦ – зеаксантина (Зеа) и антероксантина (Ант), в полуденные часы была максимальной и снижалась к вечеру. Изменения в содержании виолаксантина были противоположны изменениям в содержании Зеа и Ант. Доля β-каротина и лютеина изменялась незначительно.

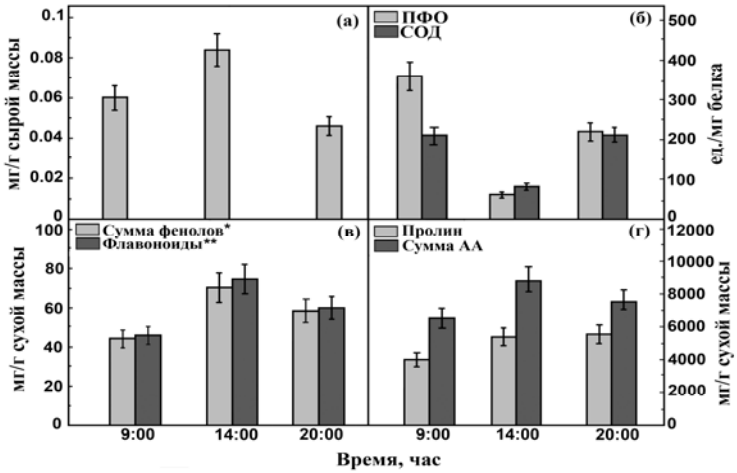


Рисунок. Суточная динамика содержания ТБК-реагирующих продуктов (а), активности СОД и ПФО, ед/мг белка (б), содержания фенольных соединений и флавоноидов (в), свободных АК и пролина (г) в листьях Artemisia santonica.

В условиях повышения интенсивности инсоляции и температуры в середине дня содержание ТБКР - продуктов увеличивалось в 1,4 раза и снижалось к вечеру почти в 2 раза (рис.). В суточной динамике ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и полифенолоксидазы (ПФО) наблюдалось снижение активности в дневное время, особенно ПФО (в 6,5 раз). Кроме того в середине дня имело место более чем полуторакратное повышение содержания фенольных соединений, а также концентрации свободных амнокислот (АК) (на 35%). Значительная часть пула свободных АК (77 – 84%) представлена пролином, доля которого возрастала параллельно с увеличением количества свободных АК. Установлено также повышение уровня моносахаров и снижение дисахаров на фоне увеличения концентрации крахмала и свободных АК. Не исключено, что увеличение свободных АК связано с окислением «избыточного» сахара вследствие ограничения оттока ассимилятов в акцептирующие органы.

Таким образом, в условиях Приэльтонья в листьях растений *A. santonica* наблюдали баланс активности и стабильности фотосинтетических процессов, направленных на защиту ФА. Вклад компонентов в антиоксидантную защиту показывает, что между некоторыми антиоксидантными реакциями существуют выраженные реципрокные отношения, которые наиболее четко заметны между уровнем ферментативных и неферментативных компонентов. Следовательно, способность растений *A. santonica* противостоять засолению почвы, высоким уровням солнечной инсоляции и температуры состоит из целого ряда защитно-приспособительных реакций метаболического и фотосинтетического контроля.

1. Симагина Н.О. Аллелопатические свойства гликогалофита *Artemisia santonica* L. // Ученые записки Таврического национального университета им. Вернадского. 2006. Т. 19. С. 177–185.

2. Лысенко Т.М. Растительность засоленных почв лесостепной и степной зон в Поволжье: разнообразие, закономерности распространения, экология и охрана. Дисс. д.б.н. Тольятти, 2014. 390 с.

3. Lokhande V. H., Suprasanna P. Prospects of Halophytes in Understanding and Managing Abiotic Stress Tolerance // Environmental adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change. Eds. P. Ahmad, M.N.V. Prasad. Springer Science + Business Media, LLC,

2012. P. 29–56.

4. Bose J., Rodrigo-Moreno A., Shabala S. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 1241–1257.

5. Parida A. K., Das A. B., Mohanty P. Defense potentials to NaCl in a mangrove, differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes // J. Plant Physiol. 2004. V. 161. P. 531–542.

АУТОФАГИЧЕСКИЕ БЕЛКИ *Triticum aestivum*: *IN SILICO* ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ATG8

В.В. Рябовол,[1] Ф.В. Минибаева[1,2]

[1]*ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, Россия; e-mail: vicry@yandex.ru*

[2]*Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия*

Аутофагия представляет собой сложный многоэтапный процесс, реализуемый при участии большого количества специализированных белков, принадлежащим к различным семействам, но объединенных общим названием «ATG белки». В настоящее время у дрожжей, которые являются удобным модельным объектом для изучения аутофагии, обнаружено более тридцати (~35) *ATG* генов. Их условно подразделяют на три группы: 1) ATG9 комплекс, 2) PI3P - киназный комплекс, 3) две убиквитин-подобные системы (ATG5- ATG12 и ATG8-ФЭ). ATG8, маркерный белок аутофагии, является ключевым белком в биогенезе аутофагосом. Он обеспечивает платформу для докинга различных факторов, необходимых для построения расширающейся аутофагической мембраны и инкапсуляции удаляемых компонентов. Кроме арабидопсиса у большинства видов растений основные компоненты аппарата аутофагии во многом не охарактеризованы. В нашей работе с помощью *in silico* анализа в пшенице *Triticum aestivum* были идентифицированы ATG гены и белки, участвующие в процессе формирования аутофагосом, и выявлены коровые ATG белки, взаимодействующие с ATG8 с помощью AIM (LIR)-мотива (ATG8-family interacting motif или LC3 interacting motif).

С помощью баз данных Ensemblplants, Phytozome, UniProt, URGI

BLAST, NCBI, используя ATG гены арабидопсиса в качестве «query», у *T. aestivum* были идентифицированы 18 семейств, которые могут быть вовлечены в сборку аутофагосом на различных этапах. Среди них серин-треониновые киназы - ATG1 и VPS15; фосфатилинозитол - 3 киназа VPS 34; цистеиновая протеиназа ATG4, принадлежащая к C54 суперсемейству; убиквитин-подобные конъюгирующие ферменты ATG3 и ATG10; WD40 повтор-подобное суперсемейство ATG18; трансдуцин- WD40 повтор-подобное суперсемейство ATG16; убиквитин-подобные суперсемейства ATG8 и ATG12; ThiF семейство ATG7; ATG13 семейство; ATG11 семейство; ATG2 семейство; трансмембранный белок ATG9 семейства; ATG27 семейство; ATG6 / Beclin 1; ATG101 семейство. Кроме того, мы идентифицировали гомолог TOR серин-треониновой киназы и ATG1t, который характерен только для цветковых растений.

Установлено, что каждое семейство представлено, по крайней мере, тремя гомеологичными генами, каждый из которых часто представлен несколькими сплайсовыми вариантами (от 2 до 6). Такую многокопийность генов можно объяснить тем, что *T. aestivum* – это аллогексоплоид, сформировавшийся в ходе эволюции в результате гибридизации трех различных геномов *T. urartu* (2n = 2x = 14; AA), *Aegilops speltoides* (2n = 14; SS) и *Aegilops tauschii* (2n = 6x = 42, AABBDD). Необходимо отметить, что несколько *ATG* генов у пшеницы представлено мультигенными семействами. Среди них *ATG2*, *ATG12*, *ATG13* и два больших семейства *ATG8* и *ATG18*. Обнаружено, что промоторные области *ATG* генов *T. aestivum* содержат регуляторные элементы, чувствительные ко многим стрессовым факторам, включая недостаток кислорода, тепловой и холодовой шок, засуху, обезвоживание, поранение и инфицирование грибами, а также гормонам. Это свидетельствует о том, что различные биотические и абиотические факторы могут быть вовлечены в регуляцию активности *ATG* генов. Важно отметить, что промоторные области гомеологичных генов внутри одного *ATG* семейства отличаются. Это, в свою очередь, означает, что гены одного семейства могут дифференциально экспрессироваться в процессе роста и развития растения и в ответ на различные стрессовые факторы.

Семейство ATG8 пшеницы представлено девятью членами, которые подразделяются на три подсемейства. Каждое подсемейство

включает себя три гена, расположенные на гомеологичных хромосомах 2L, 2S и 5L, соответственно. Структура всех генов ATG8 представлена пятью экзонами и четырьмя интронами, отличающимися между собой по длине. Все белки ATG8 имеют схожие структуры. В структуре ATG8 были обнаружены W и L сайты, с помощью которых белок взаимодействует с различными лигандами в процессе аутофагии. В настоящее время проводится активный поиск белков-лигандов, взаимодействующих с ATG8. Большинство белок-белковых взаимодействий осуществляется, в основном, посредством образования комплекса между аминокислотами W- и L-сайтов белка ATG8 и аминокислотами так называемого AIM-мотива белка-рецептора. С использованием iLIR web source и hfAIM tool среди идентифицированных нами коровых ATG белков *T. aestivum* были выявлены 11 кандидатов, содержащих AIM-мотив (AIMCPs). AIMCPs инициаторного комплекса включают ATG1 (за исключением ATG1t) и ATG11 белки; ATG9 комплекса – ATG2, ATG9 и ATG18; PI3P - киназного комплекса – ATG6 и VPS15; убиквитин-подобного комплекса– ATG3d, ATG4, ATG5 и ATG7. AIM-мотив был также найден у TOR белка. Некоторые белки содержат несколько потенциальных AIM-мотивов в своей аминокислотной последовательности. Более того, несколько потенциальных AIMCPs, таких как ATG9, ATG6, ATG3d, ATG4 и ATG5 перекрываются с внутренними неупорядочными регионами, также называемыми «Anchor». Считается, что эти области могут переключаться из неупорядоченного в упорядоченное состояние и принимать требуемую конформацию для взаимодействия с ATG8.

Таким образом, среди 18 идентифицированных коровых ATG белков *T. aestivum* выявлено 11 потенциальных кандидатов, содержащие AIM-мотив для связывания с ATG8. Сделано предположение о том, что ATG8 вносит ключевой вклад в определение сайта формирования аутофагосомы.

ВЛИЯНИЕ *Fusarium solani* НА КЛЮЧЕВЫЕ КОМПОНЕНТЫ АСКОРБАТ-ГЛУТАТИОНОВОГО ЦИКЛА СУСПЕНЗИОННЫХ КЛЕТОК КАРТОФЕЛЯ

О.А. Сапко, О.В. Чебоненко, А.К. Турсунова, А.Ж. Амиркулова, А.О. Абайлдаев, А.Ш. Утарбаева

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина» КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан; e-mail: olessjachebonenko@mail.ru

Адаптация растений к действию стрессов различной природы в значительной степени зависит от функционирования антиоксидантных систем защиты, поскольку «окислительный взрыв» является универсальной составляющей любого поражающего фактора [1]. Одним из метаболических путей, участвующим в детоксикации H_2O_2 и поддержании редокс-баланса клетки является система аскорбат–глутатионового цикла. АПО окисляет аскорбат в присутствии H_2O_2 с образованием гидроаскорбата и воды. Цикл включает монодегидроаскорбатредуктазу (МДАР), дегидроаскорбатредуктазу (ДАР) и глутатионредуктазу (ГР) [2, 3]. Удобной экспериментальной моделью для изучения стрессовых защитных ответов являются клеточные культуры *in vitro.*

Исследовали участие ключевых ферментов аскорбат-глутатионового цикла (АГЦ) аскорбатпероксидазы (АсПО), дигидроаскорбат-редуктазы (ДАР), глутатионредуктазы (ГР) и низкомолекулярных антиоксидантов – глютатиона (Гл) и аскорбиновой кислоты (АсК) в защитном ответе суспензионных клеток картофеля при инфицировании грибом *F.solani*. Анализировали два штамма суспензионных клеток, полученных из растений картофеля с контрастной устойчивостью к *F.solani*. Установлено, что в обоих штаммах изменение активности ферментов при инфицировании имеет двухфазный характер: быстрый отклик (0,5-6 часов) и более позднюю стадию реагирования (24-48 часов). В клетках суспензии, полученных из относительно устойчивого сорта на стадии быстрого ответа, регистрировали увеличение активности АсПО и ГР (35-52%) и подавление активности ДАР (на 20-25%). На более поздней стадии ответа, при увеличении внутриклеточного содержания H_2O_2 (в 2,8-3,7 раз) и досто-

верном снижении жизнеспособности клеток (некроз), наблюдали индукцию активности АсПО (в 3,2-3,5раз) и ГР (в 1,9-2,3 раза). Клетки чувствительного сорта, напротив, более интенсивно реагировали на быстрой фазе ответа индукцией активности всех ферментов АЦГ: АсПО в 2,2 раза, ГР в 2,7 раза и ДАР – в 1,8 раза. На поздней стадии ответа регистрировали усиление активности АсПО в 1,4-1,6 раза, активность ДАР на уровне контроля и подавление активности ГР в 1,7-2 раза по сравнению с исходным уровнем.

Исследована роль АсК и Гл в поддержании редокс-баланса суспензионных клеток картофеля. Общее содержание АсК в клетках суспензии (сорт Тамаша) варьирует от 200 до 400 мкМ/г сырого веса, в зависимости от стадии роста, при этом доля восстановленной формы не превышает 24%. При инфицировании суспензионных клеток конидиями гриба наблюдали падение общего (тотального) уровня и уровня окисленных форм АсК на 55-70% от исходного и увеличение относительного содержания восстановленной формы АК. Регистрировали две фазы увеличения доли восстановленной формы АсК: на ранней стадии ответа, с максимумом через 1 час (в 2,1-2,4 раза), и на более поздней фазе ответа, через 24 часа (в 3,5-3,7 раза). При инфицировании клеток суспензии наблюдали также двухфазную индукция биосинтеза Гл. На быстрой фазе ответа наблюдали незначительное увеличение активности окисленной и восстановленной форм (18-35%, 0,5-3 часа) и более позднее, через 24 часа значительное обратимое увеличение общего уровня и уровня окисленных форм Гл. Соотношение окисленной и восстановленной форм глутатиона играет важную роль в сохранении редокс-статуса, и, следовательно, возможности к адаптации растительных клеток. Наряду с возрастанием общего уровня Гл., проанализирована динамика перераспределения содержания окисленных и восстановленных форм. При инфицировании клеток суспензии наблюдается двухфазное накопление Гл, через 3 и 24 часа. Значительное обратимое увеличение уровня глутатиона через 24 часа относится к специфическому ответу и изменению метаболизма Гл. на инфицирование. Наряду с возрастанием общего уровня Гл, наблюдается преимущественное накопление окисленной формы, более чем в 3 раза по сравнению с контрольными клетками. Таким образом, специфическим ответом клеток картофеля *Solanum tuberosum* на инфицировании грибом *F. solani* является падение то-

тального уровня АсК (3-24 часа) и двухфазное обратимое увеличение относительного содержания восстановленной формы, и обратимая двухфазная индукция биосинтеза Гл с активной трансформацией восстановленной формы в окисленную.

1. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiol. Rev. 2002. V. 82. 47–95.

2. Dabrowska G., Kata A., Goccia A., Szechynska-Hebda M., Skrzypek E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family // Acta Biologya Cracoviensia. 2007. V. 49. № 1. P. 7-17.

3. Caverzan A., Passaia G., Rosa S.B., Ribeiro C.W., Lazzarotto F., Margis-Pinheiro M. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection // Genet. Mol. Biol. 2012. V. 35. P. 1011–1019.

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ *Fusarium solani* НА ФОРМИРОВАНИЕ РЕДОКС-СТАТУСА КЛЕТОК И ТКАНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

О.А. Сапко, О.В. Чебоненко, А.К. Турсунова, А.Ж. Амиркулова, А.О. Абайлдаев, А.Ш. Утарбаева

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина» КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан;
e-mail: olessjachebonenko@mail.ru

Грибные патогены используют различные стратегии для инфицирования растений, включая продукцию токсичных низкомолекулярных метаболитов, которые различаются по структуре, их роли в болезни и механизмам действия. Наряду с другими поражающими факторами, неспецифические фитотоксины индуцируют генерацию АФК, и во многих случаях развитие симптомов болезни объясняется этим механизмом [1, 2, 3]. В последнее время все большее подтверждение находит гипотеза, согласно которой адаптация растений к действию стрессоров различной природы в значительной степени зависит от функционирования антиоксидантных систем защиты, поскольку «окислительный взрыв» является универсальной составляющей любого поражающего фактора [4, 5].

Исследовано комплексное влияние внеклеточных метаболитов культурального фильтрата (КФ) и термостабильных метаболитов мицелия (ТММ) гриба *F. solani* на про- и антиоксидантные свойства клеток картофеля в условиях *in vitro u in vivo*: накопление H_2O_2, продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантных ферментов - каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД) и аскорбатпероксидазы (АсПО). Характер влияния на суспензионные клетки зависел от концентрации грибных метаболитов. Низкие дозы КФ вызывали усиление роста суспензионной культуры и достоверно не изменяли редокс-параметры клеток. Высокие дозы КФ (разведение 1/5, v/v) обладали цитостатической активностью. Обработка суспензионных клеток высокой дозой КФ вызвала обратимое увеличение концентрации H_2O_2 на 27-35% на ранней стадии ответа (через 2 - 4 часа) и достоверно не влияла на процессы ПОЛ. Установлено избирательное влияние метаболитов КФ на антиоксидантные ферменты, зависящее от локализации ферментов в клетке. Наблюдали усиление активности КАТ, цитоплазматических (в 2,7 и 2,2 раз с максимумами через 1 и 12 часов, соответственно) и внеклеточных форм (в 1,8 раз с максимумом через 0,5 часа). КФ избирательно индуцировал активность цитоплазматических форм СОД в 1,5-2,1 раза, необратимо подавлял активность внеклеточных форм (в 2,1-3,5 раз); и ингибировал активность цитоплазматических и внеклеточных форм АсПО, в 1,8-2,2 раза.

Фракция ТММ гриба обладала выраженным цитотоксическим действием, в том числе при использовании низких концентраций, при разведении 1/100. Наблюдался некроз клеток суспензии, усиление образования в них H_2O_2 и продуктов ПОЛ, подавление активности антиоксидантных ферментов. Скорость ответных реакций и величины откликов прямо пропорционально зависели от использованной концентрации ТММ.

Исследовано действие фракции ТММ на редокс-статус ткани клубней картофеля с разной устойчивостью к *F. solani*. Обработка дисков клубней фракцией ТММ вызывала снижение содержания H_2O_2 в клетках относительно устойчивого сорта (на 35-50%) и двухфазное повышение содержания H_2O_2 в клубнях чувствительного сорта, с максимумом через 1 час (180%) и 24 часа (190%). Влияние мицеллярных метаболитов на процессы ПОЛ в клубнях картофеля с

разной устойчивостью также отличались. ТММ незначительно усиливали процессы ПОЛ в относительно устойчивом сорте (на 20—25%, через 6 часов), а в чувствительном сорте наблюдали значительное усиление ПОЛ заметно позже, через 24 часа, в 1,8 раз превышающее контрольный уровень. Влияние мицеллярных метаболитов гриба на антиоксидантные ферменты клубней картофеля также зависело от их устойчивости. В устойчивом сорте (Тамаша) фракция ТММ обратимо подавляла активность СОД на ранней стадии обработки (через 30 минут, в 2,3 раза), а через 3 часа вызывала значительную индукцию (в 2,7 раза). В чувствительном сорте (Санта), наоборот, наблюдали индукцию активности СОД на ранней стадии ответа (в 2,3 раза через 30 минут) и заметное подавление активности через 24 часа (в 3 раза). ТММ существенно индуцировали активность КАТ. Уровень и динамика индукции зависели от устойчивости: в устойчивом сорте индукция КАТ регистрировалась через 6 и 24 часа (на 44 и 480%, соответственно), в чувствительном сорте наблюдалась обратимая двухфазная индукция на ранней стадии ответа (через 1 час и 6 часов, соответственно в 2,5 и 3 раза). Влияние ТММ на активность АсПО было значительно меньшим, чем на СОД и КАТ, и заметнее у чувствительного сорта (индукция активности на 35-45% с максимумом через 24 часа).

1. Knoche H.W., Duvick J.P. The role of fungal toxin in plant disease // Fungal infection in plant / Eds Pegg G.F. and Ayres P.G. Cambridge: Cambridge University Press. 1987. P. 158-191.

3. Сапко О.А., Утарбаева А.Ш., Макулбек С. Влияние фузариевой кислоты на про- и антиоксидантные свойства суспензионной культуры клеток картофеля //Физиология растений. 2011. Т. 58. № 5. С. 711-718.

2. Desmond O.J., Manners J.M., Stephens A.E., Maclean D.J., Schenk P.M., Gardiner D.M., Munn A.L., Kazan K. The Fusarium mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat // Molecular Plant Pathology. 2008. V. 9. P. 435-445.

4. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants. Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review // Ann. Bot. 2003. V. 91. P. 179-194.

5. Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants // Front. Environ. Sci. 2014. doi: 10.3389/fenvs.2014.00053.

РЕДОКС СТАТУС РАСТЕНИЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ, ГИПЕРТЕРМИИ И ИХ СОЧЕТАНИИ

Я.В. Середнева, А.П. Веселов, Ю.В. Синицына
ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия
e-mail: seredneva.yana@mail.ru

Редокс статус организма – это баланс между прооксидантными компонентами – активными формами кислорода (АФК) и антиоксидантной системой. Под воздействием негативных факторов, например, гипертермии редокс статус может смещаться в строну прооксидантных компонентов, что ведёт к нарушению физиологических процессов в организме. Предполагается, что переменное магнитное поле способно снижать негативное действие гипертермии, не давая редокс статусу смещатся в сторону прооксидантов, то есть не допускать накопления АФК.

Исследовали влияние переменного магнитного поля (ПеМП), гипертермии и их сочетанного воздействия на следующие параметры растений гороха: рост надземной части, содержание гидроперекисей, пероксида водорода, активность каталазы, скорость реакции Хилла, количество фотосинтетических пигментов и параметры флуоресценции хлорофилла. Объектом исследования служили растения гороха *Pisum sativum L.* сорта «Альбумен», выращенные в климатической камере при температуре 23°С и 16-часовом световом дне. Для генерации магнитного поля использовалась магнитотерапевтическая установка VL-2 (ElectroBiology Inc., США), создававшая импульсное низкоинтенсивное магнитное поле со значением магнитной индукции 1,5 мТл, частотой магнитного поля 15 Гц. Контролем служили растения, выдержанные в условиях геомагнитного поля. Исследования фотосинтетических параметров проводили на приборе Imaging-PAM M-Series: MINI («HainzWalz», Германия). Условия гипертермии подбирали индивидуально для каждого исследуемого параметра.

Получасовая обработка ПеМП снижала содержание гидроперекисей

кисей в хлоропластах на 17 %, 2 часовая - на 23%. Гипертермия (42°С) увеличивала концентрацию гидроперекисей в хлоропластах гороха на 26% при 30 минутной обработке и на 40% при 15 минутной по сравнению с контролем. Если растения, обработанные гипертермией, помещали в ПеМП, то снижения гидроперекисей не происходило. В случае, когда растения перед действием гипертермии обрабатывали ПеМП в течении 2 часов, наблюдалось снижение гидроперекисей на 12% по сравнению с контролем.

30-минутная обработка ПеМП приводила к снижению продукции H_2O_2 в клетках листьев гороха на 19%. 30-минутное воздействие гипертермии (42°С) приводило к увеличению H_2O_2, на 26% по сравнению с контролем. Предварительная обработка ПеМП перед воздействием гипертермии позволяла удержать уровень H_2O_2 на уровне контрольных значений.

Так как каталаза является индуцибельным ферментом, то снижение H_2O_2 приводит к снижению её активности, а повышение H_2O_2 – к повышению. Воздействие ПеМП (30 мин) и гипертермии (42°С, 30 мин.) на активность каталазы имело разновекторную направленность. Под влиянием ПеМП активность фермента снижалась на 30%, гипертермия же, напротив, повышала активность на 30%. Выдерживание гипертермированных растений в ПеМП не отличалось по эффекту от выдерживания в нормальных условиях: происходило снижение активности фермента до контрольных значений. Предваряющая гипертермию обработка ПеМП приводила к снижению активности каталазы на 20%, что сравнимо с обработкой одним ПеМП.

Таким образом, гипертермия приводила к смещению редокс статуса растений гороха в сторону накопления АФК (гидроперекисей и H_2O_2). ПеМП смещало редокс статус в стророну восстановления, так как в качестве самостоятельного фактора приводило к снижению количества пероксидов и H_2O_2, а при последующем действии гипертермии не допускало их повышения.

Так как фотосинтетичские процессы представляют собой последовательность окислительно-восстановительных реакций, то можно предположить, что гипертермия и ПеМП могут их изменять.

ПеМП поле не вызывало существенных изменений скорости реакции Хилла. Гипертермия (42˚С 30 мин.) приводила к полуторакратному снижению скорости данного процесса. Предварительная обра-

ботка растений ПеМП в течение 30 мин. или 2 часов перед гипертермией препятствовало сильному снижению скорости реакции Хилла. Обработка магнитным полем растений, подвергнутых гипертермии эффекта не имела.

ПеМП не влияло на количество фотосинтетичеких пигментов и их соотношение, гипертермия снижала количество каротиноидов. Предварительная обработка ПеМП снимала данный эффект гипертермии – количество пигментов оставалось на уровне, сравнимым с контрольным. Каротиноиды являются компонентом атиоксидантной системы организмов. Под воздействием гипертермии увеличивался синтез АФК и как следствие, каротиноиды распадались. Предварительная обработка ПеМП не допускала повышения АФК, и каротиноиды не разрушались.

Гипертермия (50˚С, 3 мин.) снижала максимальный уровень флуоресценции Fm и максимальный квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы II (Fv/Fm). Обработка ПеМП в течение 2 часов повышала значение Fm. Предваряющая гипертермию экспозиция в ПеМП способствовала сохранению высокого значения Fm, однако показатель F0 повышался, что говорит о развиитии нарушений в фотосинтетическом аппарате.

Гипертермия резко снижала квантовый выход фотосистемы II (YII), скорость потока электронов (ETR), уровень фотохимического тушения (qP). ПеМП не оказывало существенного влияния на эти параметры у растений как находившихся в нормальных температурных условиях, так и подвергшихся воздействию гипертермии.

И гипертермия, и ПеМП снижали уровень нефотохимического тушения NPQ. Их сочетанное воздействие имели наиболее ярко выраженный эффект.

Гипертермия вначале вызывала снижение квантового выхода контролируемого рассеивания энергии Y(NPQ), затем происходило его плавное и стабильное повышение, при этом данный показатель у контрольных растений медленно, но стабильно снижался. Сочетанное воздействие ПеМП и гипертермии вызывало более резкое и быстрое возрастание Y(NPQ).

Гипертермия вызывала повышение уровня квантового выхода неконтролируемого рассеивания энергии Y(NO). Воздействие ПеМП приводило к некоторому повышению данного показателя, однако в

процессе измерения наблюдалось его постепенное снижение, и к концу измерений он сравнивался с таковым у контрольных растений. Сочетанная обработка ПемП и гипертермией приводила к более выраженному увеличению Y(NO) по сравнению с обработкой только гипертермией.

Смещение редокс статуса растений в сторону увеличения синтеза АФК может приводить к торможению их физиологических функций; в свою очередь, предупреждение накопления АФК могло бы снять подобные эффекты. При обработке проростков гороха ПеМП прирост как контрольных, так обработанных ПеМП растений через 4 дня после обработки составлял в среднем 11 см. Под воздействием гипертермии (42°С, 30 мин.) рост надземной части ингибировался (прирост составил 1,5 см). Если растения перед обработкой гипертермией помещали в ПеМП, то наблюдалось смягчение негативного действия гипертермии – прирост растений, обработанных последовательно ПеМП и гипертемией составлял 3,8 см (30 мин ПеМП, 30 мин гипертермия) и 6,6 см (2 часа ПеМП, 30 мин гипертермия).

Рассматривая влияние гипертермии и ПеМП на параметры флуоресценции хлорофилла и связанные с ней показатели можно заметить парадоксальный эффект. Предварительная обработка ПеМП приводила к скорее, негативным последствиям (увеличение показателя F0, повышение квантового выхода неконтролируемого рассеивания энергии), в то время как мы заметили ранее, что подобная предобработка не допускала накопления H_2O_2 в растениях и прочих проявлений воздействия гипертермии.

Таким образом, несмотря на то, что повышение показателя F0 и квантового выхода нерегулируемого рассеивания энергии являются тревожными сигналами, у растений, обработанных сочетанным воздействием магнитного поля и гипертермии, не наблюдалось серьёзных нарушений на биохимическом и физиологическом уровнях и смещения редокс статуса в сторону синтеза АФК. Напротив, можно отметить выраженное протекторное действие магнитного поля. Магнитное поле как самостоятельный фактор вызывало уменьшение количества гидроперекисей и H_2O_2, а в качестве предварительной обработки перед воздействием гипертермии не допускало накопления гидроперекисей и H_2O_2, разрушения каротиноидов, снижения реакции Хилла и ингибирования роста растений.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ *Zea mays* L. В УСЛОВИЯХ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

Н.А. Собчук, С.И. Чмелёва

Таврическая Академия ФГОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», г. Симферополь, Россия; e-mail: sob4uk.n@gmail.com

В настоящие время в Республике Крым в связи с возрастающим антропогенным воздействием актуальной является проблема устойчивости культурных растений к осмотическому стрессу, вызванному высоким содержанием солей в почве.

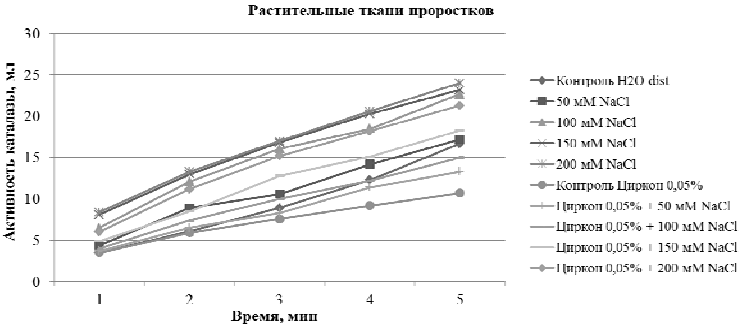
Активность антиоксидантной системы является одним из механизмов защиты растений от неблагоприятных факторов среды [3]. Работа антиоксидантной системы в первую очередь сводится к подавлению образования свободных радикалов [2]. Для защиты от окислительного стресса растительные клетки содержат конъюгированные ферменты, обезвреживающие кислородные радикалы, такие как супероксиддисмутазу (СОД), аскорбатпероксидазу (АПО), каталазу, и др. [4, 7]. Каталаза – антиоксидантный фермент, который способствует быстрой утилизации перекиси водорода, катализирует дисмутацию перекиси до воды и кислорода. В окисленном состоянии каталаза может работать как пероксидаза, катализируя окисление до альдегидов [6].

Для увеличения урожайности и повышения солеустойчивости культурных растений применяют различные стимуляторы роста [1, 9]. К перспективным в использовании и экологически безопасным регуляторам роста и развития относится Циркон. В своей основе препарат содержит различные природные компоненты, которые в целом действуют на растение как комплексный стимулятор роста [5, 8]. Так как влияние данного препарата на растения кукурузы в условиях солевого стресса достаточно не изучено, целью нашей работы было изучение действия препарата Циркон на активность каталазы в растениях *Zea mays* L. CV /ТАР 349 МВ/ в условиях солевого стресса.

При постановке исследования семена закладывали в кюветы на фильтровальную бумагу по 50 шт. Для моделирования осмотического

стресса в кюветы приливали по 300 мл раствора с различными вариантами концентрации солей NaCl (50 мМ; 100 мМ; 150 мМ; 200 мМ; контроль 1 – дистиллированная вода). Для исследования действия препарата Циркон на прорастание семян кукурузы при осмотическом стрессе использовали вышеперечисленные концентрации NaCl с добавлением 0,05 % регулятора роста (контроль 2 – 0,05 % Циркон). 4 – дневные проростки переносили на водную культуру (среда Кнопа) в вегетационные сосуды емкостью 0,5 л. Активность каталазы определяли газометрическим методом у 7 – дневных растений в растительных тканях надземной части и корней [10].

А



Б

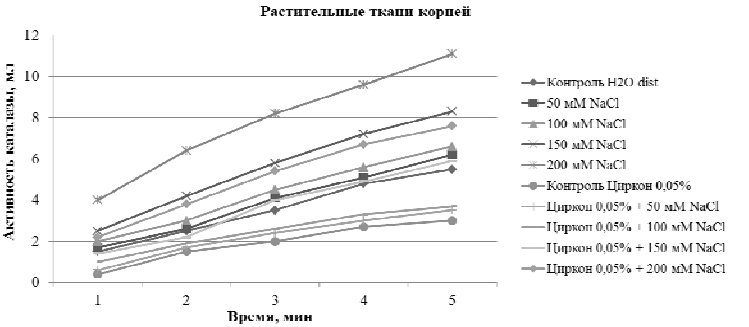


Рис. 1. Влияние препарата Циркон на активность каталазы в растительных тканях проростков (А) и корней (Б) *Zea mays* L., CV / ТАР 349 МВ в условии осмотического стресса.

В результате анализа данных опыта по влиянию регулятора роста на активность каталазы в растительных тканях растений кукурузы в условиях солевого стресса, отмечено позитивное регулирующее действие Циркона на исследуемый показатель. Выявлен динамический равномерный рост активности фермента каталазы на протяжении исследуемого времени. Активность фермента при добавлении стимулятора роста во всех вариантах опыта по сравнению с контролем 1 и вариантами солевых растворов пониженная на протяжении всего периода измерений. Так, спустя 5 минут активность каталазы в растительных тканях надземной части в варианте 50 мМ NaCl на 22,7 % выше, чем в варианте Циркон 0,05 % + 50 мМ NaCl, а в варианте 200 мМ NaCl – повышена на 11,3 % по сравнению с вариантом Циркон 0,05 % + 200 мМ NaCl. Активность каталазы в растительных тканях корней спустя 5 минут опыта в варианте 100 мМ NaCl на 44 % выше, чем в варианте Циркон 0,05 % + 100 мМ NaCl, а в варианте 150 мМ NaCl повышена на 28,9 % по сравнению с вариантом Циркон 0,05 % + 150 мМ NaCl.

Так как исследуемые опытные растения испытывали меньший окислительный стресс по сравнению с контролем 1 и вариантами солевых растворов, полученные нами данные подтверждают антиоксидантное защитное действие регулятора роста Циркон.

Предварительное замачивание семян в растворе изучаемого синтетического регулятора роста с концентрацией 0,05 % повышает солеустойчивость растений Zea mays L., CV / ТАР 349, что в свою очередь повысит качество растений и повлияет на их продуктивность.

1. Бугара А.М., Кабузенко С.Н., Омельченко А.В. Влияние препарата «Geoplus» на устойчивость к засолению и засухе растений кукурузы на ранних этапах онтогенеза // Ученые записки Таврического национального университета имени В. И. Вернадского. Серия: Биология, химия. 2006. Т. 19 (58), № 1. С. 3–7.

2. Карташов А.В., Шевряков Н.И., Кузнецов В.В. Роль систем антиоксидантной защиты при адаптации дикорастущих видов растений // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 4. С. 516–522.

3. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи современной биологии. 1993. Т.ИЗ, № 4. С. 456–470.

4. 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. № 6. С. 878–885.

5. Малеванная Н.Н. Ростостимулирующая и иммуномодулирующая активности природного комплекса гидроксикоричных кислот (препарат Циркон) // IV Международная научная конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2005. С. 141.

6. Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 3. С. 459–462.

7. Прадедова Е.В., Имеева О.Д, Саляев Р.К. Ферменты антиоксидантной защиты вакуолей корнеплодв столовой свеклы // Физиология растений. 2011. Т 58. № 1. С. 40–48.

8. Собчук Н.А., Чмелёва С.И. Влияние предпосевной обработки препаратом Циркон на митотическую активность апикальной меристемы корней кукурузы // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. 2015. Т. 1 (67), № 1. С. 107–114.

9. Чмелева С.И., Кучер Е.Н., Дашкевич Ю.О. Влияние препарата Циркон на рост и развитие растений кукурузы на начальных этапах онтогенеза в условиях почвенной засухи // Ученые записки Таврического национального университета имени В. И. Вернадского. Серия: Биология, химия. 2014. Т. 27 (66), № 1. С. 223–231.

10. Чмелева С.И., Решетник Г.В., Кучер Е.Н. Методические материалы и задания для проведения лабораторного практикума по курсу «ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ». Симферополь, 2013. С. 56–57.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ ОТВЕТЫ У ВИНОГРАДА ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ГРИБНЫМИ ПАТОГЕНАМИ

М.А. Сундырева

ФГБНУ Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, г. Краснодар, Россия; e-mail: taurim2012@yandex.ru

Одним из путей интенсификации производства винограда является использование агротехнологий, основанных на анализе и применении биологических свойств генотипов растений, таких как их естественная резистентность. Значительный ущерб отрасли виноградарства наносят болезни, вызываемые грибными фитопатогенами. Для культуры винограда среди возделываемых сортов, относящихся к виду *Vitis vinifera L.* либо к его межвидовым гибридам, отсутствуют иммунные к распространенным грибным болезням генотипы [1, 2]. После взаимодействия патогена и растения-хозяина самой быстрой первичной реакцией является накопление активных форм кислорода (АФК), которые оказывают прямое токсическое действие на патогены [3], служат сигнальными молекулами, активируя гены устойчивости, вызывают укрепление клеточных стенок и синтез метаболитов иммунного ответа, участвуют в реакции сверхчувствительности [4]. Для винограда большое значение имеет окислительное преобразование специфического фитоалексина ресвератрола в фитотоксичные производные. [5]. Высокие концентрации АФК токсичны для растения, поэтому их образование сопровождается синтезом антиоксидантных ферментов и метаболитов. Задачей исследования являлось выявление связи процессов окисления, антиоксидантных процессов и ответными реакциями на биотический стресс у растений винограда с различной устойчивостью при заражении патогеном. Объектами исследования являлись растения двух сортов винограда: Восторг и Мускат белый, контрастные по устойчивости к милдью (*Plasmopara viticola Berl. et Toni*). Поражаемость милдью сорта Восторг составляет 1 балл, а сорта Мускат белый – 4 балла [6].

Оценку уровня перекисного окисления липидов проводили по образованию малонового диальдегида (МДА), который служит маркером развития окислительного стресса и показывает степень повреждающего

действия стрессора. У обоих изучаемых сортов наблюдается спад уровня МДА относительно контрольных растений через 48 часов после заражения, с последующим выраженным повышением через 72 часа у сорта Восторг и 96 часов у сорта Мускат белый. Зараженные растения сорта Восторг в целом характеризуются более низким содержанием МДА в листьях, чем растения сорта Мускат белый. Следует отметить, что после увеличения через 72 часа после инокуляции содержание МДА в листьях сорта Восторг остается примерно на одном уровне, а у сорта Мускат белый увеличивается в течение всего анализируемого периода. Активность пероксидазы значительно изменялась в течение эксперимента. У устойчивого сорта Восторг через 72 часа после инокуляции изменяется также и изоферментный спектр пероксидазы: снижается активность изоформ массой 60 и 40 кДа. Синтезируется дополнительная изоформа массой 30 кДа. У неустойчивого сорта Мускат белый изменений нет. Более высокая активность пероксидазы в листьях устойчивого сорта Восторг согласуется с низким содержанием МДА относительно сорта Мускат белый. На начальных этапах развития биотического стресса, до формирования специфических ответных реакций происходит использование и преобразование имеющегося пула метаболитов. Фенольные компоненты в связи с их антифунгальной активностью играют большую роль [7], что связано с цитотоксичностью продуктов их окисления [8]. Фенольные соединения могут служить субстратом для пероксидаз. Наибольшие отличия между сортами проявляются в содержании кумаровой, дегидробензойной, кофейной и хлорогеновой кислот, являющихся элементами шикиматного пути биосинтеза фенольных соединений. В целом в листьях устойчивого сорта Восторг содержалось меньше фенольных соединений, чем в листьях сорта Мукат белый. Содержание кофейной кислоты - предшественника лигнина клеточной стенки у сорта Мускат белый возрастало в течение анализируемого периода, что может свидетельствовать о неспецифическом адаптивном ответе этого сорта на развитие патогена, но не дальнейших процессах ее метаболизации при низкой активности пероксидазы. Предположительно, фенольные соединения расходуются на замедление развития инфекции *P. viticola* у устойчивых генотипов. Конститутивные гидроксикоричные кислоты не оказывают значительного влияния на защитную реакцию [8]. Данный факт, может быть подтверждением значимости направленных процессов окисления фенольных компонентов в вегетативных органах устойчивых к милдью генотипов

винограда, что подтверждается высокой активностью пероксидазы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-60154 мол-а-дк

1. Boso S., Kassemeyer H. H. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew // Vitis. 2008. V. 47 (1). P. 39–49

2. Gindro K., Alonso-Villaverde V., Voinesco F., Spring J.L., Viret O., Dubuis P.H. Susceptibility to downy mildew in grape clusters: New microscopical and biochemical insights // Plant Physiology and Biochemistry. 2012. V.52. P. 140-146

3. Плотникова Л.Я. Иммунитет растений и селекция на устойчивость к болезням и вредителям / Под ред. Ю.Т. Дьякова. – М.: КолосС, 2007. – 359 с.

4. Elato D.W., Stulemeijer I.J., van Esse H.P., de Vos R.C., Boumeester H.J. Joosten M.H. System-wide hypersensitive response-assosiated trasnscriptome and metabolome reprogramming in tomato // Plant Physiol. 2013. V. 162. P. 1599-1617

5. Alonso-Villaverde V., Voinesco F., Viret O., Spring J. L., Gindro K. The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during Plasmopara viticola infection process. Plant Phisiol. Biochem. 2011. V. 49. P. 265-274

6. Анапская ампелографическая коллекция. Краснодар, 2009. 215 с.

7. Hammershmidt R. Phenols and plant pathogen interaction: the saga continues // Physiol. Mol. Plant Pathol. 2005. V. 66. P. 77-78

8. Macoy D.M., Kim W-Y., Lee S.Y., Kim M.G. Biotic stress related functions of hydroxycinnamic acid amide in plants // J. Plant Biol. 2015 V. 58. P. 156-163

РЕГУЛЯЦИЯ АВТОФАГИИ У РАСТЕНИЙ ПРИ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Е.В.Тютерева[1], К.К. Рабаданова[1], А.Н. Иванова[1], К.С. Добрякова[1], В.В. Демидчик[1,2], О.В. Войцеховская[1]

[1]ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: ovoitse@binran.ru

[2] *Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

Автофагия - катаболический путь деградации компонентов эукариотической клетки в кислых литических компартментах. Будучи одним из основных путей утилизации повреждённых компонентов клетки и рециклирования макромолекул, автофагия протекает в клетке постоянно (т.н. «базальная», или «конститутивная», автофагия). Кроме того, автофагия индуцируется в ответ на углеродное и/или азотное голодание, а также при различных видах стрессов, включая оксидативный, солевой и осмотический [1]. В определенных органах растений – таких, как созревающие элементы ксилемы или суспензор зародышей голосеменных - автофагическая деградация запускается как часть программы клеточной смерти, необходимой для дифференциации органа [2]. Кроме того, в листьях растений «ночная автофагия» (nocturnal autophagy) представляет собой важный путь утилизации транзиторного крахмала [3].

Стресс-индуцируемая автофагия может выступать цитопротекторным механизмом, способствующим выживанию клетки в неблагоприятных условиях. В то же время, в определенных условиях активация автофагии в клетке способствует запуску программы клеточной смерти. Расшифровка организации и регуляции автофагической системы растительной клетки, в которую вовлекается несколько десятков белков, имеет фундаментальное значение для понимания процессов катаболизма, иммунитета, стрессоустойчивости и продуктивности высших растений [4]. В данной работе исследовано влияние таких факторов как гипоосмотический и солевой стресс на индукцию автофагии в корнях *Arabidopsis thaliana*. На другой модели – гетеротрофной суспензионной культуре клеток *Nicotiana tabacum* BY-2 – мы исследовали взаимосвязь между автофагией, компонентами антиоксидантной защиты клетки и клеточной гибелью.

Результаты изучения влияния гипоосмотического стресса на индукцию автофагии в корнях растений арабидопсиса показывают, что белок ATG8a может участвовать в эндоцитозе, индуцируемом в клетках корня при переносе в гипоосмотическую среду. Таким образом, частичное вовлечение клеточных структур, специфичных для автофагии, в процессы эндоцитоза необходимо учитывать при изучении роли автофагии в растительных клетках. Результаты изучения влияния

солевого стресса на индукцию автофагии позволили выявить взаимосвязь между выходом калия из клеток корня и развитием автофагии. Снижение активности наружу-выпрямляющих K^+-каналов GORK у нокаутных линий *gork1-1* замедляет развитие автофагии при воздействии солевого стресса в корнях *A. thaliana*, свидетельствуя в пользу роли калия как модулятора автофагии в клетках растений [5, 6]. Результаты изучения динамики пероксисомного пула в клетках суспензионной культуры табака позволили заключить, что уровень пероксисомного белка каталазы и ее каталитическая активность связаны с запуском автофагии и клеточной гибелью. Возможно, автофагическая деградация каталазы в растительной клетке служит триггером автофагического типа клеточной гибели по механизму feed-forward регуляции [7]. В целом результаты обнаруживают новые закономерности функционирования автофагического комплекса у высших растений.

Исследования поддержаны РНФ (грант №15-14-30008). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург) и Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

1. Liu Y, Bassham DC Autophagy: pathways for self-eating in plant cells // Annual Review of Plant Biology. 2012. Vol. 63. P. 215-37.

2. Minina, E. A., Filonova, L. H., Fukada, K., Savenkov, E. I., Gogvadze, V., Clapham, D., … Bozhkov, P. V. Autophagy and metacaspase determine the mode of cell death in plants // The Journal of Cell Biology. 2013.Vol. 203(6). P. 917–927.

3. Wang, Y., & Liu, Y. Autophagic degradation of leaf starch in plants //Autophagy. 2013. Vol. 9. 1247–1248.

4. Hackenberg T, Juul T, Auzina A, Gwiżdż S, Małolepszy A, Van Der Kelen K, Dam S, Bressendorff S, Lorentzen A, Roepstorff P, Nielsen KL, Jørgensen J-E, Hofius D, Van Breusegem F, Petersen M, Andersen SU Catalase and NO CATALASE ACTIVITY1 promote autophagy-dependent cell death in Arabidopsis // The Plant Cell. 2013. Vol. 25,. P. 4616–4626.

5. Demidchik V., Cuin T.A., Svistunenko D., Smith S.J., Miller A.J., Shabala S., Sokolik A., Yurin V. Arabidopsis root K^+ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic ba-

sis and involvement in stress-induced cell death // Journal of Cell Science. 2010. Vol. 123. P. 1468-1479.

6. Demidchik V., Tyutereva E.V., Voitsekhovskaja O.V. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses // Functional Plant Biol. 2017. In press.

7. Tyutereva E.V., Dobryakova K.S., Schiermeyer A., Shishova M.F., Pawlowski K., Demidchik V., Reumann S., Voitsekhovskaja O.V. The levels of peroxisomal catalase protein and activity modulate the onset of cell death in tobacco BY-2 cells via reactive oxygen species levels and autophagy // Functional Plant Biol. 2017. In press.

ТЕКУЧЕСТЬ МЕМБРАН И РЕДОКС-КОНТРОЛЬ СТРЕССОВЫХ ОТВЕТОВ У ЦИАНОБАКТЕРИЙ

П.В. Федураев[1,2], Е.Г. Максимов[3], К.С. Миронов[1], М.А. Синетова[1], А.А. Зорина[1], Д.А. Лось[1*]

[1] Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия; [*]e-mail: losda@ippras.ru

[2] Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград

[3] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

От текучести мембран зависит множество клеточных реакций на изменения температуры окружающей среды [1]. Бактерии воспринимают снижение температуры гистидин-киназами (Hik), которые ощущают уплотнение цитоплазматической мембраны при охлаждении. У цианобактерии *Synechocystis* около половины чувствительных к холоду генов контролируется светозависимой трансмембранной Hik33 [2, 3], которая также частично контролирует реакции клеток на осмотический, солевой и окислительный стресс [1]. Это подразумевает существование некоторого универсального сигнала, который запускает адаптивную генную экспрессию в ответ на различные стрессоры [4]. Мы исследовали активность компонентов фотосинтетического аппарата и термодинамику тилакоидных мембран в клетках с генетически уплотненными мембранами. Оказалось, что скорость

окисления и восстановления пула хинонов (ПХ), которые взаимодействует как с фотосинтетическими, так и с респираторными электронными транспортными цепями (ЭТЦ), зависит от текучести мембран [5]. Таким образом, зависящие от текучести изменения редокс-состояния ПХ могут активировать клеточные реакции на разные стрессоры, которые влияют на свойства мембраны.

Клетки *Synechocystis*, выращенные при оптимальной (30-35°C) температуре, адаптируются к холодному стрессу (20-22°C), регулируя текучесть мембраны с помощью десатураз жирных кислот (ДЖК), которые увеличивают количество двойных связей в ЖК мембранных липидов. Мы предположили, что различия в текучести мембран должны влиять на скорость диффузии пластохинона и, соответственно, скорость транспорта электронов на донорной стороне фотосистемы 1 (ФС1). Степень восстановления $P700^+$ оценивали по данным модулированного отражения (МО). Начальная часть MR (100 мкс – 10 мс) не зависит от температуры в диапазоне 5-45°C, но сильно зависит от плотности потока фотонов, указывая, что он контролируется фотоактивированным образованием $P700^+$. Далее, в диапазоне 10^{-2}-10 сек, сигнал МО сильно зависит от температуры, но не от плотности потока фотонов. Это означает, что восстановление $P700^+$ зависит от скорости окисления ПХ комплексом цитохрома *b6f*.

При 32°C клетки дикого типа (ДТ) и двойного мутанта *Synechocystis* $desA^-/desD^-$ с выключенными Δ12- и Δ6-ДЖК (AD) [5] показывают сходные скорости восстановления $P700^+$. Однако при 25°C в клетках AD скорость восстановления $P700^+$ значительно ниже, чем у WT, что свидетельствует о важности ДЖК для регуляции работы ЭТЦ при холодовом стрессе. Таким образом, при низкой температуре 1) регулирование редокс-состояния ПХ зависит от текучести мембраны, которая регулируется Δ12- и Δ6-ДЖК, однако 2) десатурация мембранных липидов не является единственным механизмом, который контролирует редокс-состояние ПХ.

Скорости восстановления Q_A сопоставимы в клетках ДТ и AD при всех исследованных температурах. Однако скорость восстановления Q_B и обмена восстановленного вторичного хинона с ПХ зависит от температуры у ДТ, и не зависит у AD [6]. Это говорит о том, что обмен ПХ между ФС2 и мембранным пулом зависит от степени десатурации ЖК в липидах, образующих карман Q_B. Клетки AD кон-

ститутивно синтезируют только насыщенные и мононенасыщенные ЖК и не могут регулировать степень ненасыщенности ЖК (текучесть). Поэтому восстановление Q_B не реагирует на изменения температуры. Таким образом, скорость окисления и восстановления, а также обмена ПХ, зависит от текучести мембран, которая в основном регулируется ДЖК.

Температурозависимые изменения редокс-состояния ПХ можно индуцировать с помощью ингибиторов ЭТЦ – окислителем диуроном (ДДМ) и/или восстановителем дибромтимохиноном (ДБТХ) без изменения температуры. При 32°C ген *ndhD2* (НАДН-дегидрогеназа) индуцируется сильным светом и ДДМ в клетках ДТ и AD, однако индукция в AD была заметно ниже. ДБТХ индуцировал *ndhD2* и *desB* (теминальная десатураза) примерно одинаково в клетках ДТ и AD. Это означает, что редокс-зависимая транскрипция этих двух генов менее чувствительна к окислению ПХ сильным светом и ДДМ в клетках с жесткими мембранами (AD). Сильный свет и холодовой шок индуцируют *hliB*, продукт которого связан с тримерами ФС1 и защищает ее в стрессовых условиях. Ген *prg5* участвует в циклическом потоке электронов вокруг ФС1. Гены *hliB* и *prg5* сильно индуцируются в клетках AD при восстановлении ПХ.

Таким образом, температурозависимые изменения скорости восстановления и окисления ПХ зависят от текучести мембран и регулируют экспрессию генов стрессового ответа. Другими словами – энергетические потоки у цианобактерий определяются и регулируются физическими свойствами мембран.

Работа поддержана грантом РНФ № 14-24-00020.

1. Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions // *Photosynth. Res.* 2013. V. 116. P. 489–509.

2. Mironov K.S., Sidorov R.A., Trofimova M.S., Bedbenov V.S., Tsydendambaev V.S., Allakhverdiev S.I., Los D.A. Light-dependent cold-induced fatty acid unsaturation, changes in membrane fluidity, and alterations in gene expression in *Synechocystis*. *Biochim. Biophys. Acta* (Bioenergetics) 2012. 1817: 1352–1359.

3. Mironov K.S., Sidorov R.A., Kreslavski V.D., Bedbenov V.S., Tsydendambaev V.D., Los D.A. Cold-induced gene expression and ω3

fatty acid unsaturation is controlled by red light in *Synechocystis* // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2014. V. 137. P. 84–88.

4. Sinetova M.A., Los D.A. Systemic analysis of transcriptomics of *Synechocystis*: common stress genes and their universal triggers // *Mol. BioSyst.* 2016. V. 12. 3254–3258.

5. Миронов К.С., Максимов Е.Г., Максимов Г.В., Лось Д.А. Обратная связь между текучестью мембран и транскрипцией гена *desB*, кодирующего ω3-десатуразу жирных кислот у цианобактерии *Synechocystis* // *Молекулярная биология* 2012. Т. 46. С. 147–155.

6. Maksimov E.G., Mironov K.S., Trofimova M.S., Nechaeva N.L., Todorenko D.A., Klementiev K.E., Tsoraev G.V., Tyutyaev E.V., Zorina A.A., Feduraev P.V., Allakhverdiev S.I., Paschenko V.Z., Los D.A. Membrane fluidity controls redox-regulated cold stress responses in cyanobacteria // *Photosynth. Res.* 2017. – in press. doi: 10.1007/s11120-017-0337-3.

РОЛЬ ПРОТЕИНОГЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ АРОМАТИЧЕСКОГО РЯДА В РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА ПОЛИФЕНОЛОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

П.В. Федураев, Л.Н. Скрыпник, Г.Н. Чупахина

ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, г. Калининград, Россия;
e-mail: pfeduraev@kantiana.ru

Как показывают исследования, одним из основных факторов образования фенольных соединений в растениях, является наличие достаточного количества необходимых для биосинтеза соединений [1]. В качестве субстратов были использованы протеиногенные аминокислоты ароматического ряда: фенилаланин и тирозин.

Специфические вторичные превращения, ведущие к биосинтезу фенольных соединений берут начало от одного-единственного продукта шикиматного пути - фенилаланина. Роль тирозина в синтетических путях полифенолов не так очевидна, однако, стоит отметить, что биосинтез полифенолов по шикиматному пути проходит через образование пара-гидроксибензоата, который в свою очередь может образовываться из тирозина [2].

В качестве объекта исследования нами был выбрана щавель курчавый. Листья щавеля курчавого помещались в раствор тирозина и фенилаланина, заданных концентраций (100, 200, 300, 400 и 500 мкМ), и экспонировались в течение одного, двух, 4 и 8 часов. В качестве контроля выступала дистиллированная вода. В растительных образцах количественно определяли сумму полифенольных соединений, методом берлинской лазури [3]. Опыты проводили в трех биологических повторностях. Все данные представлены в пересчете на грамм сухого вещества. Данные представлены в виде средних арифметических значений с указанием среднего квадратического отклонения.

Анализ суммарного содержания полифенолов показал, что после 8 часовой экспозиции концентрация определяемых соединений начинает снижаться, вне зависимости от концентрации субстрата.

Оптимальной концентрацией тирозина в качестве субстрата при накоплении полифенолов стала - 500мкМ. Остальные же концентрации -100, 200, 300, 400 мкМ показали меньшую субстратную эффективность.

Исследование действия экзогенного фенилаланина на пул полифенолов щавеля курчавого показало, что при длительной экспозиции (4, 8 часов) в растворах с концентрацией 100 и 500 мкМ стимулировалось накопление фенольных соединений.

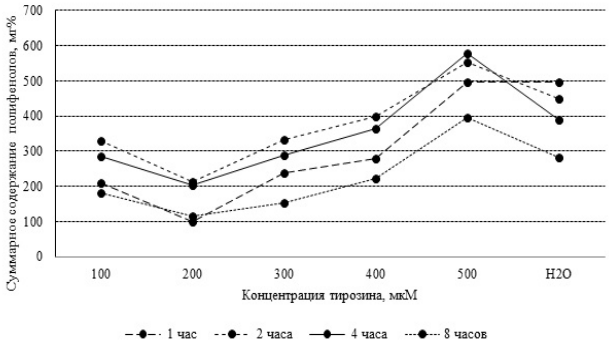


Рисунок 1. Влияние различных концентраций nbhjpbyf на накопление суммарного содержания полифенолов в листьях щавеля курчавого при экспозиции на 1, 2, 4 и 8 часов.

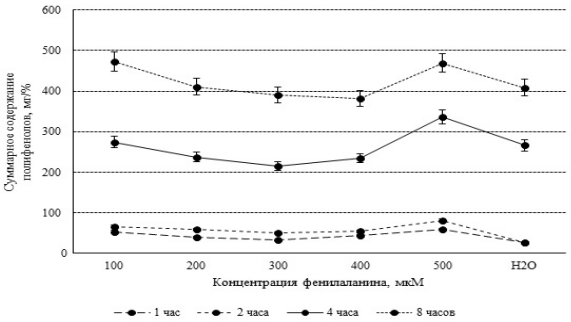


Рисунок 2. Влияние различных концентраций фенилаланина на накопление суммарного содержания полифенолов в листьях щавеля курчавого при экспозиции на 1, 2, 4 и 8 часов.

1. Falcone M. L., Ferreyra, S.P., Rius, Casati, P. (2012) Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Front. Plant Sci., 3, 1-15.

2. Запрометов М. Н. Основы биохимии фенольных соединений. Москва «Высшая школа». 1974. 98-113 с.

3. Price, M.L., Butler, L.G. .1977. Rapid visual estimulation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry 25: 1268-1273.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ЭЛИСИТОРЫ КАК РЕДОКС-РЕГУЛЯТОРЫ В РАСТЕНИЯХ

Г.Г. Филипцова, В.М. Юрин

Белорусский государственный университет, г.Минск, Беларусь; e-mail: filiptsovah@mail.ru

В условиях действия стрессовых факторов в растительном организме активируются окислительные реакции, что приводит к изменению баланса в клеточном редокс-статусе. Устойчивость растений к действию стрессоров во многом определяется мощностью антиоксидантных систем, осуществляющих дезактивацию активных форм кислорода (АФК) и прерывание цепи окисления жирных кислот. Очевидно, что индукция антиоксидантных систем с помощью экзогенных сигнальных молекул представляет собой один из способов по-

вышения устойчивости растений к действию стрессоров.

Согласно современным представлениям, важными участниками сигнальных систем растений являются эндогенные пептидные элиситоры [1, 2]. Их синтез в ответ на атаку фитопатогенов или насекомых-вредителей обеспечивает усиление и увеличение количества активированных путей сигнальной трансдукции, что приводит к быстрому отклику – синтезу фитоалексинов, укреплению клеточной стенки (лигнификации), синтезу PR-белков, развитию реакции сверхчувствительности и др. [1, 3]. Однако данные о действии этих соединений на редокс-статус клетки отсутствуют.

Целью данной работы было исследование влияния экзогенной обработки растений синтетическими пептидными элиситорами AtPep, *GmPep890 и GmPep914* на уровень АФК и состояние антиоксидантной системы клеток, в частности активность ферментов пероксидазы и супероксиддисмутазы (СОД), уровень восстановленного (*GSH)* и окисленного (*GSSG)* глутатиона, а также содержание растворимых фенольных соединений (ФС). Пептиды AtPep, *GmPep890 и GmPep914* были синтезированы в Институте биоорганической химии НАН Беларуси.

Объектом исследования служили проростки гороха, выращенные в водной культуре рулонным методом. 14-дневные проростки опрыскивали водными растворами пептидов в диапазоне концентраций 10^{-12}–10^{-9} М.

Установлено, что синтетический пептид AtPep оказывает элиситорное действие на проростки гороха в концентрации 10^{-9} М, тогда как пептиды *GmPep890 и GmPep914* – в более низких концентрациях – 10^{-11} – 10^{-12} М. Обработка надземной части проростков гороха пептидами AtPep, *GmPep890 и GmPep914* в указанных концентрациях через 24 часа приводит к росту содержания АФК в листьях в 2-3 раза по сравнению с контролем. Через 48 часов после обработки этот показатель снижается до исходного уровня. Вероятно, указанные соединения вызывают индукцию защитных систем растения посредством быстрого роста уровня АФК, выполняющих сигнальные функции и активирующих экспрессию генов антиоксидантной системы.

Снижение уровня АФК с увеличением времени воздействия пептидов может свидетельствовать об активации антиоксидантных ферментов. Поэтому на начальном этапе исследований нами было изуче-

но влияние данных соединений на активность ферментов пероксидазы и СОД. Установлено, что пептиды AtPep и GmPep914 через 24 часа после обработки растений приводят к незначительному снижению активности пероксидазы и увеличению активности СОД примерно на 50 % по сравнению с контролем. Максимальная активность СОД обнаружена через 48 часов после обработки (в 4 раза выше контроля), что, очевидно, и обуславливает уменьшение уровня АФК. Синтетический пептид GmPep890 оказывает аналогичное действие на активность СОД и не влияет на пероксидазную активность в листьях гороха.

Далее нами было изучено влияние синтетических пептидов на пул восстановленного и окисленного глутатиона и уровень растворимых ФС в листьях гороха. Глутатион представляет собой главный тиол-дисульфидный буфер, а соотношение 2GSH/GSSG определяет редокс-статус клетки. Показано, что уже через 2 часа после опрыскивания растений пептидами уровень GSSG повышается, а через 24 часа он достигает максимального значения, превышая контроль примерно в 2-2,5 раза. Причем, рост уровня окисленного глутатиона происходит не за счет снижения его восстановленной формы, а за счет синтеза *de novo*. Кроме того установлено, что через 24 часа после обработки растений пептидами происходит увеличение суммарного содержания растворимых ФС примерно на 20 % по сравнению с контролем. При этом в наибольшей степени увеличивается уровень флавоноидов, что приводит к росту величины антиоксидантной активности. Увеличение времени воздействия пептидов до 48 часов вызывает снижение исследуемых параметров, что может быть связано с синтезом полимерных ФС, обладающих защитными свойствами.

Представленные данные свидетельствуют, что обработка растений гороха синтетическими пептидами AtPep, *GmPep890 и GmPep914* приводит к активации антиоксидантных систем и, вероятно, увеличению устойчивости растений к стрессовым воздействиям. Для подтверждения данного предположения было исследовано влияние пептидов на скорость окислительных процессов, а также морфометрические показатели проростков гороха в условиях действия окислительного стресса, который создавали путем добавления в наружный раствор 10^{-3} М $CuCl_2$, 10^{-3} М H_2O_2 и 10^{-3} М аскорбиновой кислоты.

Выявлено, что предварительная обработка растений изученными

пептидными элиситорами приводит к снижению уровня первичных продуктов перекисного окисления липидов в условиях действия стрессора. Анализ морфометрических характеристик проростков гороха свидетельствует, что экзогенная обработка растений пептидными элиситорами приводит к увеличению их устойчивости к действию окислительного стресса. В данных стрессовых условиях наиболее выраженный защитный эффект выявлен при использовании пептида *GmPep914* в концентрации 10^{-12} М [4].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что клетки растения распознают сигнал от пептидных элиситоров и запускают механизмы формирования неспецифической системной устойчивости, в частности, индуцируют работу антиоксидантной системы клетки, способствуя её скоординированной и эффективной работе и поддержанию редокс-статуса в условиях действия окислительного стресса.

1. Albert M. Peptides as trigger of plant defence // J of Experimental Botany. – 2013. – V. 64. – P. 5269-5279.

2. Yamaguchi Y., Huffaker A. Endogenous peptide elicitors in higher plants // Current Opinion in Plant Biology. – 2011. – V. 14. – P. 351-357.

3. Yamaguchi Y. et al. GmPep914, an eight-amino acid peptide isolated from soybean leaves, activated defense-related genes // Plant Physiology. – 2011. – V. 156. – P. 932-942.

4. Filiptsova H.G., Luschik A.Y., Sokolov Y.A., Varaksa T.S., Yurin V.M. Peptide elicitors GmPep890 и GmPep914 increase the plants resistance to oxidative stress. International Symposium on Plant Signaling and Behavior. St-Petersburg, 19-23 June 2016. P. 162-163.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ВО ВЗАИМОТНОШЕНИИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ЦЕКРОПИНА Р1 И БОМБИНИНА, С АССОЦИАТИВНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

О.В. Фурс, Н.С. Захарченко, С.В. Пиголева, Т.В. Шевчук, О.В. Дьяченко, Я.И. Бурьянов

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук, г. Пущино, Россия; e-mail: olya.furs.86@mail.ru

Антимикробные пептиды (АМП), рассматривают как эффективную альтернативу классическим антибиотикам, поскольку микроорганизмы не обладают специфическими механизмами устойчивости против АМП. Механизм действия АМП связан с нарушением целостности клеточной мембраны микробных патогенов и последующей их гибелью. Методы генетической инженерии позволяют синтезировать в клетках растений гетерологичные белки, в том числе АМП [1]. Экспрессия в растениях генов гетерологичных АМП перспективна для повышения устойчивости растений к фитопатогенам и для использования растений в качестве «биофабрик» АМП.

Антимикробный пептид цекропин Р1, выделенный из нематод кишечника животных, относится к группе линейных α-спиральных пептидов, не содержащих остатки цистеина. Ген цекропина Р1 кодирует 31-членную аминокислотную последовательность и обладает специфической активностью против многих патогенных микроорганизмов [2].

Антимикобный пептид бомбинин, выделенный из кожи лягушки *Bombina variegate*, относится к группе линейных α-спиральных пептидов, не содержащих остатки цистеина. Ген бомбинина кодирует 27-членную аминокислотную последовательность и обладает специфической активностью против многих патогенных грибов и бактерий [3].

Нами получены трансгенные растения табака, экспрессирующие гены антимикробных пептидов цекропина Р1 и бомбинина [4, 5].

Известно, что растения в природных условиях существуют в

тесной ассоциации с комплексом различных микроорганизмов, которые оказывают положительное влияние на их рост и развитие. Разрушение этой ассоциации может привести к отрицательным экологическим последствиям на агробиоценозы.

Целью нашей работы было проведение исследования экологической безопасности трансгенных растений, экспрессирующих гены антимикробных пептидов цекропина Р1 и бомбинина, а также исследование активных форм кислорода во взаимоотношении трансгенных растений, экспрессирующих гены антимикробных пептидов цекропина Р1 и бомбинина, с ассоциативными микроорганизмами и фитопатогенами.

Для колонизации растений использовали ризосферные псевдомонады *Pseudomonas fluorescens* 142NF [6] (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН). Молодые побеги однократно опрыскивали 1 мл суспензии бактерий с титром $10^3 – 10^5$ и культивировали в стеклянных пробирках. Показано, что трансгенные растения с геном цекропина Р1(*cecP1*) и бомбинина (*bom*) сохраняют свою способность к колонизации полезными ассоциативными микроорганизмами *P.fluorescens* 142NF. При микроразмножении *cecP1-* и *bom-*растений, колонизированных псевдомонадами, количество бактерий в листьях составляло 1-2 тыс КОЕ на 1 $см^2$, в стеблях 200-300 КОЕ, в корнях 10-20 тыс. КОЕ на 1 $см^2$. В последующих циклах микроразмножения содержание бактерий *P. fluorescens* в растениях стабильно сохранялось на том же уровне, что указывает на их прочную ассоциацию с растениями.

Устойчивость растений к стрессовым воздействиям зависит от многокомпонентной антиокислительной системы, которая поддерживает уровень образовавшихся в клетках активных форм кислорода на уровне, оптимальном для их жизнедеятельности. Известно, что одной из первых защитных реакций клетки в ответ на воздействие патогенных микроорганизмов является быстрое накопление активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид-анион, гидроксильный радикал и пероксид водорода, которые снижают жизнеспособность патогенов, приводя к окислительному повреждению их белков, нуклеиновых кислот и липидов. В условиях колонизации растений табака ассоциативными бактериями *P. fluorescens* 142NF и заражения патогенными бактериями *Erwinia carotovora*, проводилось определение эндо-

генной перекиси водорода спектрофотометрическим методом [7]. Результаты исследования показали снижение содержания эндогенной перекиси у трансгенных растений, колонизированных ассоциативными микроорганизмами на 12% у *cecP1*-растений и на 31,3% у *bom*-растений. В то же время в условиях заражения растений бактериями *E. carotovora* аналогичные цифры составляли 23% у *cecP1*-растений и на 42,7% у *bom*-растений

Защита ассоциативных микроорганизмов в АМП-экспрессирующих растениях связана с тем, что синтезируемая зрелая форма антимикробного пептида накапливается внутри клетки, а ассоциативные микроорганизмы не разрушают клетку и находятся в тканях в межклеточном пространстве, не взаимодействуя с АМП. Относительно низкое содержание пероксида водорода у колонизированных трансгенных растений по сравнению с растениями, зараженными патогенными микроорганизмами можно объяснить меньшим уровнем стресса у растений, колонизированных ассоциативными микроорганизмами.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 15-08-02050 и № 16-04-00623

1. Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И., Шульга Н.Я., Быков В.А. Трансгенные растения для фармакологии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2006. № 2. С. 3-12.

2. Martemyanov, K.A., Spirin, A.S., Gudkov, A.T. Synthesis, cloning and expression of genes for antibacterial peptides: cecropin, magainin, and bombinin // Biotechnology Lett. 1996. V. 18. P. 1357-1362.

3. Simmaco, M., Barra, D., Chiarini, F., Noviello, L., Melchiorri, P., Kreil, G., Richter, K. A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegate* // Eur.J. Biochem., 1991. V. 199. P. 217-222.

4. Захарченко Н.С., Рукавцова Е.Б., Гудков А.Т., Бурьянов Я.И. Повышенная устойчивость к фитопатогенным бактериям у трансгенных растений табака с синтетическим геном антимикробного пептида цекропина Р1 // Генетика. 2005. Т. 41. № 11. С. 1445-1452.

5. Захарченко Н.С., Локтюшов Е.В., Рукавцова Е.Б., Шевчук Т.В., Дьяченко О.В., Бурьянов Я.И. Получение трансгенных растений, экспрессирующих ген антимикробного пептида бомбинина // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. 2013. Вып. 3. С. 287-297.

6. Петриков К.В. Биологические поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами-нефтедеструкторами родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus.* Автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. хим. наук. Москва, 2011. 23 с.

7. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F.,de Lorenzo G. Extracellular H_2O_2 induced by oligoga_lacturonides is not involved in the inhibition of the aux_in_regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants // Plant Physiol. 2000. V. 122. P. 1379–1385.

УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К ГРИБНЫМ ПАТОГЕНАМ: «ОБРАТНЫЕ СТОРОНЫ МЕДАЛЕЙ» АФК И ПЕРСПЕКТИВНЫЙ БАЛАНСИР «РЕДОКС-КАЧЕЛЕЙ»

Р.М. Хайруллин

Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия; e-mail: krm62@mail.ru

Активные формы кислорода (АФК) являются регуляторами метаболизма клеток всех живых организмов. Поэтому, рассматривая роль этих молекул, а также оксида азота (NO) в регуляции устойчивости/восприимчивости растений к инфекционным болезням, необходимо иметь в виду последствия действия перекиси водорода, продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и других соединений, связанных с окислительными процессами, на клетки фитопатогенных микроорганизмов и, в частности, грибов.

Показано, что АФК активируют прорастание спор ржавчинного гриба *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [11], влияют на жизнеспособность фитопатогена *Cladosporium fulvum* [6]. NO оказывает влияние на прорастание спор *Collelotrichum coccoides*, развитие спорангиофор *Phycomyces blakesleeanus*, формирование аппрессорий облигатного биотрофа *Blumeria graminis* и конидий у *Coniothyrium minitans*; перекись водорода участвует в прорастании спор *Neurospora crassa* [цит. 11].

Небольшие количества АФК рассматриваются не только как сигнал к началу активного прорастания спор фитопатогенных грибов, но и как фактор их предадаптации к более высоким концентрациям этих защитных молекул растения [11]. Так, часовая предобработка

культуры гриба *Fusarium graminearum* перекисью водорода на логарифмической фазе роста приводит к развитию устойчивости фитопатогена к высоким концентрациям H_2O_2 на стационарной фазе роста [9].

Особого, пристального взгляда заслуживает влияние АФК и ПОЛ на синтез чрезвычайно опасных для человека микотоксинов. Токсигенные грибы, в основном, принадлежат к трем родам: *Fusarium, Aspergillus, Penicillium* [10]. Использование биопрепаратов – индукторов устойчивости растений к болезням, одним из механизмов которых является запуск продукции АФК, может иметь, так называемую, «обратную сторону медали». Кроме описанного выше возможного явления предадаптации *F. graminearum* к действию H_2O_2 [11] обнаружено, что периодическое воздействие перекиси водорода на культуру гриба приводит также к накоплению трихотеценового токсина деоксиниваленола (ДОН) [9].

АФК и продукты ПОЛ, в том числе и растительного происхождения, способны играть ключевую роль в продукции грибами рода *Aspergillus* самых опасных микотоксинов – афлатоксинов. Интересно, что один из защитных фитогормонов растений – метилжасмонт, может выступать в механизмах регуляции продукции афлатоксина B_1 «двуликим Янусом»: в концентрации 10^{-2} М он ингибирует продукцию микотоксина, а при уменьшении (10^{-4} и 10^{-6} М) – стимулирует [3, 7].

«Мастерство» растения в удержании равновесия «редокс-качелей» особенно значимо при одновременной его «встрече» с грибами, одни из которых могут воспользоваться небольшими количествами АФК, как стимуляторами прорастания спор и роста гиф, другие наоборот – активной продукцией АФК. Например, окислительный взрыв, а также высокий уровень продуктов ПОЛ способен индуцировать биосинтез афлатоксинов, а также дифференциацию склероций у гриба *Aspergillus flavus* [5]; реакция сверхчувствительности, связанная с гиперпродукцией АФК, облегчает грибу *Botrytis cinerea* колонизацию растения [4]. Уменьшение концентрации АФК и подавление окислительного взрыва может приводить к снижению уровня продукции афлатоксина и подавлению дифференциации склероций [7, 12], но опасно потерей контроля развития биотрофных фитопатогенов

В этой связи одним из интересных и важных для практики направлений является поиск способов и средств ограничения развития окислительного взрыва при одновременном контроле как патогенов, для которых небольшой уровень АФК является стимулятором роста, а высокий – разрушителен, так и патогенов со стратегией «наоборот». Рассматривая комплекс вопросов, связанных с разработкой экологически малоопасных средств защиты растений многоцелевого назначения, уменьшением угрозы загрязнения продукции растениеводства микотоксинами, улучшением минерального питания с.-х. культур, длительной и безопасной циркуляцией защитного средства в агроценозе, мы обращаем внимание на эндофитных антагонистических представителей бактерий рода *Bacillus*, в том числе *B. subtilis*. Известно, что эти бактерии продуцируют каталазу. В свете описанных выше фактов, разрушение бактериальным ферментом перекиси водорода, которая накапливается при патогенезе в растительных тканях, можно рассматривать как стабильный фактор контроля развития представителей грибов *Aspergillus*, продукции ими микотоксинов, а также безопасного для клеток самих растений уровня АФК. Вместе с тем нами выявлен также эффект повышения эндофитами устойчивости проростков пшеницы к фитотоксинам фузариевых грибов, механизм которого пока подробно не исследован [1]. Одним из них может быть разрушение или иная дезактивация микотоксинов бактериальными ферментами. Таким образом, с помощью эндофитных штаммов бактерий *B. subtilis* возможно бороться с токсигенными грибами со стратегией биотрофов (например, фузариевыми), и с некротрофными, т.н. плесневыми грибами, например, рода *Aspergillus*. Подтверждением такого мнения могут служить результаты анализа уровня малонового диальдегида (МДА) в тканях растений, инокулированных клетками эндофитных штаммов бактерий. Нами выявлено, что в стрессовых условиях уровень МДА в колонизированных эндофитами растениях ниже в сравнении с контрольными, что свидетельствует о возможности с помощью таких микробов контролировать уровень ПОЛ, увеличенное количество продуктов которого, как указывалось выше [5], может стимулировать дифференциацию склероций грибов рода *Aspergillus* и продукцию афлатоксинов. Эндофитные представители бацилл, «проживающие» в растительных тканях, могут регулировать уровень АФК в растениях через NO-сигнальную систему. По данным

Кларк с соавторами [2], NO ингибирует активность каталазы в растениях табака, что чревато для растительных клеток некрозом как при инфицировании некротрофными грибами [4, 7], так и вследствие включения механизмов, связанных с программированной гибелью. Интересно при этом, что у бактерий рода *Bacillus* оксид азота рассматривается как активатор каталазы [8]. Таким образом, на наш взгляд, эндофитные антагонистические бактерии *B. subtilis* могут выступать в препаратах для защиты растений в роли своеобразного балансира «редокс-качелей», которого растения «выбрали» себе в ходе коэволюции.

1. Кутлубердина Д.Р. Антагонистические штаммы *Bacillus subtilis* Cohn как агенты биоконтроля грибов рода *Fusarium* Link. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Саратов 2010. 22 с.

2. Clark D., Durner J., Navarre D.A., Klessig D.F. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase // Mol. Plant Microbe Interaction. 2000. V.13(12): 1380-1384.

3. Goodrich-Tanrikulu M., Mahoney N., Rodriquez S.B. The plant growth regulator methyl jasmonate inhibits aflatoxin production by *Aspergillus flavus* // Microbiology. 1995. V.141:2831-2837.

4. Govrin E.M., Levine A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* // Curr. Biol. 2000. V.10:751-757.

5. Grintzalis K., Vernardis S.I., Klapa M.I., Georgioua C.D. Role of oxidative stress in sclerotial differentiation and aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus* // Applied and Environmental Microbiology. 2014. V.80(1):5561-5571.

6. Lu H., Higginsf V.J. The effect of hydrogen peroxide on the viability of tomato cells and of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum* // Physiol. Mol. Plant Pathol. 1999. V.54:131-143.

7. Meimaroglou D.M., Galanopoulou D., Markaki P. Study of the effect of methyl jasmonate concentration on aflatoxin B1 biosynthesis by *Aspergillus parasiticus* in yeast extract sucrose medium // Int. Journal of Microbiology. 2009. Article ID 842626. 7 p.

8. Mols M., Abee T. Primary and secondary oxidative stress in Bacillus // Environmental Microbiology. 2011. 13(6):1387-1394.

9. Ponts N., Pinson-Gadais L., Verdal-Bonnin M.-N. et al. Accumula-

tion of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum* // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V.258:102-107.

10. Sweeney M.J., Dobson A.D. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species // Int. J. Food Microbiol. 1998. 43:141-158.

11. Yin S., Gao Z., Wang C., Huang L., Kang Z. and Zhang H. Nitric oxide and reactive oxygen species coordinately regulate the germination of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* urediniospores // Front. Microbiol. 2016. 7:178.

12. Yu J. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination // Toxins. 2012. V.4:1024-1057.

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ХЛОПЧАТНИКА СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫМ КОМПЛЕКСОМ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ И САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТ НА СОДЕРЖАНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС

Н.Р. Хашимова, А.А. Ахунов, М.А. Мамасолиева

Институт биоорганической химии им. академика А.С. Садыкова АН РУз, г. Ташкент, Узбекистан; e-mail: nigora.khashimova@gmail.ru

Известно, что фитогормон салициловая кислота (СК) выполняет сигнальную роль в активации защитных реакций при воздействии стрессовых факторов и ее содержание в тканях растений возрастает в несколько раз [1]. Наиболее вероятным местом синтеза СК являются хлоропласты, в которых СК может запасаться, а при инфицировании патогенами быстро высвобождаться из них в цитоплазму и функционировать в механизмах формирования системной приобретенной устойчивости [2].

В наших исследованиях важно было определить, является ли СК посредником формирования индуцированной устойчивости хлопчатника при воздействии препаратов биогенного происхождения. Особенно актуален вопрос регулирования устойчивости среднеустойчивых и восприимчивых к вилту сортов хлопчатника.

С этой целью было изучено содержание свободной СК в семядольных листьях 10-суточных проростков среднеустойчивого С-6524 и восприимчивого С-4727 сортов хлопчатника, семена которых были обработаны супрамолекулярным комплексом глицирризиновой и салициловой кислот в концентрации 10^{-7} М с последующим инфицированием возбудителем фузариоза *F.oxysporum.*

Количественный анализ свободной СК в семядольных листьях проростков проводили методом ВЭЖХ по площадям пиков в соответствии с калибровочной кривой, предварительно построенной по результатам анализа стандартных растворов СК в интервале концентраций 5-50 мкг/мл (табл.).

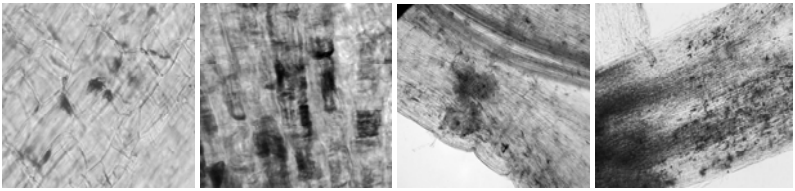
Таблица

Содержание свободной СК в листьях 10-суточных проростков хлопчатника, обработанных супрамолекулярным комплексом глицирризиновой и салициловой кислот и последующим их инфицированием *F.oxysporum*

Сорта хлопчатника	Концентрация свободной СК, мкг/мл	Содержание свободной СК (мг/г сыр.мас.)
С-6524 контроль	17,05 ± 0.089	0,017
С-6524 опыт	33,38 ± 0.179	0,033
С-4727 контроль	29,35 ± 0.141	0,029
С-4727 опыт	57,04 ± 0.172	0,057

Экзогенная СК в составе супрамолекулярного комплекса способствовала увеличению содержания свободной СК по сравнению с контрольными образцами. В исследуемых сортах хлопчатника, обработанных супрамолекулярным комлексом содержание свободной СК был в 2 раза выше, по сравнению с контролем.

Синтезируемая растением СК играет важную роль в индукции комплекса защитных реакций при биотическом стрессе, которые приводят к ограничению развития патогенов [3]. Повышение уровня изучаемых показателей при совместном действии патогена и супрамолекулярного комплекса глицирризиновой кислоты с СК в концентрации 10^{-7} М, по-видимому, приводит к запуску и одновременному функционированию различных сигнальных систем, участвующих в защитных реакциях хлопчатника, в результате чего индуцируется неспецифическая ответная реакция хлопчатника на патоген.



а *б* *в* *г*

Рис. Накопление супероксида-аниона в тканях хлопчатника, обработанных супрамолекулярным комлексом глицирризиновой и салициловой кислот при инфицировании F.oxysporum. Ткани окрашивали 0,1% нитросиним тетразолием.

а – гипокотиль инфицированного грибом проростка, без обработки препаратом; б - гипокотиль проростка, обработанного препаратом с последующим инфицированием; в – корень проростка инфицированного грибом, без обработки препаратом; г – корень проростка, обработанного препаратом с последующим инфицированием. Увеличение 40Х.

Одной из защитных реакций при инфицировании клеток растений патогенами является окислительная вспышка - образование высоко активного супероксид-аниона ($O_2^{\cdot -}$), который губителен и для патогена, и для самой клетки.

Проведенные цитохимические исследования в сортах хлопчатника С-6524 и С4727 показали, что при инфицировании *F.oxysporum* в вариантах, обработанных супрамолекулярным комлексом глицирризиновой и салициловой кислот ткани интенсивно окрашивались нитросиним тетразолием, свидетельствующие о накоплении супероксид-аниона. Краситель (синий формазан) накапливался в цитоплазме, вдоль плазматической мембраны клеток гипокотилей (рис. 1. *а; б*) и корней проростков (рис. 1. *в; г*).

Цитохимические исследования продемонстрировали положительный эффект обработки семян супрамолекулярным комлексом глицирризиновой и салициловой кислот, который проявлялся в реакции сверхчувствительности, связанной с усилением генерации супероксид-аниона при инфицировании растений *F.oxysporum*.

Таким образом, можно предположить, что в растениях хлопчатника, обработанных супрамолекулярным комлексом глицирризиновой и салициловой кислот окислительный стресс, вызываемый накоплением СК вероятно происходит за счет повышения активности

ферментов пероксидазы и супероксид-дисмутазы, превращающие $O_2^{\cdot -}$ в более стабильный пероксид водорода [4; 5]. Накопление определенного уровня прооксидантов с их участием может вызывать активацию генов, контролирующих антиоксидантную систему.

1. War A. R., Paulraj M.G., War M.Y., Ignacimuthu S. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Plant Signaling & Behavior. 2011. V.6 (11). P.1787-1792.

2. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа, 2001.

3. Martinez C., Baccou J.C., Bresson E., Baissac Y., Daniel J.-F., Jalloul A.,Montillet J. L., Geiger J.P., Assigbetse K., Nicole M. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris pv malvacearum* // Plant Physiology. 2000. V. 122. P. 757–766.

4. Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиология растений. 2003. Т.50. С. 459-464.

5. Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999. V.50. P. 601-639.

МЕТАБОЛОМНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ СУБСТРАТОВ ПЕРОКСИДАЗЫ В КОРНЯХ ПШЕНИЦЫ

А.В. Часов[1,2], О.П. Гурьянов[1], Ф.В. Минибаева[1,2]

[1]*ФБГУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, Россия; e-mail: chasov@kibb.knc.ru*

[2]*ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия*

Известно, что в апопласте растений существуют две основные системы, образующие активные формы кислорода (АФК). В некоторых видах растений превалирует НАДФН-оксидаза, в других – пероксидаза. Корни пшеницы являются удобной модельной системой для изучения быстрых стрессовых ответов растительных клеток. На-

ми показано, что на клеточной поверхности корней пшеницы одним из основных ферментов образующих АФК является экстраклеточная пероксидаза. Она активируется при отсечении корней от проростков, при действии на корни ксенобиотиками, ионами металлов, ди- и трикабоновыми кислотами, детергентами и трипсином. Наши данные свидетельствуют, что при раневом стрессе корней не происходит высвобождение из цитоплазмы вновь синтезированных или существующих внутриклеточных пероксидаз. Если «отмывать» клеточную поверхность корней от растворимых белков, то при последующей их инкубации будет происходить восстановление пероксидазной активности. Это восстановление не предотвращается действием ингибитора трансляции белка – циклогексимидом, транскрипции – актиномицином Д, секреции – брефельдином и стимулируется действием детергентов [1]. Такие изменения, вероятно, обусловлены количественными и качественными изменениями в изоферментном спектре пероксидаз. Таким образом, активация фермента на начальном этапе стрессового воздействия обусловлена присутствием в плазмалемме и клеточной стенке высокомобильных слабо- и ионносвязанных изоформ пероксидазы. В последующем происходит синтез новых ферментов. Нами показано усиление экспрессии гена пероксидазы 37 кДа в корнях пшеницы в условиях раневого стресса, а также обнаружено наличие в промоторе этого гена множество регуляторных мотивов, в том числе участки с тимин, цитозин богатыми повторностями, чувствительные к стрессовым условиям.

Существует несколько механизмов активирования пероксидазы. В наших экспериментах показано, что при отсечении апикальной части настоящего листа у проростка пшеницы происходит активирование пероксидазы в апопласте корней растения. При этом изменений в изоферментном спектре фермента не происходит. Возможно, что в данном случае задействуется механизм активации экстраклеточных пероксидаз, опосредованный высвобождением дополнительных субстратов, индукторов или кофакторов. С помощью метаболомного анализа в апопласте корней пшеницы обнаружено девять мажорных соединений, восемь из которых являются субстратами пероксидазы. Методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии нами были идентифицированы три С-гликозилированных флавона (рисунок).

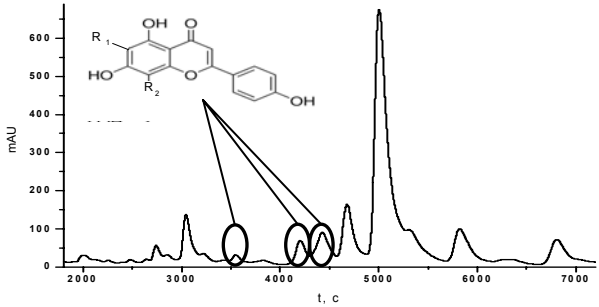


Рисунок. Хроматограмма ВЭЖХ экстраклеточного раствора пшеницы. Врезка: гликозилированный апигенин (шавтозид),где R_1, R_2 – петоза, гексоза.

Все они имеют одинаковую молекулярную массу 564 Да, и каждый из них содержит в своём составе в положении 6 и 8 по два моносахарида, относящие к пентозам и гексозам. По УФ-спектру поглощения флавона и молекулярной массе можно предположить, что агликоном является апигенин. Такое соединение называется шафтозид. Не исключено, что высвобождаемые метаболиты могут играть защитную функцию. В частности, показано, что шафтозиды играют важную роль в устойчивости риса и ариземы к действию патогенов [2, 3]. Известно, что субстраты пероксидазы различаются по своим реакционным способностям. При совместном окислении полуокисленные продукты быстрых субстратов могут активировать окисление медленных субстратов пероксидазы [4, 5]. Поскольку в апопласте всегда присутствует пул растворимых пероксидаз и, как мы предполагаем, медленно окисляемых субстратов, то для окислительного взрыва достаточно высвобождения небольшого количества быстро окисляемого субстрата или какого-либо кофактора. Последующее активирование пероксидазы может осуществляться как за счет высвобождения дополнительного количества фермента, так и за счет появления дополнительного количества субстратов. Вероятно, что высвобождаемые в апопласт соединения могут служить субстратами пероксидаз при образовании АФК в ходе стресс-индуцированного окислительного взрыва.

Работа поддержана грантами РФФИ № 17-04-0156217 и 17-44-160142 р_а.

1. Часов А.В., Минибаева Ф.В. Методические подходы к исследованию редокс-активности апопласта. 1. Механизмы высвобождения пероксидаз // Физиология растений. 2014. Т. 61. № 4. С. 594–602.

2. Stevenson P.C., Kimmins F.M., Grayer R.J. Raveendranath S. Schaftosides from rice phloem as feeding inhibitors and resistance factors to brown planthoppers (*Nilaparvata lugens*) // Entomologia Experimentalis et Applicata. 1996. V. 80. P. 246–249.

3. Du S.S., Zhang H.M., Bai C.Q., Wang C.F., Liu Q.Z., Liu Z.L., Wang Y.Y., Deng Z.W., Nematocidal Flavone-C-Glycosides against the Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) from *Arisaema erubescens* Tubers // Molecules. 2011. V. 16. P. 5079–5086.

4. 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.

5. 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.

ПЕРОКСИДАЗА КАК ИСТОЧНИК АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РАСТЕНИЯХ

А.В. Часов[1,2], Ф.В. Минибаева[1,2]

[1]*ФБГУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, Россия; e-mail: chasov@kibb.knc.ru*

[2]*ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия*

Известно, что пероксидаза активируется при самых разнообразных воздействиях биотической и абиотической природы в различных органах и тканях растений [1-4]. Классически считается, что пероксидаза – это антиоксидантный фермент, но в определенных условиях она способна к образованию активных форм кислорода (АФК) [3, 5, 6]. При наличии восстановителей пероксидаза способна генерировать супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), согласно схеме Чанса [5, 6]:

$E + H_2O_2 \rightarrow E_1 + H_2O$ (1)

$E_1 + NADH \rightarrow E_2 + NAD^{\bullet}$ (2)

$E_2 + NADH \rightarrow E + NAD^{\bullet}$ (3)

$NAD^{\bullet} + O_2 \rightarrow NAD^{+} + O_2^{\bullet -}$ (4)

где E_n – различные состояния фермента.

При работе по оксидазному циклу пероксидаза образует перекись водорода (H_2O_2):

$Fe^{2+}\text{-}O\text{-}O + RH_2 \rightarrow Fe^{3+} + R^{-} + H_2O_2$ (5)

где Fe^{2+}-O-O – пероксидаза, конъюгированная с кислородом (compound III), а в роли RH_2 могут выступать NAD(P)H, тиолы (цистеин и глутатион), аскорбат и др. [7].

Особый интерес вызывают экстраклеточные пероксидазы, так как они участвуют в апопластном окислительном взрыве [1, 3]. Как известно, клеточная поверхность первая испытывает на себе стрессовое воздействие. При этом 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 [8]. Нами показано, что при действии стрессоров различной природы происходит модификация плазмалеммы, изменяются ионные потоки, что приводит к защелачиванию апопласта и к активированию экстраклеточной пероксидазы [1, 3, 9-11]. Еще одним необходимым условием для возникновения окислительного взрыва, обусловленного пероксидазой, является выход из клетки восстановителей [3].

Пероксидаза высокомобильный фермент с широкой субстратной специфичностью. Например, при совместном окислении двух субстратов с резко различающейся реакционной способностью происходит взаимное активирование и ингибирование субстратов [12, 13].

$Fe(III) + H_2O_2 \rightarrow CoI + H_2O$ (6)

$CoI + Ph_FOH \rightarrow CoII + Ph_FO^{\bullet}$ (7)

$CoII + Ph_FOH \rightarrow Fe(III) + Ph_FO^{\bullet}$ (8)

$Ph_FO^{\bullet} + Ph_SOH \rightarrow Ph_FOH + Ph_SO^{\bullet}$ (9)

$Ph_FO^{\bullet}/Ph_SO^{\bullet} + O_2 \rightarrow$ *o*-Quinone $+ O_2^{\bullet -} + H^{+}$ (10)

где Fe(III), CoI, CoII, CoIII– различные состояния пероксидазы, Ph_F и Ph_S – быстрый и медленный фенольный субстрат соответственно.

В первую очередь пероксидаза взаимодействует с быстро окисляемым субстратом, при этом образуется радикал субстрата, который в дальнейшем взаимодействует с медленно окисляемым субстратом до полного его окисления (реакции 7-9). Взаимодействие полуокисленных радикалов субстратов с кислородом может приводить к образованию АФК (реакция 10) [5, 6]. Мы полагаем, что субстрат–субстратная активация экстраклеточной пероксидазы имеет важное значение для стресс-индуцированного окислительного взрыва в растительных клетках. На начальных этапах стрессового воздействия активируются слабо- и ионносвязанные изоформы фермента, локализованные в плазмалемме и клеточной стенке [14]. При этом в апопласт высвобождается какой-либо быстрый субстрат, который служит триггером быстрого окисления медленных субстратов, что и приводит к вспышке образования АФК. Нами показано, что образование АФК пероксидазой – эволюционно древний процесс, присущий как сосудистым, так и несосудистым растениям, стоящим на разных эволюционных ступенях развития [1, 2, 11].

Работа поддержана грантами РФФИ № 17-04-0156217 и 17-44-160142 р_а.

1. 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.

2. Часов А.В., Бекетт Р.П., Минибаева Ф.В. Активность окислительно-восстановительных ферментов в талломе *Anthoceros natalensis* // Биохимия. 2015. Т. 80. Вып. 9. С. 1391-1404.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. Bolwell G.P., Butt V.S., Davies D.R., Zimmerlin A. The origin of the oxidative burst in plants // Free Radical Res. 1995. V. 23. P. 517-532.

8. Dumas B, Bottin A, Gaulin E, Esquerré-Tugayé MT. Cellulose-Binding Domains: Cellulose As-sociated-Defensive Sensing Partners? // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 160-164.

9. Минибаева Ф. В., Гордон Л. Х. 1990. Особенности действия ионов кальция и кальциевого ионофора А23187 на мембранный потенциал и дыхание клеток корней пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. Т. 22. № 3. С. 225-230.

10. Гордон Л. Х. 1992. Функциональная характеристика адаптивного старения отсеченных корней пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. Т. 24. № 2. С. 128-133.

11. Часов А.В., Гордон Л.Х., Колесников О.П., Минибаева Ф.В. Пероксидаза клеточной поверхности - генератор супероксид-аниона в корневых клетках пшеницы при раневом стрессе // Цитология. 2002. Т. 44. № 7. С. 691-696.

12. 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.

13. 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.

14. Часов А.В., Минибаева Ф.В. Методические подходы к исследованию редокс-активности апопласта. 1. Механизмы высвобождения пероксидаз // Физиология растений. 2014. Т. 61. № 4. С. 594–602.

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПЕПТИДОВ *Bacillus subtilis* 11 ВМ НА КОМПОНЕНТЫ ПРО-/АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ В НОРМЕ И ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *Septoria nodorum* BERK.

Е.А. Черепанова, Д.К. Благова, И.В. Максимов
ФБГУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия; e-mail:k_cherepanova@mail.ru

Способность эндофитных бактерий рода *Bacillus* sp. подавлять развитие патогенной микрофлоры, разрушать вырабатываемые ими токсины, а также высокая рост-регуляторная активность по отношению к растениям, связана с выработкой ими биологически активных метаболитов. Особый интерес среди последних представляют циклические липопептиды, способные запускать в растениях механизмы системной индуцированной устойчивости [1]. Причем эти свойства липопептидов проявляются в крайне низких их концентрациях. К ранним защитным реакциям растений, формирующимся в ответ на поражение патогенами, относят образование активных форм кислорода [2]. Они играют важную роль в развитии системной устойчивости растений, а их концентрация находится под контролем ферментов про-/антиоксидантной системы.

Ранее в нашей лаборатории на отрезках листьев пшеницы, инфицированных возбудителем септориоза, было показано, что эндофитные штаммы *Bacillus subtilis* проявляют явный защитный эффект [3]. В связи с этим, целью настоящей работы являлось изучение влияния липопептидов *B. subtilis* на генерацию пероксида водорода, активность пероксидазы, оксалатоксидазы и каталазы в растениях пшеницы, инфицированных гемибиотрофным грибом *Septoria nodorum* Berk. Для этого из культурального фильтрата 3-суточной культуры *B. subtilis* штамма 11 ВМ получена липопептид-богатая фракция [4]. Объектом исследования служили листья мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Жница, восприимчивого к септориозу. Семена предварительно замачивали в растворах липопептидов следующих концентраций: 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 5 и 10 мкг/мл в течение 3 часов, затем раскладывали в отдельные для каждого варианта кюветы, выращивали на 10% среде Хогланда–Арнона в климатостате КС-

200 СПУ (Россия) в течение 6 суток, затем листья инфицировали суспензией спор агрессивного штамма гриба *S. nodorum* (10^6 спор/мл) из коллекции лаборатории. Фиксировали на 2, 5 и 7 сутки после инфицирования. Для получения ферментной вытяжки отрезки листьев гомогенизировали в 0.05 М Na-фосфатном буфере с pH 6.2 (ФБ). Отношение массы навески к объему ФБ – 1:5. Экстракт центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин на центрифуге 5415 R (Eppendorf, Германия). Супернатант использовали для анализа активности пероксидазы, оксалатоксидазы, каталазы и определения концентрации перекиси водорода [5, 6]. Контролем служили отрезки неинфицированных листьев пшеницы.

Выявлено, что влажная обработка семян липопептидами в концентрации 0,5-2 мкг/мл приводит к 40-80% стимуляции роста проростков, 20-50% активации в листьях проростков ферментов про/антиоксидантной системы и к снижению площади инфицирования. Концентрации 3, 5 и 10 мкг/ угнетали рост и значительно снижали активность каталазы, вовлеченной в утилизацию перекиси, однако меньше влияли на пероксидазную и оксалатоксидазную активности. Развитие патогена на листьях в этих вариантах было сравнимо с непредобработанными липопептидами растениями, активность ферментов-антиоксидантов (каталазы и пероксидазы) снижалась, а концентрация пероксида водорода закономерно при этом повышалась. В связи с этим мы предполагаем, что концентрации липопептидов более 3 мкг/мл оказывают стрессовое влияние, а наиболее эффективными для стимуляции иммунитета растений показали себя концентрации от 0,5 до 2 мкг/мл. Причем инфицирование листьев проростков, обработанных данными концентрациями липопептидов приводило к активации ферментов про/антиоксидантной системы, по сравнению с необработанными,

Таким образом, нами показано, что влажная обработка семян пшеницы растворами липопептидов *B. subtilis* 11 ВМ в концентрациях 0,5-2 мкг/мл способствует усилению устойчивости проростков к септориозу посредством активации в них ферментов про-/антиоксидантной системы растений.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”.

1. Ongena M, Jacques P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol// Trends Microbiology. 2008. V. 16. Is. 3. P. 115-125.

2. Barna B., Fodor J., Harrach B.D., Pogány M., Király Z. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens // Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 59. P. 37–43.

3. Бурханова Г. Ф., Веселова С. В., Сорокань А. В., Благова Д. К., Нужная Т. В., Максимов И. В. Бактерии рода *Bacillus* в регуляции устойчивости пшеницы к *Septoria nodorum* Berk. //Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53, № 3. С. 308–315.

4. Yokota K., Yatsuda M., Miwa E., Higuchi K. Comparative study on sample preparation methods for the HPLC quantification of iturin from culture supernatant of an antagonistic *Bacillus* strain// J. ISSAAS 2012.V. 18, No.1. P. 70-75.

5. Веселова С. В., Бурханова Г. Ф., Нужная Т. В., Максимов И. В. Роль этилена и цитокининов в развитии защитных реакций в растениях Triticum aestivum, инфицированных *Septoria nodorum* // Физиология растений. 2016. Т. 63. № 5. С. 1-12.

6. Трошина Н. Б., Максимов И. В., Яруллина Л. Г., Сурина О. Б., Черепанова Е. А. Индукторы устойчивости растений и активные формы кислорода. I. Влияние салициловой кислоты на генерацию перекиси водорода в клетках каллусов пшеницы при инфицировании возбудителем твердой головни// Цитология. 2004. № 11. С. 1001-1005.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТОЧНОГО ЦИТОМЕТРА Attune® NxT В ИЗУЧЕНИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ТРАНСМЕМБРАННЫМ БЕЛКАМ ЧЕЛОВЕКА HPD-L1

Чухряева М.И., Смольянинова Л.В.

ООО «Агентство Химэксперт», г. Москва, Россия: e-mail: info@khimexpert.ru, www.khimexpert.ru

Проточный цитометр Attune® NxT с акустической фокусировкой производства Thermo Fisher Scientific — это настольный анализатор для быстрой и точной детекции редких событий. Прибор использует революционную технологию акустической фокусировки для выравнивания потока клеток перед облучением лазером при многоцветной проточной цитометрии. Особенностями системы является уникальная модульная конструкция: возможность быстро, не перемещая прибор, встраивать в него дополнительные лазеры (максимум 4) для увеличения числа детектируемых цветов (максимум 14); высокая скорость детекции; интуитивно понятное программное обеспечение для сбора и анализа данных и компактность оборудования.

Проточный цитометр Attune® NxT с акустической фокусировкой производства Thermo Fisher Scientific давно зарекомендовал себя, как надежное оборудование для детекции редких событий. Так, в исследовании, опубликованном коллективом зарубежных авторов в Scientific Reports показана эффективность использования цитометра Attune® NxT [1]. В работе ученые обратились к проблеме обнаружения мембранных белков hPD-L1, экспрессированных на большинстве раковых клеток мыши, при действии интерферона IFN-γ. В своей работе они сконструировали клетки MC-38, экспрессирующие белок hPD-L1, и обнаружили выраженный противоопухолевый эффект, при применении моноклональных антител к hPD-L1. Проточный цитометрический анализ показал, что обработка антителами опухолевый клеток MC-38, способствовало усилению цитолитического эффекта CD8+T клеток, что приводило к гибели клеток MC-38 и к замедлению пролиферации миелоидных опухолей. Цитометрический анализ на приборе Attune® NxT применялся на всех стадиях исследования: от измерения частоты CD8+T клеток после обработки моноклональными антителами до скрининга CD11b+, Ly6G+ или Ly6C+ миелоидных клеток в опухолевой ткани.

В результате проведенного исследования была построена модель животного, экспрессирующего hPD-L1 в клетках опухоли, которая впоследствии может быть использована в практике для разработки методов скрининга онкомаркеров и для лечения опухолей.

1. A human programmed death-ligand 1-expressing mouse tumor model for evaluating the therapeutic efficacy of anti-human PD-L1 antibodies. Huang A, Peng D, Guo et al., Sci Rep 2017; (7): 42687-42687.

АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В ПРОРОСТКАХ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР ПРИ ЗАСОЛЕНИИ И ДЕЙСТВИИ ГЕРБИЦИДОВ

О.Г. Яковец, В.В. Ивановский, А.С. Мороз

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь; e-mail:yakovets@inbox.ru

Растения на протяжении всей своей жизни подвергаются действию различных стрессовых факторов. Установление механизмов формирования у них устойчивости к действию неблагоприятных факторов окружающей среды является одной из важнейших задач современной физиологии растений. Многие исследователи предлагают использовать в качестве маркеров (диагностического признака) устойчивости растений к действию стрессоров антиоксидантные ферменты, в том числе и пероксидазу, которая, наряду с супероксиддисмутазой и каталазой, участвует в защите организма от окислительного стресса.

Пероксидаза относится к классу оксидоредуктаз (КФ 1.11.1.7), катализирующих с помощью H_2O_2 окисление различных неорганических и органических веществ. Данный фермент реагирует на самые разнообразные воздействия, либо изменяя при этом набор своих изоэнзимов, либо повышая активность уже присутствующих молекулярных форм. Выяснение индуцированного повышения активности пероксидазы под действием различных стрессоров представляет особый интерес, так как до сих пор до конца не выяснен характер этого процесса. Некоторые авторы считают, что активирование пероксидазы носит неспецифический характер. Другие склоняются к тому, что кажущаяся однотипность ответных реакций растительного организма на различные физиолого-биохимические нарушения в каждом отдельном случае сохраняет черты определенной индивидуальности и специфичности [1].

Нами исследовалось изменение пероксидазной активности в проростках злаковых культур в условиях засоления разного уровня и под действием гербицидов. Эксперименты по влиянию засоления на активность пероксидазы проводились на 13–15 дневных проростках озимой тритикале сорта Михась, выращенных в лабораторных условиях при температуре 20±2 ^{0} С, естественном освещении рулонным методом [2]. В первой серии экспериментов рулоны помещали в стеклянные сосуды, содержащие растворы следующего состава: 0,1мМ $CaSO_4$ (контроль); 0,1мМ $CaSO_4$, 1мМ NaCl (**1**); 0,1мМ $CaSO_4$, 5мМ NaCl (**2**); 0,1мМ $CaSO_4$, 50мМ NaCl (**3**); 0,1мМ $CaSO_4$, 150мМ NaCl (**4**); 0,1мМ $CaSO_4$, 300мМ NaCl (**5**). Во второй серии экспериментов рулоны с семенами помещали в сосуды с дистиллированной водой. За 1, 2, 3 суток до определения активности пероксидазы рулоны переставляли в сосуды, содержащие растворы следующего состава: контроль; (3); (4); (5). Эксперименты по влиянию симтриазиновых гербицидов прометрина и атразина и сульфониламинокарбонилтриазолинонового гербицида атрибута проводились на 10–13 дневных проростках яровой пшеницы сорта Мунк, выращенных в лабораторных условиях при температуре 20±2 ^{0} С, естественном освещении рулонным методом [2]. Обработка атразином (**А**) и прометрином (**П**) проводилась путем внесения их в среду выращивания в концентрациях 5, 10, 20 мг/л, а обработка атрибутом (**Ат**)– путем внесения его в среду выращивания в концентрациях 10^{-6} , 10^{-5}, 10^{-4} М за 1, 2, 3 суток до проведения экспериментов. Активность пероксидазы определяли по Бояркину по скорости окисления бензидина [3].

В первой серии экспериментов установлено, что через 13-15 суток выращивания проростков в присутствии 1 мМ хлорида натрия происходило достоверное уменьшение активности пероксидазы по сравнению с контролем. Под действием 5 мМ NaCl выявленный эффект усиливался, а при увеличении концентрации хлорида натрия до 50 мМ – уменьшался. При выращивании проростков на фоне 150 мМ NaCl не выявлено достоверных изменений активности данного антиоксидантного фермента. Хлорид натрия в концентрации 300 мМ практически полностью ингибировал рост проростков тритикале, что не позволило определить активность пероксидазы при этом уровне засоления. Во второй серии экспериментов выявлено, что 1сут-экспозиция в растворе 50 мМ NaCl приводила к снижению активно-

сти пероксидазы в проростках тритикале. После 2сут-экспозиции достоверных отличий в активности пероксидазы по сравнению с контролем не установлено, а после 3 сут-экпозиции ферментативная активность пероксидазы достоверно увеличивалась. Выращивание проростков тритикале при 150 и 300 мМ NaCl в течение 1 сут индуцировало снижение активности пероксидазы. Обработка проростков 150 и 300 мМ NaCl в течение 2 сут приводила к достоверному росту пероксидазной активности. После 3 сут-экспозиции активность пероксидазы возвращалась к контрольному уровню.

При исследовании действия гербицидов на пероксидазную активность в проростках пшеницы выявлено следующее. Обработка проростков **П** в концентрациях 5, 10, 20 мг/л в течение 1 и 2 сут вызывала достоверное уменьшение активности пероксидазы по сравнению с контролем. При этом с увеличением экспозиции данный эффект уменьшался. Активность пероксидазы при выращивании проростков в течение 3 сут в среде, содержащей 5 мг/л **П**, возвращалась к контрольному значению. Под действием **П** в концентрациях 10 и 20 мг/л наблюдалось достоверное увеличение активности пероксидазы. Под действием **А** в концентрациях 5 и 10 мг/л после 1 сут воздействия происходило достоверное уменьшение, а под действием 20 мг/л – достоверное увеличение активности пероксидазы по сравнению с контролем. С увеличением экспозиции проростков пшеницы во всех растворах **А** до 2 суток наблюдалась достоверная активация исследуемого фермента. При дальнейшем увеличении времени обработки проростков пшеницы сим-триазином активность пероксидазы еще больше возрастала в присутствии 5 мг/л и возвращалась к контрольному уровню в присутствии 10 и 20 мг/л **А**. Под действием **Ат** в концентрации 10^{-6} М после 1 и 2 сут воздействия происходило достоверное увеличение, а после 3 сут – достоверное уменьшение активности пероксидазы по отношению к контрольному значению. Под действием **Ат** а в концентрации 10^{-5} М после 1 сут воздействия происходило достоверное увеличение активности пероксидазы, после 2 сут воздействия данной концентрации гербицида достоверного изменения активности пероксидазы не выявлено, а после 3 сут – происходило достоверное уменьшение активности пероксидазы по отношению к контрольному значению. **Ат** в концентрации 10^{-4} М после 1 и 2 сут не вызывал достоверных изменений активности пероксидазы, после 3

сут – индуцировал достоверное уменьшение активности пероксидазы по отношению к контрольному значению.

Параллельно с оценкой активности пероксидазы проводилось определение концентрации диеновых, триеновых и оксодиеновых конъюгатов. При сравнительном анализе динамики изменения концентрации продуктов ПОЛ и активности пероксидазы выявлено, что уровень продуктов ПОЛ в большинстве случаев коррелировал с уровнем активности пероксидазы.

На основании проведенных экспериментов можно заключить, что засоление разного уровня и присутствие в среде выращивания сим-триазиновых гербицидов во всех протестированных концентрациях в первые сутки воздействия индуцируют уменьшение ферментативной активности пероксидазы. Ответная реакция проростков на обработку гербицидом атрибутом в низких концентрациях в этот временной промежуток выражается в активации фермента. После 2сут- и 3сут-экспозиции проростков в растворах хлорида натрия зафиксирован рост пероксидазной активности. При действии в течение 3 сут сим-триазиновых гербицидов в растительном организме наблюдается преимущественно активация пероксидазы, а при действии атрибута – уменьшение ее активности.

Таким образом, можно заключить, что, во-первых, характер изменения активности пероксидазы зависит от природы химического стрессора: активация данного фермента на действие засоления и сим-триазинов происходит после 2-3сут, а на действие атрибута – после 1сут. Во-вторых, чувствительность растительного организма к засолению определяется стадией его развития: обработанные в 10-ти дневном возрасте проростки сохраняют жизнеспособность в присутствии 300 мМ NaCl. В-третьих, изменение активности пероксидазы в ответ на действие стрессоров носит неспецифический характер, а определение пероксидазной активности может служить основой для оценки устойчивости растений к засолению и действию гербицидов и сопутствующему им окислительному стрессу.

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений. – М.: Наука, 1988. 128 с.

2. Зайцев В.Н., Корсакова О.М., Жукова Н.В. Эффективность проращивания семян в рулонах // Селекция и семеноводство. 1983.

№11. С. 39 – 40.

3. Третьяков Н.Н., Карнаухова Т.В., Паничкин Л.А. Практикум по физиологии растений.- М: Агропромиздат, 1990. 271 с.

АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ *Trichoderma harzianum 203*

Т.П. Якушенкова, М. Хади

Казанский федеральный университет, г.Казань, Россия; e-mail: tyakushe@kpfu.ru

В настоящее время большая часть Земли в течение года подвергается действию различных неблагоприятных факторов внешней среды, таких, как засуха, пониженные температуры [3], засоление [2;3], несбалансированное минеральное питание, воздействие патогенов-вирусов [2] и грибов рода *Fusarium* [1]. Для борьбы с патогенами растения в процессе эволюции выработали различные как конститутивные, так и индуцибельные защитные механизмы.

Активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в защите растений, поскольку могут являться сигнальными молекулами. Под контролем АФК находятся реакции сверхчувствительности и апоптоза. При патогенезе благодаря реакции сверхчувствительности вокруг патогена формируется зона из мертвых растительных клеток, содержащих в больших количествах антимикробные соединения [4]. АФК вызывают разрушение ДНК, бактериальных ферментов, перекисное окисление липидов, разрушение мембран, поэтому являются токсичными для микроорганизмов [5].

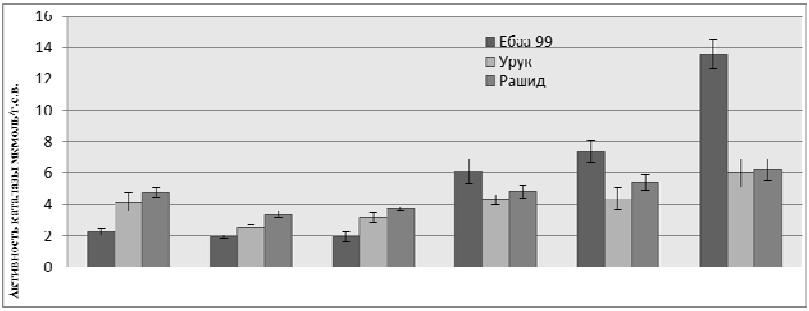
Новой вехой в развитии экологически безопасной комплексной защиты посевов от различного рода заболеваний является использование индукторов системной устойчивости, таких как непатогенные или условно-патогенные микроорганизмы, относящихся к отдельному типу ISR (induced systemic resistance) взаимодействий, наиболее перспективных с практической точки зрения. Известно, что гриб *Trichoderma harzianum* индуцирует у многих видов сельскохозяйственных культур устойчивость к корневым гнилям. С связи с этим целью нашего исследования явилась оценка протекторного действия гриба -

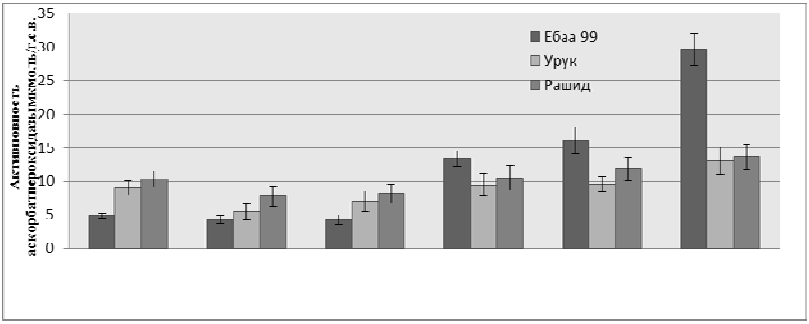
антагониста *Trichoderma harzianum 203* при инфицировании проростков пшеницы патогенным грибом *Fusarium oxysporum.*

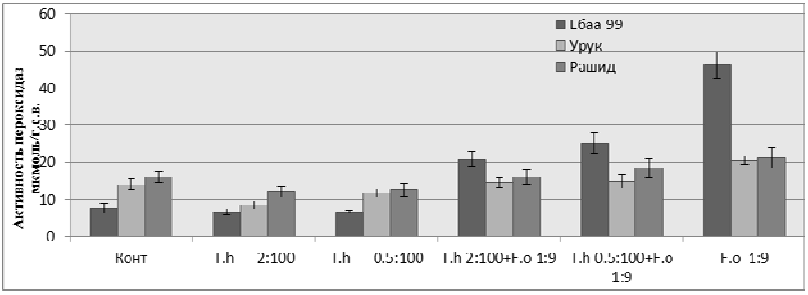
Объектом исследования служили проростки яровой пшеницы разные по устойчивости к воздействию фитопатогенов сортов пшеницы Иракской селекции. Возраст проростков 8 суток.

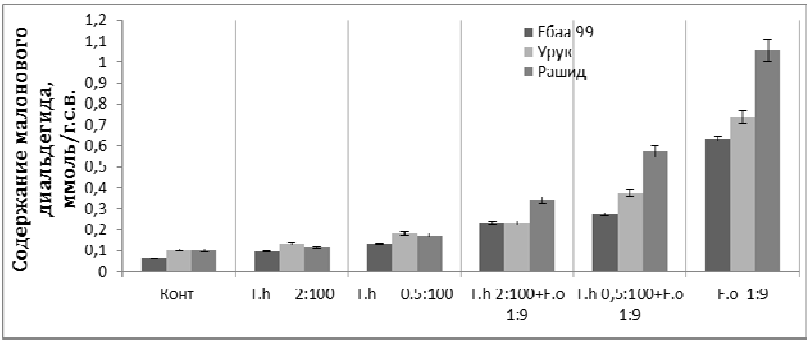
Сорт *Урук* относится к мягкой озимой пшенице. Устойчивость к полеганию высокая, к патогенам средняя. Сорт *Ебаа 99* относится к мягким озимым сортам пшеницы. Устойчив к полеганию, обладает высокой устойчивостью к патогенам. Характеризуется высокой засухоустойчивостью. Сорт *Рашид* относится к яровым мягким пшеницам. Обладает высокой устойчивостью к полеганию, низкой к патогенам, средней устойчивостью к засухе. У растений контрольного варианта наибольшая активность антиоксидантных ферментов наблюдалась у малоустойчивого сорта Рашид. Это вероятно связано с заражением семян этого сорта патогенными микромицетами - *Fusarium oxysporum и Puccini graminis tritici*. При определении фитозараженности у устойчивого и среднеустойчивого сортов поражение фитопатогенной микробиотой не было выявлено.

При исследовании влияния *T.harzianum* на активность антиоксидатных ферментов было установлено, что используемый штамм гриба-антагониста *T.harzianum* не вызывает изменений в активности антиоксидантных ферментов у устойчивого сорта Ебаа99, а у средне- и малоустойчивого сортов вызывает некоторое снижение активности антиоксидантных ферментов.









При инфицировании проростков грибом-патогеном *F. oxysporum* наблюдается достоверное возрастание активности всех изучаемых ферментов у устойчивого сорта. Полученные данные по активности антиоксидантных ферментов соотносятся с содержанием малонового диальдегада у данных проростков пшеницы.

Колонизация корней проростков грибом-антагонистом *Trichoderma harzianum* 203 снижает перекисное окисление липидов, при инфицировании *F. oxysporum,* что выражается в снижении со-

держания малонового диальдегида. Снижение в содержании малонового диальдегида у корней проростков под влиянием *Trichoderma harzianum 203* и *Fusarium oxysporum* свидетельствует об их большей устойчивости. Формирование устойчивости у проростков пшеницы не вызвано повышением активности изученных антиоксидантных ферментов. Возможно гриб-антагонист *T.harzianum* продуцирует ряд соединений-антиоксидантов - аскорбиновую кислоту, восстановленный глутатион, флавоноиды. Все эти соединения способны неферментативно нейтрализовать активные формы кислорода.

1. Kosova K., Chrpov J. Cereal resistance to *Fusarium* head blight and possibilities of its improvement through breeding // Czech J. Genet. Plant Breed. 2009. V. 45. P. 87–105.

2. Kosova K., Prasil I.T., Vitamvas P. The relationship between vernalization and photoperiod ically-regulated genes and the development of frost tolerance in wheat and barley //Biological Plantarum. 2008 .V.52. P. 601–615.

3. Kosova K., Prasil I.T., Vitamvas P. Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition // International Journal of Molecular Sciences . 2013. V.14.P. 6757–6789.

4. Chen H. J., Wu S.D., Huang G.J., Shen C.Y., Afiyanti M. Expression of a cloned sweet potato catalase *SPCAT1* alleviates ethephon-mediated leaf senescence and H_2O_2 elevation // J. Plant Physiol.2012.V. 169. P. 86–97.

5. Shao H. B., Chu L.Y., Lu Z. H., Kang C.M. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells // Int. J. Biol. Sci.2008.V.4. P. 8-14.

АФК В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ PR-БЕЛКОВ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Л.Г. Яруллина[1,2], Р.И. Касимова[1], Г.Ф., Бурханова[1],
М.В. Муратова[2], Е.А. Черепанова[1]

[1]ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия

[2]ФГБОУ ВПО Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия; e-mail: yarullina@bk.ru

Наиболее ранней ответной реакцией растений на инфицирование патогенами является генерация в них активных форм кислорода (АФК), в том числе пероксида водорода (H_2O_2). H_2O_2, как сигнальная молекула, может активировать транскрипционные процессы в клетках растений, что приводит к повышению экспрессии генов PR-белков. Сигнальными молекулами, механизм защитного действия которых связан с индукцией генерации АФК в растительных тканях, являются салициловая (СК) и жасмоновая (ЖК) кислоты, хитоолигосахариды (ХОС), оксилипины (ОЛ), метаболиты эндофитных бактерий (МБ).

Работа проводилась на растениях мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. и на клубнях картофеля *Solanum tuberosum* L. Используемые в работе возбудители грибных болезней – гемибиотроф *Septoria nodorum* Berk., некротроф *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoenaker. и оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary., были выделены из местных популяций. Семена пшеницы перед посевом обрабатывали СК 10^{-5} М, ЖК 10^{-7} М и ХОС 10^{-6} М со СА 30% и 65%. Из клубней картофеля вырезали диски толщиной 14 мм и диаметром 24 мм. На поверхность дисков наносили по 50 мкл ЖК 10-^{7} М, ОЛ 20 мкг/мл, МБ *Bacillus subtilis* штамм 26Д 2 мкг/мл или воды. Спустя 48 часов эту же поверхность инфицировали зооспорами возбудителя фитофтороза *P. infestans* при нагрузке 10^4 спор/мл. Активность пероксидазы и оксалатоксидазы оценивали по степени окисления хромогенного субстрата о-фенилендиамина. Концентрацию H_2O_2 измеряли с использованием красителя ксиленолового оранжевого. Для выделения РНК из растений использовали видоизмененный метод Chomezynski (1987). Для получение кДНК из выделенных мРНК растений проводили обратно-транскрипционную ПЦР с использованием M-MuLV обратной транскриптазы. Для проведения ПЦР были подобраны высокоспецифичные праймеры к генам анионной пероксидазы TC151917, оксалатоксидазы AJ556991.9, ингибитора протеиназы EU293132.1, хитиназы AB029935.1 и β-тубулина DQ 435668.1 с помощью программ Primer Quest, Primer Select. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием компьютерных программ StatSoft (Statistica 6.0). На рисунках приведены средние результаты опыта и их стандартные ошибки.

Патосистема «*T. aestivum – S. nodorum*». Наблюдение за ростом

S. nodorum на листьях пшеницы восприимчивого сорта Жница выявило, что под влиянием обработок СК и ЖК площадь инфекционного пятна была меньше, чем в контроле (рис. 1а). Также обнаружено, что и в инфицированном контроле, и во всех вариантах опыта в листьях появлялись H_2O_2-продуцирующие клетки (рис. 1б). Причем, в опытных вариантах количество H_2O_2-продуцирующих клеток было больше, чем в контроле. Таким образом, при обработке семян как СК, так и ЖК наблюдался слабый рост гриба на листьях, что указывает на индуцирование устойчивости пшеницы, в том числе, за счет усиления генерации H_2O_2. В регуляции уровня H_2O_2 в растительных тканях большую роль отводят оксидоредуктазам, таким как, оксалатоксидазы и пероксидазы, относящимся к PR-белкам. Исследования транскрипционной активности генов анионной пероксидазы TC151917 и оксалатоксидазы AJ556991.1 показали, что в неинфицированных листьях пшеницы транскрипты проявляются слабо, в то же время, при инфицировании экспрессия генов TC151917 и AJ556991.1 через 24 ч после инокуляции усиливалась. СК, в отличие от ЖК, оказывала более значительный индуцирующий эффект на транскрипционную активность генов TC151917 и AJ556991.1 на раннем этапе инфекционного процесса. Стимулирующее действие ЖК на экспрессию пероксидазы и оксалатоксидазы проявлялось спустя 48 ч после инфицирования. Динамика изменения ферментативной активности оксалатоксидазы и пероксидазы была схожа с профилем экспрессии соответствующих генов.

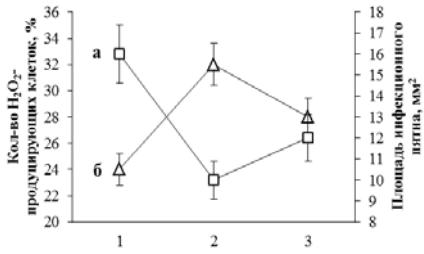


Рис. Влияние СК и ЖК на интенсивность развития возбудителя септориоза на листьях пшеницы (а) и продукцию H_2O_2 в зоне инфицирования (б): 1 – контроль, 2 – обработка СК, 3 – обработка ЖК. 48 ч после инфицирования.

Патосистема «*T. aestivum* – *B. sorokiniana*». Возбудитель корневой гнили *B. sorokiniana* является широко распространенным патогеном с некротрофным типом питания. Значительный интерес представляло выявление роли H_2O_2 в индукции устойчивости к *B. soroki-*

niana под воздействием элиситоров хитиновой природы. Было выявлено, что концентрация H_2O_2 в корнях пшеницы изменялась под влиянием предобработки ХОС и инфицирования *B. sorokiniana*. При этом в корнях растений, предобработанных ХОС со СА 65%, уровень накопления H_2O_2 был выше на 20%, чем в инфицированном контроле, а предобработка семян ХОС со СА 30% приводила к снижению содержания H_2O_2 в корнях растений по сравнению с контролем.

При исследовании уровня транскрипционной активности генов оксалатоксидазы AJ556991.1 и пероксидазы TC151917 было выявлено, что ХОС со СА 65% более эффективно индуцируют повышение транскрипционной активности. В то же время, ХОС со СА 30% и СА 65% практически в равной мере оказывали влияние на экспрессию гена хитиназы AB029935.1 в корнях неинфицированных растений. Однако при предобработке ХОС и последующем инфицировании *B. sorokiniana* транскрипционная активность гена AB029935.1 в корнях была более значительной и продолжительной. Предобработка ХОС и инфицирование приводили также к усилению экспрессии гена ингибитора протеиназы EU293132.1. Таким образом, ХОС со СА 65% более эффективно индуцируют активность генов PR-белков по сравнению с ХОС со СА 30%. Вероятно, это обусловлено тем, что имеется высоко специфическое связывание ацетильных группа производных хитина с мембранными рецепторами растений лектиновой природы. Повышение степени ацетилирования ХОС способствует усилению сигнального каскада в растительных клетках.

Патоситема «*S. tuberosum – Ph. infestans*». Наблюдения за ростом возбудителя фитофтороза показали, что в контроле степень поражения дисков составляла 34±3%, на клубнях, предобработанных ОЛ и МБ *B. subtilis*, 20±2% и 26±2 % соответственно, а при воздействии ЖК - только 15±1%.

Обработка ЖК, ОЛ, МБ *B. subtilis* вызывала повышение содержания H_2O_2 в тканях и изменения в суммарном спектре растворимых белков в диапазоне pH 6-7 и 7.5-8.7. Методом 2DE было идентифицировано 39 полипептидов, которые имели качественные и количественные различия. Так, заражение *P. infestans* вызывало экспрессию ряда минорных белков клубней, которые не обнаруживались в контроле: Мм/pI 42/8.2, Мм/pI 27.5/7.75, Мм/pI 90.0/7.7. В диапазоне pH 5.8-6.5 было обнаружено 5 индуцируемых жасмонатом белков: Мм/pI

24/5.8; Мм/pI 75/6.45; Мм/pI 68/6.45; Мм/pI 19/6.5; Мм/pI 69/6.3.

В инфицированных клубнях под воздействием ОЛ в несколько раз (от 1.3 до 5.12) усиливалась экспрессия 12 белков. *De novo* синтезировались 2 белка: Мм/pI 53/6.45 и Мм/pI 51/6.7. Интересно, что под воздействием обработки как ЖК, так и ОЛ при инфицировании *P. infestans* в тканях *S. tuberosum* увеличивалась экспрессия 7 белков. Исследование растворимой фракции белков в варианте с обработкой МБ *B. subtilis* выявило повышение активности 8 белков при инфицировании *P. infestans*. Интересно, что МБ *B. subtilis* индуцировали подавление экспрессии белков с Мм/pI 20.5/6.4 и Мм/pI 60.5/7.0. Причем, подавление экспрессии белка Мм/pI 60.5/7.0 наблюдалось во всех вариантах опыта в отличие от контроля.

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить связь между усилением продукции H_2O_2 и наличием качественных и количественных изменений в экспрессии генов защитных белков в растительных тканях при инфицировании патогенами различной трофности, что открывает перспективы использования различных сигнальных молекул для индуцирования устойчивости растений.

ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ САЛИЦИЛАТ-ДЕФИЦИТНЫХ ТРАНСФОРМАНТОВ АРАБИДОПСИСА *NahG*

Т.О. Ястреб[1], Ю.Е. Колупаев[1], А.П. Дмитриев[2]

[1]Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, Украина; e-mail: plant_biology@mail.ru

[2]Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины Киев, Украина

Пероксид водорода и салициловая кислота (СК) – взаимосвязанные сигнальные посредники в трансдукции и амплификации стрессовых сигналов у растений. Так, стресс-индуцируемое образование АФК (в основном, пероксида водорода) в различных клеточных компартментах может служить триггером синтеза СК [1]. С другой стороны, многие физиологические эффекты СК опосредованы генерацией АФК [2].

Известно, что пероксид водорода как сигнальный посредник задействован в индуцировании ряда адаптивных реакций, в том числе необходимых для развития устойчивости растений к солевому стрессу. В частности, H_2O_2 участвует в активации системы антиоксидантной защиты [3], накоплении совместимых осмолитов [4] и регуляции Na^+/K^+-гомеостаза в растительных клетках [5]. Получены также убедительные доказательства участия эндогенной и экзогенной СК в индуцировании солеустойчивости растений [6].

Вместе с тем, сведения о влиянии салицилатного статуса растений на их устойчивость к действию стрессоров весьма противоречивы. Так, давно установлена повышенная чувствительность салицилат-дефицитных растений к инфицированию, обусловленная отсутствием у них способности синтезировать PR-белки [7]. С другой стороны, салицилат-дефицитные трансформанты арабидопсиса *NahG* оказались более устойчивыми к интенсивному освещению, действию агентов осмотического (манитолу) и окислительного (метилвиологену) стрессов [8]. А другие авторы, напротив, установили более высокую по сравнению с растениями дикого типа чувствительность этих трансформантов к осмотическому стрессу, вызываемому обработкой полиэтиленгликолем [9].

В целом роль СК как возможного посредника в процессах индуцирования с помощью H_2O_2 устойчивости растений к абиотическим стрессорам исследована недостаточно.

Целью работы было изучение реакции растений арабидопсиса дикого типа (*Col-0*) и трансформированных геном бактериальной салицилатгидроксилазы (*NahG*) на обработку пероксидом водорода и последующее воздействие солевого стресса.

Для исследований использовали 5-недельные растения, выращенные в водной культуре на модифицированной среде Хогланда. Пероксид водорода в конечной концентрации 500 мкМ вносили в питательную среду и инкубировали на ней растения в течение 24 ч. Затем их переносили на питательную смесь без H_2O_2, часть растений подвергали солевому стрессу добавлением 200 мМ NaCl. Через 24 ч после инкубации в присутствии хлорида натрия растения переносили на обычную питательную среду.

Биомассу растений определяли через 3 сут после прекращения действия экзогенного H_2O_2 и/или через 2 сут после солевого стресса.

Количество пероксида водорода, активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы – СОД, каталазы и гваяколпероксидазы – ГПО) и содержание хлорофиллов определяли в зрелых листьях прикорневой розетки.

Полученные результаты свидетельствуют, что 24-часовая предварительная обработка раствором H_2O_2 (500 мкМ) несколько ингибировала рост растений дикого типа и не влияла на ростовые показатели трансформантов *NahG*. При действии солевого стресса угнетение роста салицилат-дефицитных растений было менее заметным по сравнению с растениями дикого типа. При этом обработка H_2O_2 растений *NahG* уменьшала ингибирование их роста в условиях солевого стресса. У растений дикого типа такой эффект проявлялся слабее. Обработка растений пероксидом водорода предотвращала вызываемое солевым стрессом снижение содержания хлорофиллов у трансформантов *NahG* и в меньшей степени влияла на количество фотосинтетических пигментов у растений дикого типа.

Конститутивное содержание пероксида водорода у растений *NahG* было выше, чем у растений *Col-0*. Внесение H_2O_2 в среду выращивания вызывало повышение эндогенного содержания пероксида водорода у растений дикого типа, но не влияло на этот показатель у салицилат-дефицитных растений. После солевого стресса у растений дикого типа, как необработанных, так и обработанных пероксидом водорода, его эндогенное содержание существенно увеличивалось. В то же время обработка пероксидом водорода предотвращала стресс-индуцируемое повышение его содержания в листьях трансформантов *NahG*.

Обработка пероксидом водорода вызывала повышение активности СОД у растений дикого типа и у трансформантов *NahG*. При солевом стрессе активность СОД снижалась у растений дикого типа, но не у салицилат-дефицитных трансформантов. Предстрессовое воздействие пероксида водорода стабилизировало активность фермента у растений генотипа *Col-0*.

Активность каталазы не изменялась при обработке пероксидом водорода у растений дикого типа и повышалась у трансформантов *NahG*. Обработка H_2O_2 предотвращала вызываемое солевым стрессом снижение активности этого фермента у растений дикого типа. У салицилат-дефицитных растений активность каталазы при солевом

стрессе оставалась стабильной независимо от воздействия экзогенного H_2O_2.

Базовая активность ГПО у трансформантов *NahG* была значительно выше, чем у растений дикого типа. Обработка пероксидом водорода вызывала ее увеличение у растений обоих генотипов. В ответ на солевой стресс у растений дикого типа и *NahG*, предварительно обработанных пероксидом водорода, активность ГПО была значительно выше, чем у необработанных. При этом абсолютные ее величины у трансформантов *NahG* существенно превышали соответствующие значения у растений дикого типа.

Таким образом, салицилат-дефицитные растения арабидопсиса, трансформированные геном бактериальной салицилатгидроксилазы *NahG*, оказались более устойчивыми к действию 200 мМ NaCl, чем растения дикого типа. Предобработка пероксидом водорода повышала солеустойчивость растений обоих генотипов, при этом ее позитивное влияние было более выраженным у растений *NahG*. Полученные результаты позволяют предположить наличие у растений арабидопсиса путей трансдукции сигнала пероксида водорода, функционирующих без участия СК. При этом сам по себе салицилат-дефицитный статус растений обусловливает, вероятно, функционирование механизмов стабилизации про-/антиоксидантного равновесия, природу которых еще предстоит выяснить.

1. Herrera-Vásquez A., Salinas P., Holuigue L. Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression // Front. Plant Sci. 2015. V. 6:171.

2. Kimura M., Kawano T. Salicylic acid-induced superoxide generation catalyzed by plant peroxidase in hydrogen peroxide-independent manner // Plant Signal. Behav. 2015. V. 10:11. e1000145.

3. Mostofa M.G., Fujita M., Tran L.S.P. Nitric oxide mediates hydrogen peroxide- and salicylic acid induced salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings // Plant Growth Regul. 2015. V. 77. P. 265–277.

4. Ma L., Zhang H., Sun L., Jiao Y., Zhang G., Miao C., Hao F. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na^+/K^+ homeostasis in Arabidopsis under salt stress // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 305–317.

5. Yang Y., Yang F., Li X., Shi R., Lu J. Signal regulation of proline metabolism in callus of the halophyte *Nitraria tangutorum* Bobr.

grown under salinity stress // Plant Cell, Tiss. Org. Cult. – 2013. – V. 112. – P. 33–42.

6. Shakirova F.M., Sakhabutdinova 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. P. 317–322.

7. Neuencchwander U., Vernooij B., Friedrich L., Uknes S., Kessmann H., Ryals J. Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? // Plant J. 1995. V. 8. P. 227–233.

8. Borsani O., Valpuesta V., Botella M.A. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings // Plant Physiol. 2001. V. 126. P. 1024–1030.

9. He Q., Zhao S., Ma Q., Zhang Y., Huang L., Li G., Hao L. Endogenous salicylic acid levels and signaling positively regulate Arabidopsis response to polyethylene glycol-simulated drought stress // J. Plant Growth Regul. 2014. V. 33. P. 871–880.

POLYAMINES MODIFY STRESS-INDUCED SIGNALING REACTIONS AND TRIGGER PROGRAMMED CELL DEATH IN ARABIDOPSIS ROOTS

A.A. Chychko[1], V. Mackievic[1], G. Pozhvanov[3], D. Svistunenko[2], S. Subramaniam[2], V. Samohina[2], E.A. Klimova[4], E.V. Tyutereva[4], Ю.В. Кирисюк[5], S. Medvedev[3], O.V. Voitsekhovskaja[4], V. Demidchik[1,4]*

[1]*Department of Plant Cell Biology and Bioengineering, Biological Faculty, Belarusian State University, 220030, 4 Independence Ave., Minsk, Belarus*

[2]*School of Biological Sciences, University of Essex, Colchester, CO4 3SQ, United Kingdom*

[3]*Department of Plant Physiology and Biochemistry, Faculty of Biology and Soil Science, Saint-Petersburg State University, Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg 199034, Russian Federation*

[4]*Komarov Botanical Institute RAS, 2 Professora Popova Street, 197376, Saint-Petersburg, Russian Federation*

[5]*Брестский государственный университет имени А.С. Пушкина, бульвар Космонавтов 21, 224016, Брест, Беларусь; e-mail: dzemidchyk@bsu.by*

Polyamines are water-soluble aliphatic polyanionic substances containing several amine groups and available in all plant cells [1, 2]. Diamine putrescine NH_2-$(CH_2)_4$-NH_2, triamine spermidine NH_2-$(CH_2)_4$-NH-$(CH_2)_3$-NH_2 and tetramine spermine NH_2-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_4$-NH-$(CH_2)_3$-NH_2 are the most abundant polyamines in plants [3, 4]. They have a fundamental importance for DNA stability in nucleus, where they act as low molecular weight chaperons [5]. Polyamines are also involved in plant stress responses [6]. The detected concentration of polyamines in plants varies from 1 to 10 mM and increases in response to abiotic stresses [1-4, 6, 7]. The symptoms of oxidative stress in plants decrease, when enzymes of polyamine biosynthesis are over-expressed [8]. Surprisingly, polyamines also play the role of substrate for ROS production in the apoplast by polyamine oxidase [8, 9]. Here, we demonstrate that polyamines decrease the intensi-

ty of NaCl- and ROS-induced Ca^{2+} signals, diminish loss of K^+ via ROS-activated K^+ efflux channel GORK and act as hydroxyl radical scavengers. At the same time, we show that they stimulate superoxide production and trigger programmed cell death (PCD).

Roots of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. ecotype WS-0 (Wassilewskija) and Col-0-based aequorin-transformed plants were used. They were vertically grown on Petri dishes in sterile conditions during 5 to 10 days. Ca^{2+} signals were measured as decribed in Demidchik *et al*. 2003 [10]. Morphological and biochemical symptoms of PCD and modification of hydroxyl radical generation (EPR spectroscopy) were assessed in control and after treatment with 0.01-3 mM spermine, spermidine and putrescine as described in Demidchik *et al*. 2010 [11]. Generation of superoxide anion radicals was tested using a fluorescent probe dihydroethidium (10^{-6} M; Sigma, USA).

Exogenously added 100-300 mM NaCl and hydroxyl radical-producing mixtures (0.1-1 mM Cu^{2+}, L-ascorbate) induced elevation of cytosolic Ca^{2+} activity from approximately 80-120 nM to 0.6-1,2 μM. Application of these stresses to plants pre-treated with 1 mM polyamines produced 40-80% less Ca^{2+} elevation, suggesting that polyamines caused incomplete inhibition of stress-induced Ca^{2+} signals.

Experiments with electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy demonstrated that spermine and spermidine can decrease the amplitude of Fenton-induced DMPO-hydroxyl radical adducts. These polyamines modified the spectrum of DMPO adducts leading to formation of some novel radicals.

Addition of 0.03-0.3 mM polyamines to root tips significantly inhibited elongation of roots. Increase of spermine or spermidine concentration up to 1 mM abolished root elongation. The amount of root cells with PCD symptoms (protoplasm shrinkage, plasma membrane damages, dark spots, increase of protease activity assessed by FITC-VAD-fmk, loss of membrane potential, etc.) in control conditions did not exceed 10%. The quantity of epidermal cells with PCD symptoms increased dramatically when seedlings were exposed to 0.3-3 mM spermine, spermidine and putrescine (Fig. 1). In all cases, spermine and spermidine caused more pronounced effects than putrescine.

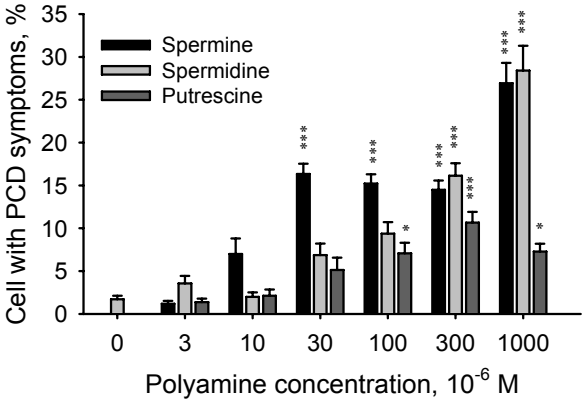


Figure 1. Effect of different levels of polyamines on the number of Arabidopsis thaliana atrichoblasts with morphological symptoms of programmed cell death.

Tests with dihydroethidium showed that high concentrations of spermine and spermidine (>0,3 mM) stimulated superoxide generation in root cells while same concentration of spermidine did not cause this reaction. Intriguingly, putrescine significantly inhibited superoxide generation.

Using *GFP-FABD2 Arabidopsis* roots and confocal microscopy, we have also found that polyamines partially prevent actin polymerization induced by NaCl and hydroxyl radical-generating mixtures. Similar effects were caused by hydroxyl scavengers and Ca^{2+} channel antagonists suggesting that polyamine action was mediated by ROS- and Ca^{2+}-dependent mechanisms.

Potassium efflux measurements that were carried out with $^{86}Rb^{+}$ showed that polyamines (1 mM spermine) partially inhibited NaCl- and oxidative stress-induced K^{+} efflux from intact roots. This effect of polyamines was through the action on the K^{+} channel GORK because it was significantly smaller in knockout *gork1-1* lines.

We have found that polyamines cause incomplete inhibition of NaCl- and ROS-induced Ca^{2+} signals, K^{+} efflux, actin polymerization and stress-induced hydroxyl radical production. High levels of some polyamines induced superoxide generation and triggered PCD. Overall obtained results strongly suggest that polyamines have a regulatory action on plant stress responses. They cause 'nourishing' effects, which do not block reactions needed for stress signaling but prevent serious oxidative and Ca^{2+}-induced damage of cells.

We thank Russian Science Foundation for the support (grant#15-14-30008 to Vadim Demidchik).

1. Kusano, T. Polyamines: essential factors for growth and survival / T. Kusano, T. Berberich, · C. Tateda, · Y. Takahashi // Planta. – 2008. – Vol. 228, - P. 367–381.

2. Takahashi, T. Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses / T. Takahashi, J. I. Kakehi / Annals of botany. – 2010, - Vol. 105, № 1, - P. 1-6.

3. Gill, S. S. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress / S. S. Gill, N. Tuteja / Plant signaling and behavior. – 2010, - Vol. 5, № 1, - P. 26-33.

4. Bouchereau, A. Polyamines and environmental challenges: recent development /, A. Bouchereau, A. Aziz, F. Larher, J. Martin-Tanguy // Plant science. – 1999, - Vol. 140, - P. 103–125.

5. A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen / A. U. Khan, Y. H. Mei, T. Wilson // Proceedings of national academy of sciences of USA. – 1992, - Vol. 89, № 23, - P. 11426–11427.

6. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants / J. H. Liu [et al.] // Plant biotechnology. - 2007. – Vol. 24, - P. 117–126.

7. Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide / J. E. Rider [et al.] // Amino acids. – 2007. – Vol. 33, - P. 231-240.

8. Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana* / Y. Kasukabe [et al.] // Plant cell physiology. - 2004. – Vol. 45, - P. 712–722.

9. Cross-talk between reactive oxygen species and polyamines in regulation of ion transport across the plasma membrane: implications for plant adaptive responses / I. Pottosin [et al.] // Journal of experimental botany. – 2014. – Vol. 65, № 5. – P. 1271-1283.

10. Plant extracellular ATP signaling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca^{2+} channels / V. Demidchik, Z. Shang, R. Shin, E. Thompson, L. Rubio, S. Chivasa, A.R. Slabas, B.J. Glover, D.P. Schachtman, S.N. Shabala, J.M. Davies // Plant journal. – 2009. – Vol. 58, № 6. – P. 903–913.

11. *Arabidopsis* root K^+ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death / V. Demidchik, T.A. Cuin, D. Svistunenko, S.J. Smith, A.J. Miller, S. Shabala, A. Sokolik, V. Yurin // Journal of cell science. – 2010. – Vol. 123, № 13. – P. 1468–1479.

ROLE OF REDOX-ACTIVE METABOLITES UPON LIGHT AND MECHANICAL LOCAL STIMULI IN *Chara corallina*

A. Komarova[1], P. Gorelkin[2], A. Erofeev[1], T. Bibikova[1], A. Bulychev[1]

[1]*Lomonosov Moscow State University, Russian Federation;*
e-mail: an.v.komarova@gmail.com;

[2]*OOO "MNT", Russian Federation;*

Cell reduction-oxidation status functions as a major integrator of subcellular and extracellular metabolism. Due to the involvement of redox-active metabolites such as NAD(H) and NADP(H) in many metabolic reactions, the reduction-oxidation status plays important role in cellular metabolism. This status acts as an effective signal that informs the cell of environmental and stress conditions. After transmission of this information, the cell is able to appropriately respond via a range of mechanisms. While the knowledge of the network of metabolic pathways and their intraorganellar redox status regulation has increased in the last years, little is known about the plant interorganellar redox signals coordinating these networks and the underlying mechanism that can transmit these signals. The cooperation between distant part of the cells, mediated by lateral transport of molecules with the streaming cytoplasm, as well as the role of these interactions in regulation of photosynthesis and plasmalemmal transport systems remained hidden for a long time.

We applied a comparatively new approach to investigate the role of cyclosis in signal transmission along large cells, such as internodes of characean algae. Microscopic measurements of actual chlorophyll fluorescence (F′) in *Chara corallina* were performed on cell regions positioned few millimeters downstream from the zone of localized illumination (LL) under conditions of uninterrupted and transiently arrested cytoplasmic flow. The local illumination of the internodal cells with an intense 30 s

pulse of white light caused a transient increase of modulated chlorophyll fluorescence in cell regions positioned downstream the cytoplasmic flow after a delay whose duration increased with the axial distance from the light source. No changes in fluorescence were observed in cell regions residing upstream of the light spot. The transient increase in actual fluorescence F′ in cell areas exposed to constant dim illumination at large distances from the brightly lit area indicates the transmission of photosynthetically active metabolite between chloroplasts separated by 1–5mm distances. The shapes of fluorescence transients were sensitive to retardation of cytoplasmic streaming by cytochalasin D and to variations in cyclosis velocity during gradual recovery of streaming after an instant arrest of cyclosis by elicitation of the action potential.

We proposed the following hypothetical scheme of the interactions between distant chloroplasts in *Chara corallina*. The regulatory pathway underlying F′ fluorescence response to illumination of the remote cell region comprises three major stages attributed to different cell locations (Fig. 1). The initial events occurring in the area of LL application include the transport of metabolites across the chloroplast envelope, i.e. the export of excess reducing equivalents or import of compounds depleted in the stroma under illumination. We consider the export of reducing equivalents from the chloroplast stroma to the cytosol as the most likely and well documented event [1-2]. The envelope is endowed with an oxaloacetate/malate transporter (OMT) that operates in concert with malate dehydrogenase (MDH) to export the excess reducing equivalents in the form of malate from the stroma to the cytoplasm under high light conditions. The enzymatic redox conversions of the exported malate are coupled with the accumulation of cytoplasmic NADH. The lateral transfer of the active metabolite from the source region (the area exposed to LL) is the connecting step between the export and import of metabolites across the chloroplast envelope in brightly illuminated and shaded cell areas. The final step of long-distance regulatory pathway comprises the import of cytoplasmic reducing equivalents into the plastid stroma in the shaded cell areas. This import might be mediated by the OMT–MDH (‘malate valve’) acting in the reverse direction compared with the operation of OMT–MDH under high light conditions. The increase in the stromal content of NADPH owing to the operation of this redox shuttle eventually modulates the redox state of the PSII quinone acceptor QA. The abundance of stromal NADPH

and the lack of acceptors beyond PSI under continuous excitation of both photosystems may promote the photochemical reduction of all ETC carriers, including QA, with the respective increase in F′ fluorescence.

The F′ responses to a distant LL were used as an indicator for the passage of cytosolic reductants across the analyzed cell area during measurements of cell surface pH (pHo) in intact and microperforated internodes. Earlier we observed a pH increase near the cell surface after the cell wall microinjury with a micropipette [3]. The appearance of mechanically induced alkaline zone occurs after the short lag period of 20-30 s and the zone relaxation to initial pH level proceeds for 40 min. In microwounded cell regions, the LL-induced increase in F′ occurred synchronously with the increase in pHo, by contrast to a slight decrease in pHo observed prior to perforation. The results show that reducing agents transported with the cytoplasmic flow are involved in rapid pH changes on the surface of microinjured cells. A possibility is considered that cytoplasmic reductants are processed by stress-activated plasmalemmal NADPH oxidase carrying electrons to oxygen with the eventual H^+ consumption on the outer cell side. The measurements of extracellular oxygen concentration in the vicinity of the cell reveal a significant drop of O_2 after cell wall microperforation. These results provide evidence for plasmalemmal NADPH oxidase activation under mechanical stress and for modulation of its functioning by redox-active metabolites transported with cytoplasmic streaming.

In conclusion, we show that fundamental cellular processes such as motility, excitability, photosynthesis and wound healing, are in constant cooperation by means of intracellular transport and the transmembrane exchange of ions and redox-active metabolites.

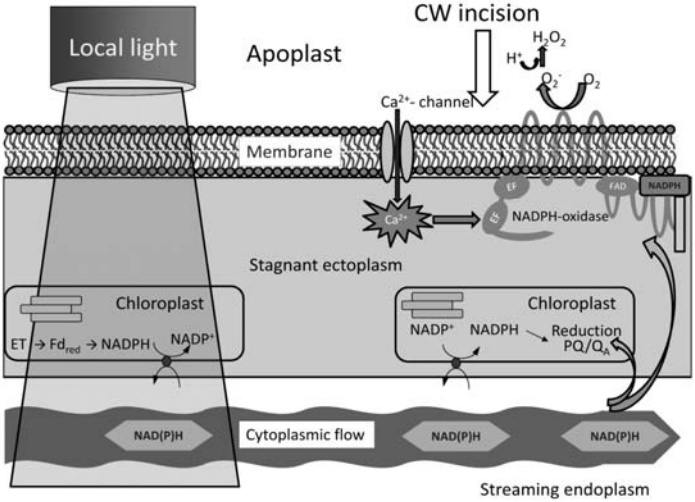


Figure 1. Schematic view of the processes involved in long-distance communications of chloroplasts in Characean internodal cells. In the area of bright local illumination, photosynthetic electron transport (ET) leads to the reduction of Fd and stromal acceptors (NADP), whereas the OMT–MDH shuttle exports the excess reductants into the cytoplasm. The cytoplasmic reducing equivalents move with flowing cytoplasm for distances up ~5 mm. Along this route, the cytoplasmic reductants are imported into the chloroplast stroma, which eventually results in QA reduction and the increase in F′ fluorescence. In addition, the redox-active metabolites may affect the plasmalemmal NADPH-oxidase that activates after cell wall microperforation.

1. Flügge U-I, Heldt HW. Metabolite translocators of the chloroplast envelope // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 1991. Vol. 42. pp. 129–144.

2. Foyer CH, Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications // Antioxidants & Redox Signalling. 2009. Vol. 11. pp. 861–905.

3. Bulychev AA, Alova AV, Bibikova TN. Strong alkalinization of *Chara* cell surface in the area of cell wall incision as an early event in mechanoperception // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. 2013. Vol. 1828. pp. 2359-2369.

EXOGENOUS L-ASCORBIC ACID ACTS AS A SIGNALING AGENT IN PLANT CELLS

M. Makavitskaya[1], I. Navaselsky[1], D. Svistunenko[3], K. Rabadanova[2], O.Voitsekhovskaja[2], E. Tyutereva[2], P. Chikun[1], V. Mackievic[1], V. Samohina[1], D.Straltsova[1], A. Sokolik[1], V. Demidchik [1,2]*

[1]*Department of Plant Cell Biology and Bioengineering, Biological Faculty, Belarusian State University, 4 Independence Avenue, 220030, Minsk, Belarus*

[2]*Komarov Botanical Institute RAS, 2 Professora Popova Street, 197376, Saint Petersburg, Russian Federation*

[3]*School of Biological Sciences, University of Essex, Colchester, Essex CO4 5AP, United Kingdom*

Plants evolved sophisticated signaling systems, which perceive exogenous stimuli and transduce them into cellular and physiological responses. An extracellular ascorbate (L-ascorbic acid) is rarely considered as an agent that is capable of triggering signaling events in plants. However, here, we present data demonstrating that exogenous L-ascorbic acid induces transient elevation of cytosolic free calcium (Ca^{2+}). Such elevations are usually called 'calcium signals' and widely acknowledged as markers of signaling reactions. We also show that ascorbate penetrates plasma membrane through anion channels and leak out from cells and that stresses induce accumulation of oxidized ascorbate in the apoplastic space.

Experiments were carried out with intact roots of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Col-0 constitutively expressing aequorin in cytosol. Seedlings were vertically grown on Petri dishes in sterile conditions during 5 to 12 days. Ca^{2+} signals were measured as decribed in Demidchik *et al*. 2003 [1]. Electrophysiological patch-clamp tests as well as EPR spectroscopy measurements of ascorbyl radicals were carried out accordingly to protocols designed by Demidchik *et al*. 2010 [2].

The minimal concentration of exogenously-added ascorbate, which triggered cytosolic Ca^{2+} transients, was approximately 50 μM. The shape of ascorbate-induced Ca^{2+} signals resembled those that are produced in response to mixture generating hydroxyl radicals (Haber-Weiss reaction components comprising Cu^{2+}, L-ascorbic acid and H_2O_2) (Fig. 1). This ascorbate-induced Ca^{2+} elevation was inhibited by cation channel blockers

(Gd^{3+} and La^{3+}) and hydroxyl radical scavengers (thiourea and DMSO). It decreased significantly after removal of Ca^{2+} from the bathing solution or after addition of transition metal chelators. Moreover, cell wall removal, as tested in experiments with enzymatically isolated protoplasts, resulted in disappearance of ascorbate-induced Ca^{2+} signal. Our data strongly suggest that ascorbate acts on the plasma membrane Ca^{2+}-permeable cation channels via transition metal-catalysed hydroxyl radical generation. In this mechanism, the ascorbate reduces the apoplastic metal pool (Cu^{2+} and Fe^{3+} to Cu^{+} and Fe^{2+}) that interacts with H_2O_2 producing hydroxyl radicals, which are capable of activating the plasma membrane Ca^{2+}-permeable cation channels.

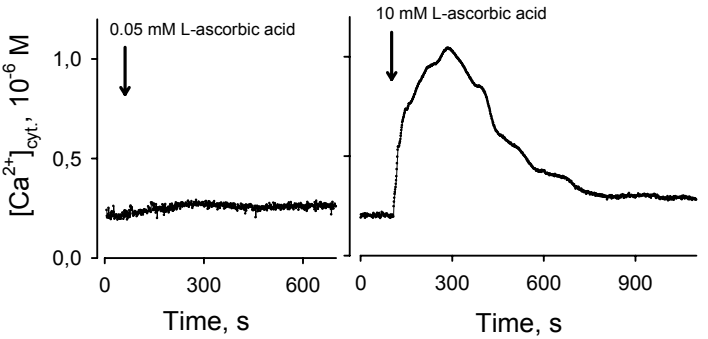


Figure 1. Effect of different concentrations of L-ascorbic acid on the level of cytosolic free Ca^{2+} as measured by aequorin luminometry in Arabidopsis thaliana roots. Bathing solution contained 10 mM $CaCl_2$, 0.3 mM KCl, pH 6 (Mes/Tris).

Tests with patch-clamp technique demonstrated that ascorbate did not activate Ca^{2+} currents in root-derived protoplasts. Using EPR spectroscopy, we measured production of the extracellular ascorbyl radicals in control conditions and after application of salt stress. Stresses, such as salinity or pathogen elicitors, stimulated formation of the ascorbyl radicals. This may be related to increased release of ascorbate from roots under stress. Interestingly, in plants lacking functional K^{+} efflux channel GORK, ascorbate release tended to be higher comparing to wild type plants. In this case, ascorbate could compensate decreased K^{+} efflux to balance osmotic and electric potential changes.

Overall, our experiments demonstrated that extracellular ascorbate can be an important signaling agent in plants that is capable of inducing

transient elevation of cytosolic free Ca^{2+} in transition metal-dependent fashion.

This study was supported by the Russian Science Foundation grant #15-14-30008 to Vadim Demidchik.

1. Plant extracellular ATP signaling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca^{2+} channels / V. Demidchik, Z. Shang, R. Shin, E. Thompson, L. Rubio, S. Chivasa, A.R. Slabas, B.J. Glover, D.P. Schachtman, S.N. Shabala, J.M. Davies // Plant journal. – 2009. – Vol. 58, № 6. – P. 903–913.

2. *Arabidopsis* root K^+ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death / V. Demidchik, T.A. Cuin, D. Svistunenko, S.J. Smith, A.J. Miller, S. Shabala, A. Sokolik, V. Yurin // Journal of cell science. – 2010. – Vol. 123, № 13. – P. 1468–1479.

PEROXIDASE ISOFORMS FROM *DICRANUM SCOPARIUM* HEDW.: PRO- AND ANIOXIDATIVE ACTIVITIES

A.O. Onele[1,2], A.V. Chasov[1,2], L.V. Viktorova[1], F.V. Minibayeva[1,2]

[1]*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Science Centre, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia; e-mail: donjay.ao@gmail.com*

[2]*Kazan Federal University, Kazan, Russia*

Mosses, ancient non-vascular higher plants, are considered at present as convenient models to study stress responses in plants because of their remarkable stress tolerance. They display distinctive adaptations, which allow them to grow in harsh environments on earth and survive desiccation as a result of their strong anti-oxidative enzymatic machinery. Peroxidases are universal enzymes in higher vascular plants, which use H_2O_2 as electron acceptor for oxidation and cross-linking of various molecules. Paradoxiacally, these antioxidative enzymes can also form ROS such as superoxide ion radical ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) or hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$), under certain conditions. Unlike that in vascular plants, the formation of ROS in mosses is not well studied. It is possible that peroxidases of

moss plants, similarly to peroxidases of higher vascular plants, are the key enzymes involved in stress reactions and formation of ROS. Structural identification and functions of moss peroxidases will help us to understand the evolutionary aspects of ROS production and detoxification in higher plants.

Peroxidase activity of *Dicranum scoparium* (Hedw.) was as twice as high of that in *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S.G. and *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. growing together in the same location. Peroxidases in *D. scoparium*, *H. splendens* and *P. schreberi* are present in different isoforms detected by gradient PAGE (3-12 %) in non-denaturing conditions. Visualization of peroxidase activity in the protein extract from *D. scoparium* by staining with *o*-dianisidine revealed two major isoforms with corresponding molecular masses of 197 and 263 kDa. In *H. splendens* five major isoforms were visualized and four isoforms in *P. schreberi*. We discovered that peroxidase of *D. scoparium* could oxidize typical peroxidase substrates such as ABTS, *o*-dianisidine, *p*-coumaric acid and caffeic acid, mediated by H_2O_2. Among these substrates, ABTS demonstrated the highest affinity to peroxidases as it displayed lowest value of (K_m) while the highest V_{max} was observed during the oxidation of *o*-dianisidine. Isoelectric focusing conducted after purification of both crude extract and proteins precipitated from a crude extract of *D. scoparium* with ammonium sulfate revealed more isoforms of peroxidases with p*I*s of 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.5, 4.6, 4.8, 5.1, 8.8, 9.1, 9.3, 9.5, 9.8; the majority of isoforms were anionic. Partial purification of peroxidases using anion exchange chromatography demonstrated a single peak of peroxidase activity at 30% NaCl. Combined peak fractions were subjected to IEF separation and subsequent 10 % PAGE separation. It was found that each major peroxidase isoforms with p*I*s of 4.6, 4.8, 5.1 split into two isoforms with molecular masses similar to that of crude extract of ~ 197, 263 kDa, while the isoform with a p*I* 4.0 was represented by one isoform with a molecular mass of ~263 kDa. It is known that the diversity of peroxidase isoforms results from modifications at the post-transcriptional and post-translational levels.

To determine cellular location of peroxidases, cell wall fractionation of proteins from *D. scoparium* was performed. The proteins from intracellular soluble fraction (C) were distinguished from proteins bound to the cell wall with hydrogen bonds (B_1), van der Waals bonds and hydrophobic interactions (B_2), and ionic bonds (B_3). Highest peroxidase activity was

observed in fraction C that was eight fold-higher than other fractions. Among cell wall fractions, peroxidases weakly bound to the cell wall with hydrogen bonds showed the highest activity.

Interestingly, peroxidases from all fractions were capable of producing $O_2^{\bullet-}$. Production of $O_2^{\bullet-}$ in the intracellular fraction C was tested by 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT), which is reduced by $O_2^{\bullet-}$ to soluble formazan in the presence of NADH. Specificity of $O_2^{\bullet-}$ production was confirmed by the addition of superoxide dismutase (SOD), an enzyme that dismutates $O_2^{\bullet-}$. Almost half of XTT reduction was inhibited following addition of SOD. Production of $O_2^{\bullet-}$ by peroxidases from *D. scoparium* was further supported by NBT staining as all peroxidase bands stained with *o*-dianisidine coincided with bands stained with NBT in the presence of NADH as a reductant. Using 2D electrophoresis performed by IEF and subsequent 10% PAGE we found that anionic peroxidases from B_1 fraction are responsible for $O_2^{\bullet-}$ production.

In conclusion, we discovered that moss *D. scoparium* possesses diverse peroxidase isoforms, which display both in pro- and antioxidative activities. Our study suggests that dual roles of peroxidases in ROS metabolism can provide a range of protective mechanisms for moss plants and indicates an evolutionary conservatism of these peroxidase characteristics.

This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (grants 14-04-93962, 17-44-160142 p_a).

REGULATORY PROPERTIES OF BRASSINOSTEROIDS IN ARTIFICIALLY INDUCED OXIDATIVE STRESS IN *E. coli* AND *P. auraginosa*

S. Stanisheuski, M. Shapiro

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; e-mail: Stanislau.Stanisheuski@gmail.com

Brassinosteroids (BS) are known as versatile hormonal regulators in plants. In the last three decades they were also found to affect a lot of physiological processes in fungi, insects, fishes, and mammals [1]. It may be attributed to their structural resemblance to steroid hormones in other

kingdoms. Some natural BS at micromolar concentration harm cancer cells [2] and, in some cases, without affecting normal non-tumor cells [3]. Studies involving natural and synthetic BS tethered cytotoxic effects to elevated reactive oxygen species generation in lung adenocarcinoma cells [4].

In this paper we focused on the suggestion that BS change intracellular oxidative status in prokaryotes *E. coli* and *P. auraginosa*. To our knowledge BS were not shown previously to participate in main biochemical pathways in these prokaryotes. As the mechanism of the impact of BS on lipid peroxidation is still to be studied in details, the primary aim of our work was quantification of the amount of lipid peroxidation products formed in model oxidative stress conditions under H_2O_2 treatment in *P. auraginosa* and *E. coli* treated or untreated with BS.

The considered BS were combined in different molar ratios with various H_2O_2 concentrations. Quantification of the ability of BS to affect oxidative status in *E. coli* and *P. auraginosa* was investigated by thiobarbituric acid reactive species assay and by detection of intracellular peroxides using 2,7-dichlorofluorescein diacetate. Although it is yet to be clarified what the basis of such activity is, at this point there are evidences that brassinosteroids do not act like radical scavengers. Their effective concentration is no more than 0,1 mM which is not enough to intercept a significant part of free radicals formed in the cell. The nature and proposed mechanism for these changes is subjected to discussion.

1. Zhabinskii V.N., Khripach N.B., Khripach V.A. Steroid plant hormones: effects outside plant kingdom. // Steroids. 2015. V. 97. P. 87–97.

2. Kanwar M.K., Bhardwaj R., Chowdhary S.P, Arora P., Sharma P., Kumar S. Isolation and characterization of 24-Epibrassinolide from Brassica juncea L. and its effects on growth, Ni ion uptake, antioxidant defense of Brassica plants and in vitro cytotoxicity. // Acta Physiologiae Plantarum. 2013. V. 35(4). P. 1351–1362.

3. Steigerová J, Rárová L, Oklešťková J, Křížová K, Levková M, Sváchová M, Kolář Z, Strnad M. Mechanisms of natural brassinosteroid-induced apoptosis of prostate cancer cells. // Food and Chemical Toxicology. 2012. V. 50(11). P. 4068–4076.

4. Kisselev P.A., Panibrat O.V., Sysa A.R., Anisovich M.V., Zhabinskii V.N. Khripach V.A. Flow-cytometric analysis of reactive oxygen

species in cancer cells under treatment with brassinosteroids // Steroids. 2017. V. 117. P. 11–15.

MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF PLANT GLYCATION AND OXIDATION PRODUCTS

M.V. Vikhnina,[1,2] A.V. Soboleva,[1,2] T. Mehmood,[1]
E.V. Romanovskaya,[2] G.N. Smolikova,[3] S.S. Medvedev,[3] A.A. Frolov,[1,2]
[1]*Department of Bioorganic Chemistry, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle/Saale, Germany, e-mail: vikhnina@gmail.com*
[2]*Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*
[3]*Department of Plant Physiology and Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

Protein glycation is referred to as the reaction of lysyl and arginyl residues with reducing sugars and dicarbonyl products of their degradation. Resulting advanced glycation end products (AGEs) represent a heterogenic group of modified amino acid residues, accumulating during thermal processing and prolonged storage of foods. In human organism, dietary AGEs, as well as oxidation products, trigger development of subclinical inflammation and atherosclerosis. Hence, prolonged storage of protein-rich plant-derived foods might represent a health thread for consumers. Therefore, the contents of these compounds in plant materials need to be determined. However, the required methods are still not established. Here we propose the sample preparation strategy for exhaustive hydrolysis of total plant protein samples and apply it to characterization of protein glycation and oxidation profiles in ageing seeds of *Pisum sativum* by UHPLC-ESI-MS.

Yellow and green-colored pea seeds were subjected to accelerated aging by treatment at 45°C and 86% relative humidity during 3 days and 5 days [1]. The total protein fraction was isolated from the pea seeds, (n = 3) by phenol extraction [2]. The protein pellets were reconstituted in an aqueous detergent solution and subjected to exhaustive enzymatic hydrolysis [3]. The completeness of hydrolysis was verified by SDS-PAGE, before detergent was removed by RP-SPE, and derivatization with N^2-(5-

fluoro-2,4-dinitrophenyl)-*L*-valine amide (*L*-FDVA) was performed [4]. The analysis relied on RP-UHPLC-ESI-LIT-Orbitrap-MS. The data were processed by Xcalibur Software (Thermo Fisher Scientific), and differentially abundant amino acid adducts were identified by exact mass and ESI-MS^n analysis.

As glycation and oxidation products are relatively labile and readily degrade under high temperatures and acidic pH, only few AGEs can be reliably quantified under these conditions. Therefore, exhaustive enzymatic hydrolysis was performed. However, as the total protein preparation contained high amounts of highly-hydrophobic membrane proteins, it could not be quantitatively dissolved in aqueous phosphate buffer, required for the digestion. Therefore, the pellets were reconstituted in presence of aq. sodium dodecyl sulfate (SDS) and further diluted with phosphate-buffered saline (pH 7.5) to avoid disturbing enzymatic activity. The hydrolysis was performed as described by Glomb and co-workers, using successive treatment with pronase E, proteinase K, and carboxypeptidase Y for 24, 18 (both 37° C), and 24 h (25°C), respectively [3]. After enzymatic digestion, the detergent was successfully retained on SPE cartridges, as could be assessed by flow injection MS analysis. The eluates were lyophilized, reconstituted in 20% (*v/v*) aq. acetonitrile, derivatized with *L*-FDVA [4], and analyzed by RP-UHPLC-ESI-LIT-Orbitrap-MS. The profiles represented the majority of the previously characterized glycation and oxidation products. The pattern of AGEs dominated with *Nε*-(carboxymethyl)lysine (CML), *Nε*-(carboxyethyl)lysine (CEL), *Nδ*-(carboxymethyl)arginine (CMA), *Nδ*-(carboxyethyl)arginine (CEA), argpyrimidine, and methylglyoxal-derived hydroimidazolone (MG-H), which could be reliably characterized by their tandem mass spectrometric fragmentation patterns.

The research was supported by the Russian Science Foundation (project № 17-16-01042).

1. Hampton J. G., TeKrony D. M. (ed.). Handbook of vigour test methods. – Zurich : International Seed Testing Association, 1995.

2. Isaacson T. et al. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues //Nature Protocols. – 2006. – V. 1. – №. 2. – P. 769.

3. Glomb M. A., Pfahler C. Amides are novel protein modifications formed by physiological sugars //Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V. 276. – №. 45. – P. 41638-41647.

4. Langrock T., García-Villar N., Hoffmann R. Analysis of hydroxyproline isomers and hydroxylysine by reversed-phase HPLC and mass spectrometry //Journal of Chromatography B. – 2007. – V. 847. – №. 2. – P. 282-288.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PEROXIDASE SYSTEM IN CELL FRACTIONS AND NUCLEAR SUPRASTRUCTURES DURING GERMINATION OF ETIOLATED WHEAT GERMS

G.H. Vafina, R.S. Ivanov, E.A. Ivanova
Ufa Institute of Biology of RAS, Ufa, Russia; e-mail: ivanovirs@mail.ru

As is known, reactive oxygen species (ROS) are produced by living organisms, both as a result of normal cellular metabolism, and under the influence of environmental factors. ROS have a high reactivity and if at low and moderate concentrations they function in the physiological processes of cells, then at high concentrations, unfavorable modifications of cellular components such as lipids, proteins and DNA occur. The shift in the balance between the oxidant/antioxidant leading to the formation of a large number of oxidants is called "oxidative stress". Regulation of reducing and oxidizing states is crucial for the viability of cells. As a result, aerobic organisms have integrated antioxidant systems, including enzymatic and non-enzymatic antioxidants, which are effective in blocking the harmful effects of ROS. ROS are produced by the transfer of single electrons to oxygen, which leads to the formation of a relatively inert superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), more reactive hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (•OH), which has a high reactivity and destructive properties [1]. The most common oxidative protein modification is a carbonylation reaction, which is irreversible for protein. Oxidation is primarily affected by the amino acids: *Arg, His, Liz, Pro, Tre, Tri* [2]. Modification of proteins makes them more sensitive to proteolysis, probably due to changes in conformation which is recognized by proteases rapidly. Removal of modified proteins by proteases and proteasomes destroys proteins with broken folding.

The aim of this study was to determine the overall antioxidant activi-

ty of the peroxidase system in fractions from the homogenate of seedlings in comparison with the dynamics in the superstructure of the cell nuclei in the development of etiolated wheat seedlings. In addition, the production of $O_2^{\bullet-}$ were compared with *Arg*-X proteolytic activity in the suprastructures of the cell nuclei and mitotic activity during germination of etiolated wheat germs.

For the study, wheat seeds (*Triticum aestivum* L.) of Moskovskaya-35 were chosen. The embryos were detached from the endosperms during certain intervals of time: at 0 h (dry seeds) and after 24 and 48 h from the start of soaking. Seedlings (48 h) were divided into coleoptiles, mesocotyls and roots. Cell nuclei were isolated from germs, cleared, and then nucleoplasm, chromatin, nuclear matrix were extracted by increasing ionic strength of solution [3, 4]. Fractionation of the homogenate from germs was carried out by analogy with the previous method. Antioxidant activity of the peroxidase system in cellular and nuclear fractions was determined by using as a hydrogen donor – benzidine and its acceptor – hydrogen peroxide [5]. The *Arg*-X photolytic activity was assessed by cleavage of *Arg*-X bonds in the *Arg*-enriched protein protamine [4].

It was shown that the activity of the peroxidase system in homogenates of whole germs (0h, 24h) and their organs (48h) is mainly manifested in metabolically mobile fraction and fraction loosely bound to cytoskeletal remainder. It is known that the antioxidant system for organisms in a state of dormancy is of particular importance. During the dormancy in grains, the water content drops to 5-8%, the respiratory activity of the mitochondria decreases, but the activity of oxidoreductases, especially peroxidase, remains high [6]. In this period the peroxidase is able to participate in the generation of water, catalyzing the successive reduction of oxygen and hydrogen peroxide. Furthermore, the enzyme is part of the antioxidant system and, together with low-molecular antioxidants, provides a high resistance of cells to the action of ROS, regulating the level of lipid peroxidation in living organisms. Regarding the activity of the peroxidase system in the 24-hour germ in metabolically mobile fraction and fraction loosely bound to cytoskeletal remainder, is probably associated with the onset of mitotic activity in cells. It was shown that the accumulation of hydrogen peroxide and the creation of a certain redox potential are necessary to initiate proliferation and differentiation. In embryonic and stem cells, intensive proliferation occurs generally continuously. The key role in creating

conditions for such oxidative mitogenesis is played, most likely, the peculiarity of the mitochondrial base of these cells: a small number of mitochondria and a relatively low degree of their differentiation. Subsequently, as the development progresses, the content of mitochondria increases for each cell cycle. In two-day seedlings, the activity of the peroxidase system in homogenate fractions was detected in all organs of seedlings: coleoptile, mesocotyl and roots at the level of metabolically mobile fraction and in coleoptile and mesocotyl at the level of loosely bound to cytoskeletal remainder fraction. During this period of development processes such as division and cell elongation are carried out in a plant. The activity of the peroxidase system in coleoptile, apparently, can be explained by the need for the presence of a superoxide radical anion for the development of etiolated wheat germs, since it can control the growth of cells by stretching [7].

The dynamics of the activity of the peroxidase system in the cell nuclei is manifested only in the fractions of nucleoplasm and chromatin. It was shown that a low level of antioxidant activity in the cell nuclei is maintained at the level of air-dry embryos in nucleoplasm and chromatin, apparently, for regulating lipid peroxidation. Diurnal seedlings (24h) also retain a relatively low level of antioxidant activity of the peroxidase system in nucleoplasm and chromatin that may be due to the onset of proliferative activity and the initiation of cell growth by stretching. In two-day seedlings, a higher level of antioxidant activity of the peroxidase system is observed, mainly associated with the root system and mesocotyl, where, as is known in the areas of the shoot apical meristem and the root apical meristem there is the division of cells, and certain layers of cells grow stretching. As for the *Arg*-X proteolytic activity, it occurs in the nuclear matrix of 24 h seedlings, which, apparently, is associated with the processes of growth cell by stretching. During 48 hours of growth of individual organs of the embryo is marked weak initiating activity in the nucleoplasm of coleoptile, mesocotyl, and root. This activity is simultaneously increases in the suprastructures of chromatin. It was shown that a large number of mitoses occur in the root system and significantly less in the coleoptile and mesocotyl. It is obvious that the processes of assembling and disassembling chromatin with the participation of nuclear proteins are especially intense during this period of growth in the root system and much less in coleoptile and mesocotyl. As for *Arg*-X proteolysis, a high level of activity is also observed in the root system in chromatin fractions, and somewhat

lower in mesocotyl and coleoptile. It is known that nuclear proteins are actively modified by ROS, which affects their folding, and stability, as well as their ability to posttranslational modifications. Any changes at the histone level will have a major influence on chromatin structure, gene expression, genome stability and replication [8]. For example, histone carbonylation can mask a positive charge and affect chromatin relaxation and the accumulation of transcription factors. It was shown that a high level of histone carbonylation is detected during the active phase of DNA synthesis, in addition, when the nuclear proteasome is activated; the level of the modified proteins is significantly reduced [9]. It is possible that one of the functions of nuclear proteinases is the control of the quality of folding of nuclear proteins. Recently, a lot of research has been carried out to consider ROS from the position of signaling molecules.

ROS are instantly produced, have a high reactivity, can enter into reactions with membrane lipids, carbohydrates, proteins and DNA. ROS, such as for example hydrogen peroxide, can pass through biological membranes via aquaporines. In turn, cells have effective antioxidant systems to exercise strict control over the ROS. Together, all these factors make ROS ideal participants in cellular signaling [1].

1. Sewelam N., Kazan K., Schenk P.M. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road // Frontiers in Plant Science. 2016. V.7. p.187.

2. Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2007. V.58. pp.459–481.

3. Ivanova E.A., Vafina G.H. Method of isolating plant cell nuclei. Author's certificate № 1701747. 01.01.1991.

4. Ivanova E.A., Vafina G.H. A method for obtaining nuclear fractions having a proteinase and inhibitory activity. Author's certificate №. 1733471. 15.01.1992.

5. Ivanova E.A., Vafina G.H. A method for determining the oxidation-reduction activity of a peroxidase system in the cell nuclei of wheat seedlings. Patent № 2127761. 20.03.1999.

6. Andreeva V.A. Enzyme peroxidase. Participation in the protective mechanism of plants. - Moscow: Nauka, 1988. p.129. (in Russian)

7. Shorning B.Y., Smirnova E.G., Yaguzhinsky L.S., Vanyushin

B.F. Necessity of superoxide production for development of etiolated wheat seedlings // Biochemistry (Moscow). 2000. V.65. № 12. pp. 1357-1361.

8. Kreuz S., Fischle W. Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease // Epigenomics. 2016. V.8. № 6. pp. 843–862.

9. Wondrak G.T, Cervantes-Laurean D., Jacobson E.L., Jacobson M.K. Histone carbonylation in vivo and in vitro // Biochem. J. 2000. V.351. p.769–777.

SALT STRESS INDUCES GENERATION OF ROS AND SINGLE- AND DOUBLE-STRAND DNA BREAKS IN *Physcomitrella*

S. Zvanarou[1], V. Mackievic[1], K.J. Angelis[2], V. Demidchik[1,3]*

[1]*Department of Plant Cell Biology and Bioengineering, Biological Faculty, Belarusian State University, 220030, 4 Independence Ave., Minsk, Belarus*

[1]*Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of Czech Republic, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, Czech Republic*

[3]*Komarov Botanical Institute RAS, 2 Professora Popova Street, 197376, Saint-Petersburg, Russian Federation; e-mail: dzemidchyk@bsu.by*

Only few plant species can survive under severe salinity conditions [1]. One prominent example is a moss *Physcomitrella patens*, which is a great model organism for plant physiology and evolution studies. Green algae that are ancestors of mosses lived in saline water and had an efficient protection against NaCl. Higher plants have lost their protection against NaCl while some mosses still maintain them [1]. Mosses were first terrestrial plants and share many physiological features with salt-tolerant alga. In this respect, study of salt response in mosses can reveal some hidden fundamental mechanisms of plant salt tolerance.

Here, we have investigated in details a key primary reaction of *Physcomitrella patens* (*P. patens*) to NaCl - the generation of superoxide, a precursor of various toxic ROS detected in plants under high salinity. We have also addressed a very important question of the DNA damage under salt stress. Our recent tests based on the TUNEL assay showed that treat-

ment of *Arabidopsis thaliana* roots by high NaCl concentrations (100-300 mM) resulted in the dramatic endonuclease activation leading to onset of the programmed cell death (PCD) [3]. Interestingly, treatment of roots by NaCl also stimulated production of very aggressive ROS - hydroxyl radicals [3], which are known to cause direct damage to DNA [2]. Endonucleases usually generate double strand breaks of DNA while hydroxyl radical should mainly produce single strand breaks. Here, we have examined salt-stress-induced single and double strand DNA breaks in *P. patens* protonema using Comet assay.

Protonemal culture of *P. patens* was initiated and maintained as described by David J. Cove [4]. In work used 7-days old protonemal cells and 1-day liquid culture of protonemal cells (for Comet assay). The superoxide anion radical generation was tested using a fluorescent probe dihydroethidium (10^{-6} M; Sigma, USA) with UV excitation and standard Nikon FITC filter (B-2E) for recording fluorescence emission (to avoid chlorophyll autofluorescence). Inverted epi-fluorescent microscope Nikon Eclipse TS100F was used in DHE tests. Two different protocols of Comet assays were used: Comet assay under neutral conditions for detection of double-strand breaks and neutral Comet assay with alkali unwinding step of DNA double helix, which reveals single-strand DNA breaks [5]. DNA 'comets' were viewed in epi-fluorescence with a Nikon Eclipse 800 microscope after staining with SybrGold stain and evaluated by the Comet module of the LUCIA cytogenetics software suite (LIM, Praha, Czech Republic). The fraction of DNA in comet tails (% tail-DNA) was used as a measure of DNA damage.

Growth tests have demonstrated that *P. patens* can tolerate as much as 200-500 mM NaCl therefore these NaCl concentrations were used in assays with DHE and COMET. We have found that NaCl at concentrations above 200 mM caused significant increase in an intensity of DHE fluorescence (up to 150% as compared to background values). The effect of NaCl increased with NaCl concentration, reaching the maximal value at 300 mM.

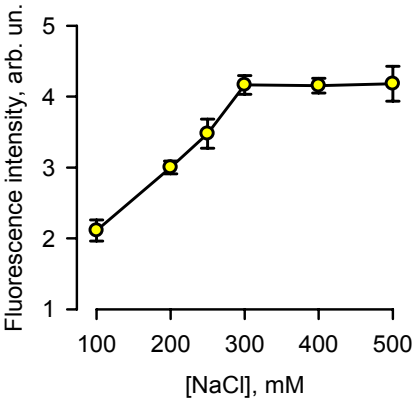


Figure. The effect of different NaCl concentrations on ROS production in chloronema cells of *Physcomitrella patens* as measured by dihydroethidium probe (n = 10; mean ± SE). 'Fluorescence intensity' indicates fluorescence of oxidised dihydroethidium products measured at FITC filter.

Accordingly to manufacturer's guidance DHE is selective to $O_2^{\bullet-}$, however out tests demonstrated that this probe is sensitive to many ROS. The superoxide dismutase decreased NaCl-induced DHE fluorescence by 40-45% and 60% at 200-300 mM NaCl and 400 mM NaCl, respectively. These data show that at least a half of DHE signal originated from superoxide, while another half is probably caused by other ROS. Thiourea, which is known as specific $^{\bullet}OH$-scavenging agent, reduced NaCl-induced DHE fluorescence by 20% at 200 mM NaCl and by 30% at 300 and 400 mM NaCl, respectively. This means that significant portion of DHE signal was from reaction with hydroxyl radicals too. Reduced glutathione, dimethyl sulfoxide and spermine also modified NaCl-induced DHE signal. These substances caused 40-50% reduction in DHE signal at 200-300 mM NaCl and 25-30% at 400 mM NaCl.

Tests with COMET assay have demonstrated that 100 mM NaCl induced significant increase in the quantity of double strand DNA breaks (100-120% increase compared to control). Treatment by 300 and 500 mM NaCl increased the number of double strand DNA break by 3-3.5 and 4-4.5 times, respectively. Hydroxyl radical scavengers, such as thiourea or DMSO partially inhibited formation of DNA breaks in response to NaCl.

Overall, our data demonstrated that NaCl induces production of ROS

in *Physcomitrella patens*, which can be measured by DHE probe. Superoxide and hydroxyl radicals dominate ROS generation under salt stress in *Physcomitrella patens*. High NaCl levels trigger double strand breaks of DNA in *Physcomitrella patens*, which are inhibited by hydroxyl scavengers.

This work was funded by European Union grant "Plant adaptation to heavy metal and radioactive pollution" (PIRSES-GA-2013-612587).

1. Munns, R. Mechanisms of salinity tolerance / R. Munns, M. Tester // Annual reviews of plant biology. – 2008. – Vol. 59. – P. 651–681.

2. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge – Oxford, UK: Oxford University Press, 1999. – 936 p.

3. *Arabidopsis* root K^+ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death / V. Demidchik, T.A. Cuin, D. Svistunenko, S.J. Smith, A.J. Miller, S. Shabala, A. Sokolik, V. Yurin // Journal of cell science. – 2010. – Vol. 123, № 13. – P. 1468–1479.

4. Culturing the Moss *Physcomitrella patens* / Cove D.J. [et al.] // Cold Spring Harb. Protoc. – 2009. – Vol. 4. – P. 1–6.

5. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity / K. J. Angelis, M. Dusinska, and A. R. Collins // Electrophoresis. – 1999. – Vol. 20, №10. – P. 2133–2138.

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *Pseudomonas* НА РЕДОКС-АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМАЛЕММЫ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТОК ПШЕНИЦЫ В МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ

М.В. Апёнышева[1], О.М. Минаева[1,2], Е.Е. Акимова[1,2], Т.И.Зюбанова[1,2]

[1]ФГАОУВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия;

e-mail: mari-08-90@mail.ru

[2]ФГБУСибНИИ сельского хозяйства и торфа – филиал СФНЦА РАН, г. Томск, Россия

В настоящее время в растениеводстве одним из эффективных технологических приемов повышения устойчивости сельскохозяйственных растений к неблагоприятным факторам среды, как биологическим, так и физическим, является применение микробных удобрений и биопрепаратов, оказывающих полифункциональное воздействие на растение, улучшая азотное и фосфорное питание растений, оказывая стимулирующее влияние и обеспечивая защиту от возбудителей болезней. Перечень полезных микроорганизмов пополняется с каждым годом. Среди наиболее перспективных традиционно используют бактерии родов *Pseudomonas*, *Azotobacter, Bacillus, Azospirillum, Actinomyces* и т.д., одновременно являющихся продуцентами стимуляторов роста растений и биофунгицидов широкого спектра [1–3]. Бактерии, обладающие совокупностью полезных для растений свойств, обозначают как PGPR (от Plant Growth-promoting Rhizobacteria). Ряд бактерий, взаимодействуя с растением, могут вызывать возникновение у растений резистентности по отношению к возбудителям заболеваний и изменение их физиологического состояния. Продемонстрировано, что бактеризация влияет на ферментную активность растений, влекущую за собой изменения в дыхательной и фотосинтетической активностях тканей [4]. Проведение анализов активностей ферментов в растениях трудоемко и требует значительного времени. Поэтому актуальность поиска альтернативных методов оценки физиологического состояния растительных организмов не вызывает сомнения.

Целью данной работы являлась оценка влияния бактерий рода *Pseudomonas* на редокс-активность плазмалеммы фотосинтезирующих клеток яровой пшеницы в модельных экспериментах в присутствии и отсутствии фитопатогенной нагрузки.

Эксперименты проводили с использованием метода малых наземных экосистем. Для бактеризации использовали штаммы *Pseudomonas fluorescens* АР-33, *Pseudomonas* sp. В-6798 и *P. aureofaciens* BS 1393. Субстратом являлся крупный речной песок. В качестве фитопатогенной нагрузки использованы агаровые пластины с мицелием гриба *Fusarium oxysporum,* которые помещали в виде лент в ряды с семенами яровой пшеницы (сорт Новосибирская-29). Контролем являлись варианты с выращиванием растений без бактериальной инокуляции. Бактерии интродуцировали из маточного раствора из расче-

та 1×10^6 клеток на одно семя пшеницы. Растения выращивали в климатической камере при температуре 23±0,1 ºС, освещением 16000 Лк, влажности 80±0,1 % и 16 часовом фотопериоде. Продолжительность эксперимента – 14 суток. На вариант приходилось не менее трех биологических повторностей с выборкой – 45–50 растений на вариант. Редокс-активность плазмалеммы определяли с использованием непроникающего в липидную фазу акцептора электронов феррицианида калия и позволяющего проводить работу на интактных клетках без нарушения их целостности и в условиях нормального метаболизма [5]. Навеску вегетативной части равновозрастных растений (1 г) оставляли максимально не поврежденной и помещали в пробирки срезами вверх. К фотосинтезирующей ткани добавляли раствор 0,5 мМ феррицианида калия (3 мл). Пробы инкубировали в течение часа при освещении 8000Лк. Окисление/восстановление феррицианида определяли по изменению оптической плотности омывающего раствора по сравнению с раствором, инкубированным в течение тогоже времени и при тех же условиях без растений. Концентрацию образовавшегося феррицианида определяли на спектрофотометре при 440 нм. Содержание в растворах после инкубации растительной ткани феррицианида калия определяли по калибровочному графику.

По окончании эксперимента проводили анализ зараженности растений корневыми гнилями, одним из возбудителей которых является использованный фитопатоген, который показал уменьшение развития корневых гнилей при бактеризации на 30–44% в отсутствии фитопатогена и на 36–71% в его присутствии.

На рисунке представлены данные о содержании феррицианида калия в контрольных и опытных вариантах эксперимента.

Полученные данные показывают, что у растений в контрольном варианте в отсутствии фитопатогена наблюдается меньшая редокс-активность мембран. Наибольшее увеличение концентрации феррицианида калия в растворе после инкубирования тканей пшеницы отмечено в присутствии *F. oxysporum*. Это свидетельствует об усилении активности дыхательных ферментов. Известно, что интенсивность дыхания обычно повышается в результате инфицирования растения патогенном, что сопровождается нарушением сопряжения окисления и фосфорилирования и увеличением доли анаэробного дыхания.

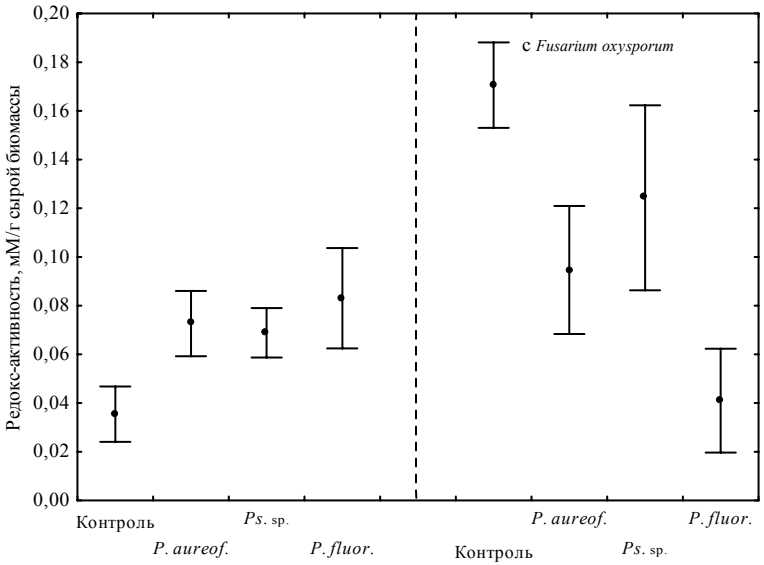


Рисунок. Содержания феррицианида калия в растительной ткани после инкубирования в его растворе максимально неповрежденных вегетативных тканей.

Увеличение интенсивности дыхания при инфицировании растений фитопатогенами широко известно из литературных источников и, как правило, является защитной реакцией организма [6]. У бактеризованных растений в отсутствии патогена также возрастает интенсивность дыхания. Известно, что при бактеризацииможе возрастать устойчивость растений к патогенам. Это увеличение резистентности связывают как с увеличение количества салициловой и янтарной кислот в вегетативных тканях, являющихся пусковым механизмом сигнальной системы растений, так и активацией ферментов окислительного взрыва [4]. В присутствии фитопатогена при бактеризации, концентрация феррицианида калия, в целом остается на уровне содержания данного элемента в растворе при инкубировании бактеризованных растений, выросших без фитопатогенной нагрузки. Это может свидетельствовать об отсутствии стрессовой реакции растений на наличие фитопатогена в экосистеме. Исключение составили лишь данные, отмеченные для варианта с бактеризацией *P. fluorescens* АР-33.

Таким образом, анализ редокс-активности фотосинтезирующей ткани может свидетельствовать как о наличии в растениях увеличения дыхательной активности, связанного с патогенезом, так и о возникновении системной резистентности при бактеризации.

1. Rekha P.D., Wai-An Lai, Arun A.B., Young Ch-Ch. Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions // Bioresource Technology. 2007. № 98. P. 447–451.

2. Минаева О.М., Апенышева А.В., Акимова Е.Е., Блинова П.А., Куровский А.В. Влияние бактеризации семян пшеницы на активность оксидаз в растениях при фитопатогенной нагрузке // Достижения науки и техники АПК. 2015. Т. 29. № 6. С. 53–56.

3. Bhattacharyya P.N., Jha D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture // World J Microbiol Biotechnol. 2012. № 28. P. 1327–1350.

4. Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria // Biocontrol and Biofertilization. 2005. P. 39–66.

5. Новак В.А., Иванкина Н.Г. Светоиндуцированное поглощение ионов клетками пресноводных растений // Физиология растений. 1978. Т. 25. № 2. С. 315.

6. Пильщикова Н.В. Физиология растений с основами микробиологии. –М.: Мир, 2004. 184 с.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС У РЯСКИ МАЛОЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

И.С. Боднарь, Е.В. Чебан, В.Г. Зайнуллин

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия; e-mail: bodnar@ib.komisc.ru

Различного рода стрессоры, в том числе и тяжелые металлы, приводят к образованию в клетках активных форм кислорода (АФК). АФК представляют серьезную угрозу, так так могут подавлять активность ферментов, вызывать повреждения нуклеиновых кислот,

плазмолеммы. При низких концентрациях АФК выполняют роль ключевых сигнальных молекул, участвуют в регуляции важнейших биологических процессов, экспрессии генов [4].

При распаде жирных кислот, сопровождающем перекисное окисление липидов (ПОЛ), первоначально образуются диеновые коньюгаты, а затем такие метаболиты, как малоновый диальдегид (МДА) [1]. МДА – продукт разложения полинасыщенных жирных кислот биомембран и его увеличение показывает, что растения находятся в стадии высокого уровня окислительного стресса.

Целью исследования стало определение уровня окислительного стресса у ряски малой после воздействия стронция, меди и цинка.

Растения культивировали в среде Штейнберга. Культивирование проводили в климатической камере при стандартных условиях: температура 24 ± 0.1°C, фотопериодичность 16 ч свет/8 ч темнота, 70 % влажность. Интенсивность света 8000 люкс, представлена холоднобелым светом люминесцентных ламп. При проведении эксперимента колонии, состоящие из 2-4 фрондов, отбирали из материнской культуры и переносили в стерилизованные стеклянные чашки. Каждая экспериментальная ёмкость содержала 9-12 пластинок. Воздействие проводили в течение 7 дней, в соответствии с рекомендациями OECD (2006) [3]. Определяли морфометрические показатели: удельная скорость роста, повреждения фрондов (хлорозы и некрозы), площадь фрондов. В работе в качестве источника ионов стронция использовали – $Sr(NO_3)_2$, ионов меди – $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, цинк-ионов – $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. В качестве контроля использовалась среда Штейнберга (концентрация цинка в среде равна 0.63 мкмоль/л).

Для определения уровня МДА ряску предварительно содержали в экспериментальном растворе в течение четырех дней [5]. МДА определяли следующим образом: 50 мг растительного материала гомогенизировали в 1,5 мл 20 % трихлоруксусной кислоте (ТХУ) с кварцевым песком, центрифугировали при 10 000 g в течение 15 минут. К отобранным 0,3 мл супернатанта добавили 1,2 мл 0,5 % тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в 20 % трихлоруксусной кислоте. Реакционную смесь инкубировали 30 минут при 95 °C, затем быстро охладили для того, чтобы остановить реакцию, центрифугировали 15 мин при 10 000 g. Оптическую плотность супернатанта определяли при 532 нм и 600 нм. В качестве контроля использовали раствор тиобарбитуровой

кислоты в трихлоуксусной кислоте. Содержание МДА определяли по формуле:

$C_x=(E_{532}-E_{600})\times Ve/k\times m_s\times V_a$,

где C_x – содержание МДА, нмоль/л сырой массы; Е – оптическая плотность раствора; V_e – объем экстракта, взятый для анализа, мл; k – коэффициент молярной экстинкции МДА: 156 $мМ^{-1}\times см^{-1}$; m_s – масса образца для экстракции [2].

Стронций приводит к угнетению скорости роста ряски малой начиная с 0,6 ммоль/л, медь и цинк – с концентрации 3,15 мкмоль/л. Высокая токсичность меди и цинка по сравнению со стронцием объясняется более высокой вовлеченностью цинка и меди во многие биохимические процессы, происходящие в организме. Цинк участвует в каталитической функции многих ферментов, структурной стабильности клеточных мембран и белков, а также защите биомембран от окислительного повреждения. Медь также участвует в широком диапазоне биохимических и физиологических процессов в клетках растений, действует как кофактор Cu-Zn СОД и других ферментов [6]. Для стронция и цинка при данных концентрациях наблюдается статитстически значимое повреждение фрондов в виде хлорозов. Повреждения фрондов при воздействии меди наблюдаются уже при концентрации 0,19 мкмоль/л. При воздействии стронция, меди и цинка происходит сокращение площади фрондов. Площадь уменьшается при концентрации стронция от 0,48 ммоль, цинка - от 3,15 мкмоль/л, медь приводит к сокращению площади начиная уже с 0,63 мкмоль/л.

Данные металлы являются редокс-активными и приводят к развитию окислительного стресса у растений. Однофакторный дисперсионный анализ показал, что при увеличении концентрации стронция, меди, цинка в растворе уровень МДА повышается ($p\leq 0.01$). Уровень МДА при воздействии стронция статистически значимо выше по сравнению с контролем начиная с 0,79 ммоль/л, меди – с 3,15 мкмоль/л, цинка – 12,6 мкмоль/л. Увеличение внутриклеточного уровня тяжелых металлов привело к нарушению окислительно-восстановительного баланса в растительной клетке и накоплению активных форм кислорода. Наиболее токсичным тяжелым металлом из рассматриваемых является медь, далее идет цинк и стронций. Высокий уровень окислительного стресса сопровождается значительным

увеличением доли растений с хлорозами и некрозами, сокращению площади фрондов, низкой удельной скоростью роста растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО (№115012860038) и проекта комплексной программы УрО РАН 15-2-4-26 (№115082510016).

1. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Активные формы кислорода и антиоксидантная система растений // Вестник МГПУ. Серия: естественные науки. 2016. №2. С. 9-23.

2. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. М.: БИНОМ, 2011. С. 348-349.

3. OECD Guidelines for the testing chemicals. Lemna sp. Growth Inhibition Test. Organisation for Economic Co-operation and Development. Paris, 2006.

4. Marschner H., Cakmak I. High light intensity enhances chlorosis and necrosis in leaves of Zn, K and Mg deficient plants // J. Plant. Physiol. 1989. V. 134. P. 308-315.

5. Uruç Parlac K., Demirezen Yilmaz D. Response of antioxidant defences to Zn stress in three duckweed species // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2012. № 85. P. 52-58.

6. Vidaković-Cifrek Ž., Tkalec M., Šikić S., Tolić S., Lepeduš H., Pevalek-Kozlina B. Growth and photosynthetic responses of *Lemna minor* L. exposed to cadmium in combination with zinc or copper // Arh Hig Rada Toksikol, 2015. Vol. 66. P. 141-152.

ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОГО ЗАКАЛИВАНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В МИТОХОНДРИЯХ ИЗ ЛИСТЬЕВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

О.А. Боровик[1], О.И. Грабельных[1,2], Т.П. Побежимова[1]

[1]*ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия; e-mail: ol.borovik@mail.ru*

[2]*ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия*

Пероксид водорода (H_2O_2) является одной из разновидностей активных форм кислорода и неотъемлемой частью регуляции метаболических путей в клетке через различные сигнальные пути. H_2O_2 выступает в качестве вторичного мессенджера в процессе роста и развития, а также в реакции восприятия растительным организмом того или иного стрессового воздействия. В нормальных условиях происходит постоянное образование пероксида водорода, содержание которого регулируется антиоксидантами и антиоксидантными ферментами. Однако в стрессовых условиях наблюдают картину чрезмерного неконтролируемого образования H_2O_2, что приводит к гибели. Одними из основных источников генерации пероксида водорода в растительной клетке являются хлоропласты и митохондрии, в которых локализованы электрон-транспортные цепи. Известно, что к увеличению H_2O_2 приводит обработка растений низкой температурой, развивающийся при этом окислительный стресс является причиной перекисного окисления липидов в клеточных мембранах. При высоком содержании пероксида водорода перекисному окислению липидов в первую очередь подвержены мембраны хлоропластов и митохондрий, что негативно будет сказываться на функционировании этих органелл. В то же время холодовое закаливание, эффективность которого зависит от соотношения дыхания и фотосинтеза, предотвращает развитие окислительного стресса. В связи с этим представляется важным изучить вклад митохондрий и хлоропластов в генерацию АФК при закаливании растений.

Целью работы явился сравнительный анализ влияния холодового закаливания на содержание пероксида водорода в листьях озимой пшеницы и определение вклада митохондрий в его образование. В работе использовали этиолированные и зеленые растения озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорт Иркутская) на стадии появления второго листа. Растения выращивали и закаливали в камерах тепла/холода «Binder» опытной станции Фитотрон СИФИБР СО РАН. Холодовое закаливание осуществляли в темноте при 2 °С в течение 7 дней. Содержание пероксида водорода в гомогенате листьев и в очищенных митохондриях оценивали спектрофлуорометрически с использованием Amplex Red. Очистку митохондрий из этиолированных и зеленых листьев озимой пшеницы осуществляли в градиенте перколла.

Как следует из полученных данных, холодовое закаливание приводило к некоторому увеличению содержания пероксида водорода в этиолированных и зеленых листьях. В митохондриях, очищенных из этиолированных листьев, обнаружено незначительное снижение содержания H_2O_2 после закаливания, а в митохондриях, очищенных из зеленых листьев, наоборот, его увеличение. Увеличение H_2O_2 в митохондриях из зеленых листьев может быть связано, с одной стороны, с вовлеченностью митохондриального H_2O_2 в регуляцию функционирования фотосинтетического аппарата растений или, с другой стороны, со стрессовым состоянием зеленых растений в условиях закаливания в темноте. Можно предположить, что в фотосинтезирующих тканях в условиях действия на растения низких температур митохондрии являются акцептором АФК от хлоропластов. В дальнейшем для установления точной картины причины генерации пероксида водорода в митохондриях зеленых листьев у растений, закаленных при низкой положительной температуре в темноте, планируется изучить влияние низкой температуры на образование H_2O_2 в изолированных из листьев хлоропластах. Это позволит установить взаимоотношения в регуляции генерации АФК между основными энергопреобразующими органеллами – митохондриями и хлоропластами при закаливании растений.

Таким образом, сравнительный анализ влияния холодового закаливания на содержание пероксида водорода в листьях озимой пшеницы не выявил значительных различий в генерации H_2O_2 под действием низкой температуры в этиолированных и зеленых листьях, однако установлено, что в этих условиях в митохондриях из зеленых листьев по сравнению с этиолированными значительно возрастает генерация пероксида водорода. Возможно, что образующийся в митохондриях H_2O_2 участвует в регуляции активности фотосинтетического аппарата растений. Другим возможным объяснением является то, что митохондрии способны акцептировать АФК от хлоропластов и таким образом защищать их фотосинтетический аппарат от повреждения, вызванного окислительным стрессом в условиях действия низкой температуры в темноте.

Работа выполнена при поддержки гранта РФФИ №16-34-00105 мол_а

ИЗМЕНЕНИЯ СТЕРИНОВОГО КОМПОНЕНТА И РЕДОКС-СТАТУСА КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ

Ю.Н. Валитова[1], А.Г. Сулкарнаева[1], А.В. Белкина[1,2], С.А.Дмитриева[1], Ф.К. Мухитова[1], Ф.В. Минибаева[1]

[1]ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, Россия;

[2]ФГБОУ ВО Казанский национальный исследовательский технологический университет, г. Казань, Россия; e-mail: yulavalitova@mail.ru

Пониженная температура является распространенным стрессовым фактором, действующим на растения. Известно, что холодовой стресс характеризуется активацией окислительных процессов в клетке [1]. Окислительный стресс возникает в результате действия практически всех неблагоприятных факторов внешней среды, включая засуху, почвенное засоление, загрязнение воздуха токсическими соединениями, такими как озон, оксиды серы, при действии тяжелых металлов, неблагоприятных температур и др. [1, 2]. В настоящее время известно, что важную роль в ответной реакции клеток на действие прооксидантов играют стерины. В работах многих исследователей было показано, что β-ситостерин обладает высокой антиоксидантной активностью [3, 4], в частности, он способен нейтрализовать свободные радикалы дифенилпикрилгидразила (донора супероксид аниона). Мутанты с повышенным содержанием β-ситостерина обладали большей устойчивостью к окислительному стрессу, по сравнению с диким типом [5]. Было показано, что при экзогенном добавлении АФК-генерирующих соединений индуцируется биосинтез стигмастерина в листьях арабидопсиса [6].

Негативным последствием повышения уровня АФК и ПОЛ является накопление в клетке окисленных макромолекул. Как уже отмечалось выше, важным механизмом, способствующим удалению окисленных макромолекул и поврежденных органелл, является процесс аутофагии. Известно, что окислительный стресс является индуктором аутофагии в клетках [7, 8]. Показано развитие аутофагии в растительных клетах при таких стрессовых воздействиях как поранение, патогены, засуха, засоление и др. [9].

Информация о роли стеринов в холодоустойчивости растений крайне ограничена и представлена, в основном, данными о количественных изменениях общего содержания стеринов. В результате наших экспериментов было показано, что в корнях при действии низких положительных температур происходит увеличение проницаемости мембран для электролитов и снижение индекса мембранной стабильности (ИМС), накопление АФК и индукция аутофагии (табл.).

Выявлена обратная взаимосвязь между изменениями в содержании двух рафтообразующих липидов, стеринов и гликоцерамидов (ГлЦер) (рис.).

Таблица

Изменения выхода электролитов (С), ИМС, уровня ПОЛ и содержания H_2O_2 в корнях в корнях проростков пшеницы при действии холода

Варианты	С, %	ИМС, %	ПОЛ, %	H_2O_2, мкМ/г сыр. в.
Контроль	6,4 ± 1,7	93,6	100 ± 1	6,3 ± 0,5
Холод (+4° С, 1 ч)	8,4 ± 3,8	91,6	157 ± 11	13,2 ± 2,4
Холод (+4° С, 12 ч)	14,4 ± 2,4	85,6	117,3 ± 7	5,4 ± 1,1

Эта взаимосвязь заметно проявляется в стрессовых условиях, в частности, при действии низкой положительной температуры и связывании стеринов специфическими агентами. Наличие таких согласованных изменений стеринов и ГлЦер может свидетельствовать об общей функциональной активности этих рафтообразующих липидов. Ключевым этапом многоступенчатого процесса биосинтеза стеринов в растениях является реакция С-метилирования 24-го атома углерода стеринов, катализируемая ферментом С24-стерин метилтрансферазой. Нами впервые выявлены и секвенированы нуклеотидные последовательности трех генов *TaSMT1* пшеницы. Биоинформатический анализ показал, что эти гены являются гомеологичными и расположены на хромосомах A, B, D гексаплоидного генома *T. aestivum*. Дифференциальная экспрессия гомеологичных генов *TaSMT1*-5A и *TaSMT1*-4D пшеницы при действии холода, а также наличие выявленных нами стресс-чувствительных *цис*-элементов в структуре промоторов свидетельствуют о сложности регуляции активности генов *TaSMT1* при стрессе.

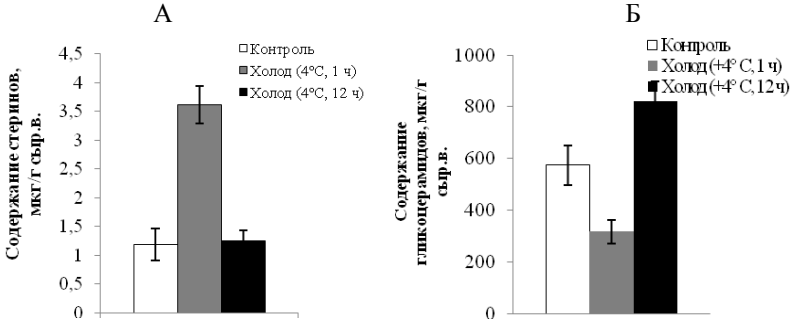


Рисунок. Изменение содержания стеринов (А) и гликоцерамидов (Б) в корнях пшеницы при кратковременном (1ч) и длительном (12ч) действии холода.

Результаты комплексного анализа состава стеринов и активности гена *TaSMT1*, ответственного за их биосинтез, свидетельствуют о вовлечении стеринов в стрессовый ответ растительных клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-00676.

1. Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.-K. Cold stress regulation of gene expression in plants // Trends in Plant Sciences. 2007. V. 12. P. 444–451.

2. Hung S.H., Yu C.W., Lin C.H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants // Botanical bulletin of Academia Sinica. 2005. V. 46. P. 1–10.

3. Vivancos M., Moreno J.J. Beta-sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages // Free Radical Biology and Medicine. 2005. V. 39. P. 91–97.

4. Pose D., Castanedo I., Borsani O., Nieto B., Rosado A., Taconnat L., Ferrer A., Dolan L., Valpuesta V., Botella M.A. Identification of the Arabidopsis dry2/sqe1-5 mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species // Plant Journal. 2009. V. 59. P. 63–76.

5. Wegener A., Gimbel W., Werner T., Hani J., Ernst D., Sandermann H.Jr. Molecular cloning of ozone-inducible protein from *Pinus sylvestris* L. with high sequence similarity to vertebrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthase // Biochimica and Biophysica Acta. 1997. V. 1350, P. 247–252.

6. Griebel T., Zeier J. A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions // Plant Journal. 2010. V. 63. P.

254–268.

7. Xiong Y., Contento A.L., Bassham D.C. Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in Arabidopsis // Autophagy. 2007. V. 3. P. 257–258.

8. Minibayeva F., Dmitrieva S., Ponomareva A., Ryabovol V. Oxidative stress-induced autophagy in plants: the role of mitochondria // Plant Physiology and Biochemistry. 2012. V. 59, P. 11–19.

9. Hayward A.P., Dinesh-Kumar S.P. What can plant autophagy do for an innate immune response? // Annual Review of Phytopathology. 2010. V. 49. P. 4.1–4.20.

ПРОДУКЦИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА И ФОРМИРОВАНИЕ ПЛАЗМОДЕСМ В ЛИСТЬЯХ И АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМАХ ПОБЕГА МУТАНТА ЯЧМЕНЯ *CHLORINA-f2*[3613]

В.А. Дмитриева[1], А.Н. Иванова[2], А.И. Евкайкина[1], Е.А. Климова[1], Е.В. Тютерева[1], О.В. Войцеховская[1]

[1]ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН), лаборатория экологической физиологии, г. Санкт-Петербург, Россия; e-mail: valeriya.dm1@gmail.com

[2]ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН), лаборатория анатомии и морфологии растений, г. Санкт-Петербург, Россия

Хлорофиллид-*a*-оксигеназа – фермент, синтезирующий хлорофилл *b* [1; 2]. У мутантов ячменя *chlorina-f2*[3613] с инактивацией данного фермента хлорофилл *b* не образуется. Известно, что такие мутанты медленнее растут, у них задержан переход к генеративному развитию, снижен уровень фотосинтеза, и, кроме того, на свету они оказываются сильно подверженными окислительному стрессу. Наиболее вероятной причиной развития окислительного стресса у мутантов *chlorina-f2*[3613] является нарушение стабильности пигмент-белковых комплексов фотосинтетического аппарата вследствие отсутствия хлорофилла *b*, так как данный пигмент необходим для формирования нормальной антенны, а антенна, в свою очередь, выполня-

ет функцию защиты от избытка света и препятствует образованию активных форм кислорода (АФК).

В данной работе мы показали, что в условиях интенсивного освещения в листьях мутантов ячменя с заблокированным синтезом хлорофилла *b* образуется значительно больше АФК, в первую очередь, синглетного кислорода, по сравнению с растениями дикого типа. Стабильность пигмент-белковых комплексов у растений ячменя дикого типа и мутантов *chlorina-f2*^{3613} оценивали по общему содержанию хлорофилла и белков антенны ФС II в листьях растений, помещенных в темноту, т.е. при индукции темнового старения. Сравнение уровней продукции различных АФК у растений дикого типа и мутантов *chlorina-f2*^{3613} проводили с использованием флуоресцентных красителей (SOSG и CM-H2DCFDA). Для оценки окислительно-восстановительного статуса также измерялось содержание аскорбата в листьях.

Недавние исследования показали, что редокс-сигналы могут регулировать образование и пропускную способность плазмодесм [3; 4]. Плазмодесмы играют важнейшую роль во многих ключевых процессах у растений, обеспечивая обмен веществами и информацией между соседними клетками [5; 6]. Кроме ионов и низкомолекулярных веществ, по симпласту перемещаются и регуляторные макромолекулы [7]. В частности, между клетками меристемы осуществляется симпластный перенос некоторых транскрипционных факторов, участвующих в регуляции цветения, в том числе LEAFY, AGAMOUS, WUSHEL и SHOOT MERISTEMLESS. Перемещение транскрипционных факторов зависит от количества симпластных контактов и их функциональной способности [8]. Кроме того, по флоэме и плазмодесмам транспортируется триггер цветения - белок FLOWERING LOCUS T, который синтезируется в клетках-спутниках флоэмы листьев, откуда должен переместиться к апикальной меристеме побега [9; 10]. Таким образом, изменение количества и размера плазмодесм может приводить к изменению программ развития растения.

В данной работе мы впервые исследовали симпластный транспорт у мутантов ячменя *chlorina-f2*^{3613} , в листьях которых мы обнаружили повышенное образование синглетного кислорода. В целях изучения влияния редокс-сигналов на формирование плазмодесм была проведена оценка плотности симпластных контактов в листьях и

апикальных меристемах растений с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и иммунофлуоресценции с применением двух различных антител к компонентам плазмодесм. Результаты продемонстрировали значительные различия в количестве плазмодесм между клетками лишённых хлорофилла *b* мутантов ячменя по сравнению с растениями дикого типа.

Полученные данные позволяют выявить взаимосвязь между нарушениями биосинтеза хлорофилла *b*, образованием АФК и регуляцией цветения, и предложить механизм такой взаимосвязи.

Исследование поддержано РНФ (грант №14-16-00120-П). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург) и Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

1. Tomitani A., Okada K., Miyashita H., Matthijs H.C.P., Ohno T. and Tanaka A. Chlorophyll b and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts // Nature. 1999. Vol. 400. P. 159–162.

2. Sakuraba Y., Makio Y., Akimoto S., Tanaka R. and Tanaka A. Deregulated chlorophyll b synthesis reduces the energy transfer rate between photosynthetic pigments and induces photodamage in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Physiol. 2010. Vol. 51 (6). P. 1055–1065.

3. Stonebloom S., Brunkard J.O., Cheung A.C., Jiang K., Feldman L. and Zambryski P.C. Redox states of plastids and mitochondria differentially regulate intercellular transport via plasmodesmata // Plant Physiol. 2012. Vol. 158. P. 190–199.

4. Burch-Smith T.M. and Zambryski P.C. Plasmodesmata paradigm shift: regulation from without versus within // Annual Review of Plant Biology. 2012. Vol. 63. P. 239–260.

5. Benitez-Alfonsoa Y., Cilia M., Roman A.S., Thomas C., Maule A., Hearn S. and Jackson D. Control of Arabidopsis meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport // PNAS. 2009. Vol. 106 (9) P. 3615–3620.

6. Burch-Smith T.M., Brunkard J.O., Choi Y.G. and Zambryski P.C. Organelle-nucleus cross-talk regulates plant intercellular communication via plasmodesmata // Proc Natl Acad Sci USA. 2011. Vol. 108 (51). P. 1451–1460.

7. Urbanus S.L, Folter S., Shchennikova A.V., Kaufmann K., Immink R.G.H. and Angenent G.C. Localization patterns of MADS domain proteins during floral development in Arabidopsis thaliana // BMC Plant Biology. 2009. Vol. 9 (5).

8. Becker A. and Ehlers K. Arabidopsis flower development—of protein complexes, targets, and transport // Protoplasma. 2015. DOI 10.1007/s00709-015-0812-7.

9. Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searle I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C. and Coupland G. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis // Science. 2007. Vol. 316. P. 1030–1033.

10. Jaeger K.E. and Wigge P.A. FT Protein Acts as a Long-Range Signal in Arabidopsis // Current Biology. 2007. Vol. 17. P. 1050–1054.

ЗНАЧЕНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ДЛЯ ПРОРАСТАНИЯ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЁРЕН *Picea pungens* ENGELM

А.А. Евменьева, М.А. Брейгина

Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия; e-mail: evmenievaanastasia@gmail.com; pollen-ions@yandex.ru

Пыльцевое зерно является мужским гаметофитом семенных растений, его прорастание и последующий рост пыльцевой трубки критически необходимы для успешного полового размножения семенных растений. Процессы прорастания и роста у мужского гаметофита хвойных имеют как несомненные сходства, так и ряд значительных отличий от цветковых растений, включая воздушные мешки, низкую скорость роста, наличие множественных пластид, иное направление движения органелл и иную форму кальциевого градиента, возможность появления нескольких трубок и их ветвления [1]. Эти отличия принято рассматривать в эволюционном аспекте как особенности более раннего этапа становления процесса полярного роста у растений. Недостаточная изученность физиологической регуляции прорастания у Голосеменных в сравнении с Покрытосеменными и эволюционное значение проблемы делают ее актуальной. Следует отметить, что недостаточная изученность пыльцы Хвойных не связана с трудностями

культивирования: объект доступен в большом количестве, выдерживает хранение в течение нескольких лет, пыльца хорошо растет в культуре [2], хотя её прорастание занимает значительное время.

Наше исследование было посвящено актуальному физиологическому аспекту регуляции прорастания пыльцы и полярного роста – роли активных форм кислорода в этих процессах. Известно, что в растительных клетках активные формы кислорода могут, с одной стороны, вызывать окислительный стресс; с другой стороны, они представляют собой один из ключевых регуляторных модулей. В качестве сигнальных компонентов они синтезируются как в ответ на стрессы различной природы, так и без стрессового фактора при регуляции роста, полярности, программируемой клеточной гибели, при рецепции сигналов гормонов и других регуляторных агентов [3]. На цветковых растениях было показано, что активные формы кислорода вовлечены во все этапы прорастания мужского гаметофита: активацию [4], полярный рост пыльцевой трубки [5] и разрыв трубки в овулярной фазе [6]. Целью нашей работы было расширить и углубить эти представления, применив новый модельный объект – пыльцу голосеменных.

Первая часть работы заключалась в количественной оценке выхода АФК из пыльцевых зерен в среду. Она была проведена спектрофлуориметрическим методом с использованием красителя OxyBURST Green H_2HFF BSA, не проникающего в клетку и потому специфичного для внеклеточных АФК. Для оценки вклада НАДФН-оксидазы плазмалеммы в суммарный выход АФК в часть проб добавляли ингибитор этого фермента дифениленiодониум (DPI).

Во второй части работы отвечали на вопрос, являются ли эндогенные АФК необходимыми для прорастания пыльцы голосеменных, с применением ингибиторного анализа и различных антиоксидантов.

Третий блок опытов был направлен на изучение распределения АФК в пыльцевой трубке. Для этого мы окрашивали трубки стандартным методом с использованием реактива NBT. Для проверки локализации обнаруженных АФК проводили отмывку препаратов после окрашивания. Изображения были получены на исследовательском микроскопе Axioplan 2 (Carl Zeiss).

В результате реализации первого этапа работы было показано, что АФК выделяются пыльцевыми зернами в среду уже в первые ми-

нуты инкубации. Через 1 минуту после помещения увлажненной пыльцы в среду было зафиксировано определенное значение интенсивности флуоресценции, и оно достоверно увеличилось после 10 минут прорастания. Эксперимент с ингибитором НАДФН-оксидазы DPI показал, что в присутствии ингибитора первичный подъем содержания АФК в среде присутствовал, однако дальнейшего увеличения не происходило. Тем самым был выявлен вклад НАДФН-оксидазы в образование внеклеточных АФК на раннем этапе активации.

Вторая часть работы, посвященная значению эндогенных АФК для прорастания, выявила существенные отличия голосеменных от покрытосеменных [4]. DPI в концентрации 0,1 мМ в 4 раза снижает процент прорастания. Добавление 0,2 мМ DPI полностью блокирует прорастание пыльцевых зёрен. Это означает, что образование $O_2^{\cdot -}$ и его производных необходимо для прорастания пыльцевого зерна *Picea pungens*. Последнее предположение подтвердилось и при использовании антиоксиданта Mn-TMPP, ликвидирующего $O_2^{\cdot -}$ и пероксид водорода. При воздействии 0,05 мМ Mn-TMPP прорастание снижается почти в 2 раза по сравнению с контролем, а 1 мМ Mn-TMPP полностью блокирует прорастание пыльцы *Picea pungens* аналогично 0,2 мМ DPI. POBN, тушитель гидроксил-радикала, не оказывал влияния на прорастание. Это указывает на относительно небольшую важность OH• для прорастания пыльцы ели.

Окрашивание NBT пыльцевых трубок *Picea pungens* показало, что содержание АФК максимально в кончике трубки, в области «чистой зоны», что соответствует данным литературы по покрытосеменным растениям и одному виду хвойных [7], [8]. Вопрос о внеклеточной или внутриклеточной локализации апикальных АФК, помимо визуального анализа, был решён с помощью отмывки. Трубки, окрашенные NBT, были отмыты от красителя и продолжали инкубироваться в стандартной среде. Интенсивность окрашивания не снижалась, апикальная локализация сохранялась, что свидетельствует о внутриклеточном градиенте АФК, что подтверждается данными конфокальной микроскопии, параллельно полученными в нашей лаборатории. Синтез АФК в апексе, по-видимому, важен для нормального роста пыльцевой трубки ели.

В связи с тем, что мы обнаружили значительные отличия в дей-

ствии ингибиторов и антиоксидантов на эффективность прорастания пыльцы ели в сравнении с табаком, был поставлен дополнительный опыт по окрашиванию трубок ели и табака DCFH-DA для качественной оценки уровня АФК в них. Оказалось, что в пыльцевой трубке ели продуцируется значительно меньше АФК, чем в трубке табака.

Таким образом, из полученных результатов следует, что поддержание баланса между процессами синтеза и деградации АФК является необходимым условием для нормального прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки ели голубой.

1. D. D. Fernando, C. R. Quinn, E. D. Brenner, and J. N. Owens, “Male gametophyte development and evolution in extant gymnosperms,” *Int. J. Plant Dev. Biol.*, vol. 4, pp. 47–63, 2010.

2. D. D. Fernando, Æ. M. D. Lazzaro, and J. N. Owens, “Growth and development of conifer pollen tubes,” pp. 149–162, 2005.

3. V. Demidchik, “Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology,” *Environ. Exp. Bot.*, vol. 109, pp. 212–228, 2015.

4. A. Smirnova, N. Matveyeva, and I. Yermakov, “Reactive oxygen species are involved in regulation of pollen wall cytomechanics.,” *Plant Biol. (Stuttg).*, vol. 16, pp. 252–257, Apr. 2013.

5. M. M. Wudick and J. A. Feijo, “At the Intersection: Merging Ca2+ and ROS Signaling Pathways in Pollen,” *Mol. Plant*, vol. 7, no. November, pp. 1595–1597, 2014.

6. Q. Duan, D. Kita, E. A. Johnson, M. Aggarwal, L. Gates, H.-M. Wu, and A. Y. Cheung, “Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in Arabidopsis,” *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 3129, Jan. 2014.

7. M. Potocký, M. A. Jones, R. Bezvoda, N. Smirnoff, and V. Zárský, “Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth.,” *New Phytol.*, vol. 174, no. 4, pp. 742–51, Jan. 2007.

8. P. Liu, R. L. Li, L. Zhang, Q. L. Wang, K. Niehaus, F. Baluška, J. Šamaj, and J. X. Lin, “Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in Picea meyeri pollen tube tip growth,” *Plant J.*, vol. 60, no. 2, pp. 303–313, 2009.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАКАЛИВАНИЯ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

А.А. Игнатенко[1], В.В. Таланова[1], А.Ф. Титов[1], Н.С. Репкина[1], Ю.В. Венжик[1], К.М. Панфилова[2]

[1]ФГБУН Институт биологии КарНЦ РАН, г. Петрозаводск, Россия; e-mail: angelina911@ya.ru

[2]ФГБОУ ВО Петрозаводский государственный университет, г. Петрозаводск, Россия

Одним из последствий воздействия на растения различных неблагоприятных факторов внешней среды является повышение в их клетках содержания активных форм кислорода (АФК), усиленное накопление которых ведет к развитию окислительного стресса, нарушению структуры мембран, деградации белков и других макромолекул и последующей гибели клеток [1]. Устранение избыточных количеств АФК осуществляется антиоксидантной системой (АОС), включающей комплекс ферментов и низкомолекулярных протекторных соединений [2], от эффективной работы которых во многом зависит выживание растений, испытывающих действие тех или иных стресс-факторов, включая гипотермию. Исходя из этого, цель данного исследования заключалась в изучении влияния низкой закаливающей температуры на активность АОС в листьях пшеницы.

Исследования проводили с недельными проростками озимой пшеницы сорта Московская 39, которые выращивали на питательном растворе в камере искусственного климата и затем в течение 7 сут подвергали действию температуры 4ºС. О холодоустойчивости проростков судили по температуре, вызывающей гибель 50% палисадных клеток ($ЛТ_{50}$) первого листа после тестирующего промораживания [3]. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по содержанию малонового диальдегида (МДА) [4], активность антиоксидантных ферментов – спектрофотометрически [5–7], накопление транскриптов генов – методом ПЦР в режиме реального времени, содержание пролина – методом Бейтса с соавторами [8].

В результате исследований установлено, что устойчивость проростков пшеницы к промораживанию начинает повышаться уже через 1 ч от начала действия температуры 4°С, затем она продолжает

монотонно возрастать, достигая максимума через 7 сут (рис.).

Анализ динамики накопления МДА в листьях пшеницы при действии температуры 4ºС показал повышение его уровня в клетках в течение первых 2 сут, в дальнейшем (3–7 сут) содержание МДА уменьшалось, что свидетельствует о снижении процессов ПОЛ в ходе адаптации растений к холоду.

Параллельно с этим нами было исследовано влияние температуры 4°С на активность ключевых антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), гваяколзависимой пероксидазы (ПО). Повышение общей активности СОД в листьях проростков отмечено в первый и последующие (24–168) часы низкотемпературного воздействия (табл.). Наряду с этим выявлено накопление транскриптов генов *FeSOD* и *MnSOD*, кодирующих разные изоформы СОД. Увеличение активности КАТ наблюдалось в течение первых 48 ч, а затем отмечено ее снижение до исходных значений (табл.). Выявлено также накопление транскриптов гена *TaCAT*, кодирующего КАТ, в течение 72 ч действия температуры 4°С, но затем их содержание снижалось. Активность гваяколзависимой ПО повышалась на протяжении всего процесса закаливания (табл.).

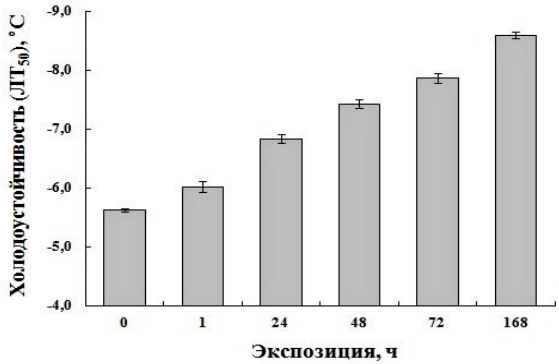


Рисунок. Влияние температуры 4°С на устойчивость проростков озимой пшеницы сорта Московская 39

Наряду с этим нами было изучено влияние низкотемпературного закаливания на аккумуляцию свободного пролина, который является низкомолекулярным протектором. Показано, что в течение всего опыта происходит его накопление.

Таблица

Влияние температуры 4°С на активность антиоксидантных ферментов в листьях проростков озимой пшеницы сорта Московская 39

Показатель	Экспозиция, ч					
	0	1	24	48	72	168
Активность СОД, усл. ед./мг белка	1.76±0.06	2.06±0.1	2.28±0.1	2.67±0.1	2.93±0.2	3.02±0.1
Активность КАТ, мкМ H_2O_2 /(мг белка мин)	83.5±3.0	91.4±2.9	98.3±1.9	101.0±4.1	88.4±3.0	81.9±2.3
Активность ПО, мкМ тетрагваякола /(мг белка мин)	0.51±0.03	0.64±0.03	0.72±0.04	0.82±0.03	0.94±0.04	1.00±0.03

Таким образом, из полученных данных следует, что ключевую роль в защите клеток растений пшеницы от избыточного накопления АФК, вызванного действием низкой положительной температуры, играет АОС, активизация которой приводит к снижению уровня окислительных процессов, сохранению целостности мембран и других клеточных структур и макромолекул, что в конечном итоге обеспечивает благоприятные условия для формирования повышенной устойчивости растений к действию холода. Важно, что низкотемпературное закаливание вызывает активизацию всех ключевых антиоксидантных ферментов: повышается активность СОД, выполняющей роль первичного «рубежа», катализируя дисмутацию супероксидного радикала, а также активизируются ферменты, участвующие в утилизации пероксида водорода – КАТ и гваяколзависимая ПО. Одновременно с этим в листьях пшеницы под действием холода происходит накопление свободного пролина, выполняющего функции осмопротектора, стабилизатора клеточных мембран и участвующего вместе с антиоксидантными ферментами в утилизации АФК.

1. 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. С. 163–178.

2. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxida-

tive damage and oxygen deprivation stress: a review // Ann. Bot. 2003. Vol. 91. P. 179–194.

3. Балагурова Н.И., Дроздов С.Н., Хилков Н.И. Метод определения устойчивости растительных тканей к промораживанию. - Петрозаводск: Кар. ф-л АН СССР, 1982. 6 с.

4. Stewart R.R.C., Bewley J.D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes // Plant Physiol. 1980. Vol. 65. P. 245–248.

5. Beauchamp Ch., Fridovich I. Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. Vol. 44. P. 276–287.

6. Aebi H. Catalase *in vitro* // Methods in Enzymology. 1984. Vol. 105. P. 121–126.

7. Maehly A.C., Chance B. The assay of catalase and peroxidase // Meth. Biochem. Anal. 1954. Vol. 1. P. 357–424.

8. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant and Soil. 1973. Vol. 39. P. 205–207.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ТИЛАКОИДАХ ГОРОХА СОРТОВ АЛЬБУМЕН И ШУСТРИК

Е.А. Кальясова, Ю.В. Синицына, А.П. Веселов

Институт биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, Россия; e-mail: katelyn@bk.ru

Несмотря на богатую историю магнитобиологических исследований, насчитывающую более 100 лет, до сих пор существуют трудности с выявлением мишеней и механизмов восприятия магнитных полей живыми объектами. В частности, предполагается действие переменных и постоянных магнитных полей на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1] и изменение вязкости мембран [2].

Нами было предпринято исследование эффектов импульсных магнитных полей (ИМП) в системе перекисного окисления липидов тилакоидных мембран с целью выявления зависимости наблюдаемых

изменений от времени воздействия и характеристик поля, а также специфичности восприятия таких полей физиологически отличающимися объектами.

В качестве объекта использовали 14-дневные растения гороха (*Pisum sativum* L.) сортов Альбумен или Шустрик, выращенные на фильтровальной бумаге, смачиваемой водопроводной водой, в условиях климатической камеры при 22-23ºС. Растения сорта Альбумен имеют лист с 2-3 парами листочков среднего размера, растения сорта Шустрик относятся к безлисточковым.

Целые растения обрабатывали ИМП - пачки из 20 импульсов длительностью 227 мкс с амплитудой 1,5 мТл, следующих с частотой 15 Гц, для создания поля использовали генератор фирмы Electro-Biology Inc. (EBI). Сразу после окончания экспозиции (15, 30, 60 и 120 минут) из растений получали суспензию тилакоидов. Контролем служила суспензия тилакоидов из растений, не подвергнутых воздействию ИМП.

Развитие ПОЛ оценивали спектрофотометрически по уровню первичных (диеновые конъюгаты - ДК) и вторичных (основания Шиффа - ОШ) продуктов [3]. Общее количество липидов определяли спектрофотометрически [4].

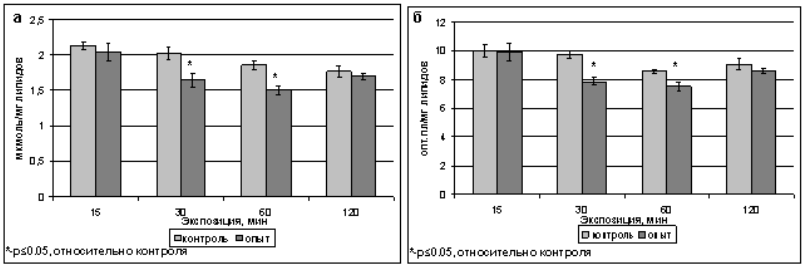


Рисунок 1. Содержание продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (а) и оснований Шиффа (б) в тилакоидах гороха сорта Альбумен после обработки ИМП-2.

Было показано, что 15-минутная обработка ИМП растений сорта Альбумен не вызывала изменения содержания продуктов липопероксидации – ДК и оснований Шиффа (ОШ), тогда как 30- и 60-минутные воздействия приводили к ингибированию процессов ПОЛ (рис.1). Более длительная 120-минутная обработка не вызывала значимого изменения уровня продуктов ПОЛ.

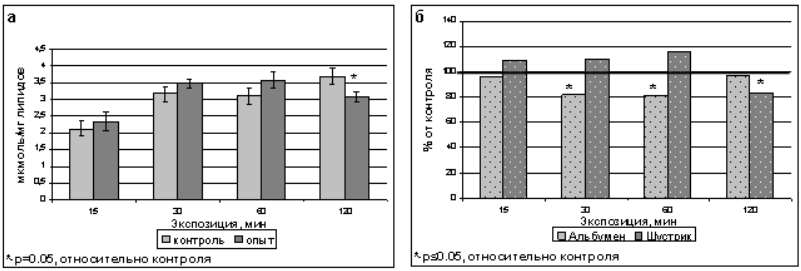


Рисунок 2. Содержание диеновых конъюгатов в тилакоидах гороха сорта Шустрик после обработки ИМП (а) и сравнение содержания ДК в тилакоидах гороха сортов Альбумен и Шустрик после обработки магнитным полем (б).

Содержание ОШ, также как и ДК в растениях гороха сорта Шустрик не изменялось после 15-60 минутных обработок полем, снижалось после 120-минутной экспозиции на 17% относительно контроля (рис.3а). После 30- и 60-минутных обработок магнитным полем гороха сорта Альбумен наблюдалось более раннее снижение содержания ОШ, а 120-минутное воздействие не влияло на данный параметр (рис.3б).

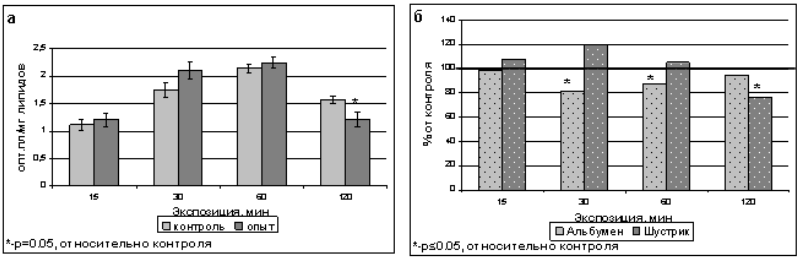


Рисунок 3. Содержание оснований Шиффа в тилакоидах гороха сорта Шустрик после обработки (а) и сравнение содержания ОШ в тилакоидах гороха сортов Альбумен и Шустрик после обработки магнитным полем (б).

Снижение уровня продуктов ПОЛ, которое наблюдалось в наших экспериментах, могло происходить в результате непосредственного воздействия МП на процесс липопероксидации. Однонаправленное изменение содержания продуктов перекисного окисления липидов в результате воздействия ИМП на растения гороха обоих сортов может говорить о схожем исходном физико-химическом состоянии фосфолипидов мембран тилакоидов, так как именно от их исход-

ного состояния зависит направление изменений (ускорение или торможение) процессов ПОЛ, вызванных магнитным полем [5]. Более позднее снижение содержания продуктов ПОЛ в тилакоидах безлисточкового гороха свидетельствует о большей устойчивости растений сорта Шустрик к воздействию слабого импульсного магнитного поля и может быть связано с особенностями липидного состава фотосинтетических мембран и функционированием антиоксидантной системы.

1. Sahebjamei H., Abdolmaleki P., Ghanati F. Effects of Magnetic Field on the Antioxidant Enzyme Activities of Suspension-Cultured Tobacco Cells // Bioelectromagnetics. 2007. № 28. P. 42-47.

2. Калипин Л.Г., Бошкова И.Л., Панченко Г.И., Коломийчук С.Г. Влияние низкочастотного и высокочастотного электромагнитного поля на семена // Биофизика. 2005. Т. 50. Вып. 2. С. 361-366.

3. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан_изопропанольных экстрактах крови // Вопросы медицинской химии. 1989. Вып. 1. С. 127–131.

4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической диагностике. Минск, 2000. - 896 с.

5. Пирузян Л.А., Аристархов В.М. Спиновые и магнитные эффекты в биосистемах - привилегия мембранных фосфолипидов // Доклады академии наук. 2005. Т. 401. № 4. С. 560-562.

РОСТ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА С КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ *Arabidopsis thaliana* ПРИ НОРМЕ И ДЕЙСТВИИ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ

Б.Р. Кулуев, З.А. Бережнева, Б.Н. Постригань,
Э.А. Баймухаметова

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа, Россия; e-mail: kuluev@bk.ru

Растения в ходе роста и развития постоянно подвергаются воздействию многочисленных стрессовых факторов, наиболее распространенными из которых являются засуха, холод и засоление. В результате воздействия этих неблагоприятных факторов среды в клетках растений увеличивается продукция активных форм кислорода (АФК), которые при больших концентрациях оказывают негативное воздействие на все жизненно важные процессы в клетке. В ответ на выработку АФК в растениях активируется система антиоксидантной защиты, важнейшим компонентом которой является глутатион и связанные с ним многочисленные ферменты, из которых наиболее известны глутатион-S-трансферазы (GST). На сегодняшний день большинство опубликованных работ по исследованию GST связаны с изучением устойчивости растений к тяжелым металлам и ксенобиотикам. Однако глутатион и GST принимают участие в ответе растительного организма на многие стрессовые факторы, включая засуху, холод и засоление [1, 2]. Особенности проявления GST в трансгенных растениях зависят от выбранного для переноса гена, от промотора, особенностей векторной конструкции, а также от вида и сорта хозяйского растения [3, 4]. Целью нашей работы было создание трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L. с конститутивной экспрессией гена *AtGST* (U70672.1), кодирующего глутатион-S-трансферазу *Arabidopsis thaliana* L. Также была поставлена задача провести морфологический анализ полученных растений при нормальных условиях и при действии таких стрессовых факторов, как засуха, засоление и гипотермия.

При помощи генно-инженерной конструкции *35S::AtGST* было создано 22 линии трансгенных растений. Исходя из результатов количественного ОТ-ПЦР в реальном времени, были отобраны 9 линий трансгенных растений характеризующихся высоким уровнем экспрессии гена *AtGST*. При нормальных условиях произрастания трансгенные растения характеризовались увеличением сырого и сухого веса побегов по сравнению с диким типом. На вертикально-ориентированных чашках Петри с агаризованной средой МС было показано улучшение параметров роста корней у трансгенных растений при действии NaCl (50 и 100 мМ) и низких положительных температур (+12 и +15ºС). При выращивании на почве в условиях засухи (полив – один раз в неделю), засоления (100 мМ NaCl) и действия

низких положительных температур (+12 и +15ºС) трансгенные растения отличались от растений дикого типа увеличением сухого и сырого веса побега.

Полученные в ходе работы результаты исследования позволяют делать выводы о положительном влиянии глутатион-S-трансфераз на рост растений не только в условиях загрязнения среды тяжелыми металлами и ксенобиотиками, что хорошо известно из литературных данных, но и при действии таких абиотических стрессовых факторов, как засуха, засоление и гипотермия. Апробированную на табаке генно-инженерную конструкцию *35S::AtGST* планируется использовать для трансформации хозяйственно-ценных растений.

1. Roxas V.P., Smith R.K., Allen E.R., Allen R.D. Overexpression of glutathione S-transferase/ glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress // Nat. Biotechnol. 1997. V. 15. P. 988–991.

2. Чжао Ф.Ю., Лю Т., Сюй Ч.Ц. Совместное действие солевого и теплового стрессов на рост корней и системы нейтрализации активных форм кислорода трансгенного риса // Физиология растений. 2010. Т. 57. №4. С. 556–563.

3. Liu L., Liu Y., Rao J., Wang G., Li H., Ge F., Chen C. Сверхэкспрессия гена глутатион-S-трансферазы из плодов *Pyrus pyrifolia* повышает устойчивость трансгенных растений табака к абиотическому стрессу // Молекулярная биология. 2013. Т. 47. С. 591–601.

4. Sharma R., Sahoo A., Devendran R., Jain M. Over-expression of a rice tau class glutathione S-transferases gene improves tolerance to salinity and oxidative stresses in *Arabidopsis* // Public Library of Science. 2014. V. 3. P. 43–47.

ИНДУКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ *TRITICUM AESTIVUM* L. БАКТЕРИЯМИ *Bacillus subtilis* 10-4 В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ВЛАГИ

О.В. Ласточкина[1], Р.А. Юлдашев[2], Л.И. Пусенкова[1]

[1]*ФГБНУ Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, г. Уфа, Россия; e-mail: oksanaibg@gmail.com*

[2]*ФГБУН Институт биохимии и генетики РАН, г. Уфа, Россия*

Bacillus subtilis (*B. subtilis*) - типичные представители микробиоты растительного организма, относящиеся к числу бактерий стимулирующих рост растений (PGPB - Plant Growth Promoting Bacteria). Ранее нами был проведен скрининг свободноживущих почвенных бактерий из разных климатических зон Республики Башкортостан, и, по признаку наличия высокой фунгицидной активности в отношении фитопатогенных тест-грибов *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Helmintohosporium sativum* был отобран штамм *B. subtilis* 10-4 [1]. Было показано положительное влияние отобранного штамма 10-4 на рост растений пшеницы в норме и в условиях засоления [1, 2], который, как известно, оказывает сильный повреждающий эффект на растения вследствие развития окислительного стресса и нарушения водного режима [3].

Цель данной работы заключалась в оценке влияния предпосевной обработки семян *B. subtilis* 10-4 на состояние про-/антиоксидантной системы в растениях яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в норме и в условиях дефицита влаги, моделированного засолением (2% NaCl).

Обнаружено, что воздействие засоления на растения пшеницы приводило к существенному увеличению в них уровня продукции O^{2-} и H_2O_2, что указывает на сильный повреждающий эффект. В то же время растения инокулированные *B. subtilis* 10-4 характеризовались значительно меньшим уровнем стресс-индуцированной активации O^{2-} и H_2O_2 на протяжении всего эксперимента, что, по-видимому, связано с реализаций предадаптирующего эффекта *B. subtilis* 10-4 на растения пшеницы и снижением уровня повреждающего действия засоления. Выявлено, что в ответ на индуцированный засолением окислительный стресс в растениях наблюдалась более чем двухкратная активация супероксиддисмутазы (СОД), участвующей в дисмутации O^{2-} и H_2O_2, что является характерной ответной реакцией растений на стрессовые воздействия, вызывающие усиление продукции активных форм кислорода (АФК) [4,5]. Воздействие 2% NaCl также приводило и к постепенной активации пероксидазы (ПА) в проростках, что, по-видимому, является результатом накопления H_2O_2 в ходе функционирования СОД. Вместе с тем, инокуляция семян *B. subtilis* 10-4 способствовала снижению уровня стресс-индуцированной активации СОД и ПА, что указывает на явный протекторный эффект *B. subtilis*

10-4 на растения пшеницы к воздействию стрессовых факторов, приводящих к их обезвоживанию. Важно отметить, что инокуляция семян *B. subtilis* 10-4 (до стресса) также вызывала незначительную активацию СОД и ПА, что может способствовать укреплению клеточных стенок и обеспечивать впоследствии эффективную нейтрализацию стресс-индуцированной продукции АФК, предотвращение нарушения целостности мембранных структур клеток и их проницаемости при дефиците влаги. В пользу этого предположения свидетельствуют и данные о сниженном уровне у инокулированных *B. subtilis* 10-4 проростков накопления малонового диальдегида (МДА) - конечного продукта перекисного окисления липидов, в сравнении с необработанными растениями. При этом следует отметить, что сама обработка *B. subtilis* 10-4 вызывала лишь незначительные изменения в уровне накопления МДА, что свидетельствует о вполне благоприятном влиянии исследуемого штамма на растения.

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует в пользу того, что реализация протекторного действия *B. subtilis* 10-4 на рост растений пшеницы в условиях дефицита влаги может быть связана с их способностью повышать активность антиоксидантных ферментов, снижать уровень развития окислительного стресса и укреплять клеточные стенки растений, повышая их барьерные свойства.

1. Lastochkina O., Il'yasova E., Shirokov A., Pusenkova L. Antifungal and growth stimulating activities of new Bacillus subtilis strains // Scientific enquiry in the contemporary world: theoretical basics and innovative approach. 2012. V.1. P.96-98.

2. Pusenkova L.I., Lastochkina O.V., Shirokov A.V., Ilyasova E.Y. Growth-stimulating and antistress effects of new Bacillus subtilis strains on wheat plants under salinity // European Applied Sciences. 2013. V.1(10). P.9-12.

3. Puniran-Hartley N., Hartley J., Shabala L., Shabala S. Salinity-induced accumulation of organic osmolytes in barley and wheat leaves correlates with increased oxidative stress tolerance: In planta evidence for cross-tolerance // Plant Physiology and Biochemistry. 2014. V.83. P.32-39.

4. Tanou G., Molassiotis A., Diamantidis G. Induction of reactive

oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity // Environ. Exp. Bot. 2009. P. 270-281.

5. Jaspers P1, Kangasjdrvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling // Physiol Plant. 2010. V.138(4). P. 405-413.

ДОНОРЫ ОКСИДА АЗОТА КАК ИНДУКТОРЫ АУТОФАГИИ В КЛЕТКАХ ПШЕНИЦЫ

А.Б. Мазина[1,2], С.А. Дмитриева[1], Ф.В. Минибаева[1,2]

[1]*ФБГУН Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН, г. Казань,*

[2]*ФГАОУ ВПО Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия; e-mail: abmazina@gmail.com*

Аутофагию в настоящее время все чаще рассматривают как неспецифическую стрессовую реакцию клеток, которая способствует выживанию отдельных клеток и всего организма в целом [1]. Известно, что активные формы кислорода (АФК) являются ключевыми игроками в процессе формирования аутофагосом [2]. Вклад активных форм азота (АФА) в индукцию или подавление аутофагии в клетках млекопитающих является дискуссионным вопросом. Считается, что роль NO при индукции аутофагии в клетках млекопитающих во многом обусловлена синергичным действием АФА и АФК. Подобные данные по активации аутофагии при действии NO в клетках растений отсутствуют в литературе. В связи с этим, наша работа направлена на изучение регуляции аутофагии в клетках корней проростков пшеницы и оценка редокс-статуса клеток при воздействии NO-доноров (10 мМ KNO_2, 10 мМ KNO_3).

Нами показано, что обработка интактных проростков KNO_2 и KNO_3 приводит к увеличению в клетках корней содержания оксида азота и H_2O_2. Интересно, что воздействие KNO_2 на растения в течение 3 ч оказало большее влияние по сравнению с KNO_3. Увеличение H_2O_2 при действии KNO_3 наблюдалось через 16 ч воздействия. Таким образом, нитрит и нитрат калия индуцируют в растениях нитрозильный стресс, последствия которого могут быть чрезвычайно токсичными. Одним из эффективных механизмов изолирования и последующей деградации продуктов нитрозильного стресса является обра-

зование аутофагосом. Нами обнаружено, что обработка растений донорами NO индуцировала образование аутофагосом, визуализацию которых осуществляли с использованием флуоресцентного маркера LysoTracker Red (λ_{ab} 577 нм / λ_{em} 590 нм). Нитрит калия (KNO_2) индуцировал образование аутофагосом уже при кратковременном (3 ч) воздействии (рис. 1в), в то время как нитрат калия (KNO_3) индуцировал образование аутофагосом при длительном (16 ч) воздействии (рис. 1д). Применение KNO_2 в течение 16 ч приводило к появлению в клетках LysoTracker-положительных крупных конгломератов (рис. 1е), формирование которых не предотвращалось применением ингибитора аутофагии 3-метиладенина. Мы полагаем, что образование подобных конгломератов связано с усилением редокс-процессов и накоплением в клетках окисленных высокомолекулярных структур.

С одной стороны, аутофагия является одним из видов программируемой клеточной смерти, а, с другой стороны, адаптивной стрессовой реакцией.

В наших экспериментах активация аутофагии при кратковременном действии донорами NO не сопровождалась снижением жизнеспособности клеток.

Снижение жизнеспособности клеток происходило только при длительном воздействии KNO_2. Исходя из этого, мы полагаем, что в условиях кратковременного нитрозильного стресса аутофагия является защитной реакцией, направленной на выживание клеток. Гибель клеток при действии KNO_2 может быть обусловлена развитием в клетках жесткого нитрозильного и окислительного стресса и неэффективностью антиоксидантных систем и систем деградации окисленных структур.

Известно, что аутофагия является энергозависимым процессом, АТФ необходим как для формирования аутофагосом, так и для поддержания градиента pH этих кислых компартментов [3]. Анализ энергетического состояния клеток при обработке растений донорами NO проводили путем оценки дыхательной активности клеток и уровня митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$). Известно, что падение $\Delta\Psi_m$ является триггерным сигналом для запуска аутофагии в клетках дрожжей и млекопитающих. Аутофагия при действии доноров NO сопровождалась незначительным изменением дыхания. Снижение $\Delta\Psi_m$ наблюдалось при действии нитрита калия после 3 ч воз-

действия. Снижения митохондриального мембранного потенциала после 3 ч действия нитрата калия не происходило. Кроме того, при действии доноров образование NO может происходить и в самих митохондриях за счет восстановления нитрита цитохромоксидазой и альтернативной оксидазой без участия кислорода [4]. Мы полагаем, что KNO_2–индуцированное снижение $\Delta\Psi_m$ обусловлено образующимся NO и его ингибированием активности ЭТЦ митохондрий.

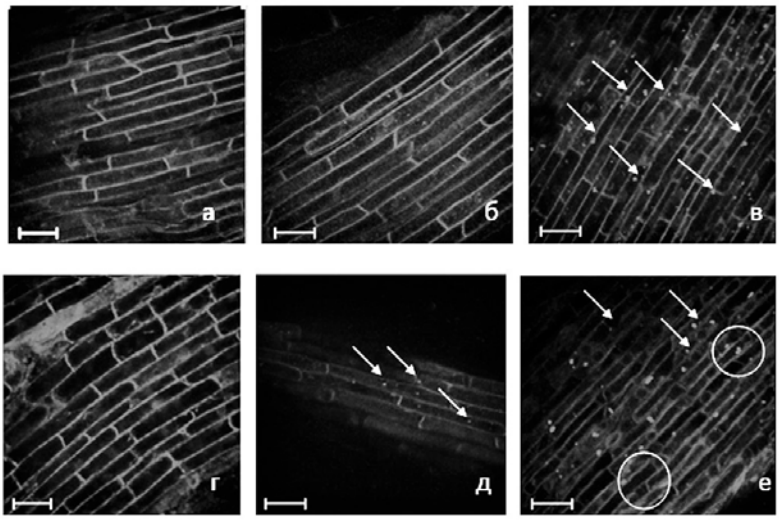


Рисунок. Визуализация аутофагосом с помощью LysoTracker (λab 577 нм / λem 590 нм) в клетках пшеницы при действии: а – контроль (3 ч), б – KNO_3 (3 ч), в – KNO_2 (3 ч), г – контроль (16 ч), д – KNO_3 (16 ч), е – KNO_2 (16 ч). Масштабный отрезок – 50 мкм

Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что доноры NO способствуют развитию в растениях нитрозильного и окислительного стресса, вызывают энергетический дефицит и могут индуцировать аутофагию. При кратковременном нитрозильном стрессе аутофагия является защитной реакцией, направленной на выживание клеток. При длительном и жестком нитрозильном стрессе жесткого нитрозильного и окислительного стресса неэффективность антиоксидантных систем приводит к гибели клеток.

1. Пупышев, А. Б. Репаративная аутофагия и аутофаговая гибель клетки, функциональные и регуляторные аспекты / А. Б. Пупышев // Цитология. – 2014. – Т. 56. – С.179-196.

2. Azad, M. B. Regulation of Autophagy by Reactive Oxygen Species (ROS): Implications for Cancer Progression and Treatment / M. B. Azad, Y. Chen, S. B. Gibson // Antioxidants & Redox Signaling. – 2009. – V.11. – P. 637-651.

3. Leitner, M. NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence / Vandelle E., Gaupels F. Bellin D., Delledonne M. // Curr Opin Plant Biol. 2009. V.12. p.451-458.

3. Xie, Z. Autophagosome formation: core machinery and adaptations / Z. Xie, D. J. Klionsky // Nature Cell Biology. – 2007. – V.9. – P. 1102–1109.

РОЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НИКЕЛЯ С ГИСТИДИНОМ В ПЕРВИЧНОМ ОТВЕТЕ КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ НА «НИКЕЛЕВЫЙ СТРЕСС»

В.С. Мацкевич[1], Д.А. Свистуненко[2], А.А. Чичко[1], Ю.В. Кирисюк[3], О.В. Войцеховская[4], Е.В. Тютерева[4], А.И. Соколик[1], В.В. Демидчик[1,4*]

[1]Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Белорусский государственный университет, пр. Независимости 4, 220030, Минск, Беларусь

[2]Школа биологических наук, Университет Эссекса, CO4 3SQ, Колчестер, Великобритания

[3]Брестский государственный университет имени А.С. Пушкина, бульвар Космонавтов 21, 224016, Брест, Беларусь

[4]Ботанический Институт им. В.Л. Комарова РАН, ул. Профессора Попова, 197376, Санкт-Петербург, Россия

**e-mail:dzemidchyk@bsu.by*

Тяжелые металлы являются одной из основных причин снижения качества и количества урожая, а также повреждения дикой флоры на техногенно-загрязненных территориях. Среди опасных металлов-загрязнителей принципиальное значение имеет никель (Ni^{2+}), так

как он исключительно широко используется в промышленности, в частности, при производстве нержавеющих сталей, других сплавов, конструктивных элементов электроники и аккумуляторных батарей [1, 2]. Выбросы никеля постоянно увеличиваются, и согласно официальным данным Европейского Союза этот металл входит в перечень наиболее опасных поллютантов в Европе [2].

Никель в небольших количествах необходим для жизнедеятельности растительного организма, являясь структурным элементом уреазы и участвуя в разложении мочевины [3]. Тем не менее, его роль в метаболизме существенно уступает значимости цинка, меди или марганца [4]. Восполнение потребностей в никеле происходит за счет его следовых количеств в почве и макроудобрениях [4]. Высокие уровни никеля крайне токсичны для всех живых систем, включая высшие растения [3, 4]. Токсичность никеля, как и других переходных металлов, связана с высокоаффинным связыванием с важнейшими органическими лигандами биополимеров клетки и с генерацией активных форм кислорода (АФК), таких как гидроксильные радикалы и др., в ходе реакции Габер-Вейса (Металл восстановленный + H_2O_2 → Металл окисленный + $^{\bullet}OH + OH^{-}$) [5].

Свободный ион Ni^{2+} в стандартных биологических условиях не демонстрирует высокой способности к реакции Габер-Вейса и восстановлению H_2O_2 [6]. Соответственно, он не может выступать мощным генератором гидроксильных радикалов наподобие ионов меди или железа. Однако, парадоксально, избыток никеля оказывает свое пагубное воздействие на растительные клетки через окислительные повреждения, схожие по характеру с теми, которые индуцируются гидроксильными радикалами [7]. Механизм данных повреждений до конца не понятен, но, предполагается, что он связан с возрастанием редокс-активности никеля в форме органических комплексов, в особенности, с гистидиновыми группами белков, к которым никель проявляет крайне высокое сродство [7, 8]. В таких комплексах никель становится эффективным и опасным генератором гидроксильных и других кислород-содержащих радикалов в клетке. Как механизм борьбы с избытком никеля растения используют синтез свободного гистидина, который предположительно связывает никель, препятствуя его взаимодействию с белками [7, 8]. Однако комплекс никель-гистидин имеет выраженную редокс-активность и потенциально,

кроме прямой защиты от Ni^{2+}, может выполнять функции переносчика электронов и генераторов АФК [6]. Физиологическая значимость редокс-активности комплексов никель-гистидин для растений не изучена. В настоящей работе была развита гипотеза, согласно которой данные комплексы могут влиять на сигнальные процессы клетки, изменяя характер экспрессии генов, участвующих в метаболизме АФК. В представленном исследовании адресованы следующие вопросы: 1) Предотвращает ли экзогенно-введенный гистидин ингибирующее влияние никеля на рост растений? 2) Способны ли комплексы никель-гистидин к индукции Ca^{2+}-сигналов в цитоплазме клеток корня? 3) Катализируют ли данные комплексы генерацию гидроксильных радикалов? 4) Каким образом введение гистидина в среду изменяет вызываемую никелем запрограммированную гибель клеток корня? 5) Как гистидин влияет на вызываемые никелем модификации в экспрессию ключевых генов редокс-метаболизма? Также в работе тестировались новые модели токсического влияния никеля на растения, в частности, была проанализирована роль K^{+}-каналов в данном явлении.

Опыты проводились на 5-10-дневных проростках *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. экотипа WS-0 (Wassilewskija) и Col-0. Также использовались нокаутные мутанты *gork1-1*, лишенные функционального K^{+}-канала GORK; *gork1-1* с возмещенным нативным GORK; *gork1-1*, экспрессирующий GORK с модификацией АФК-чувствительного центра (аминокислоты цистеин по положению 151 на серин). Данные линии GORK были предоставлены группой профессора Инго Дреера (Университет Тальки, Чили). В работе также были использованы растения Col-0, экспрессирующие экворин [9]. Наличие модифицированных транскриптов, а также уровень экспрессии GORK, были верифицированы с помощью оригинальных праймеров и количественной ПЦР. Культура целых растений выращивалась вертикально из семян на чашках Петри (100% среды Мурашиге и Скуга, 0,25% фитагеля, 1% сахарозы, pH 6) с использованием оптимизированных протоколов [9]. В работе были использованы следующие методики: ростовые тесты в стерильной культуре, стандартная экворинорвая люминометрия и подходы количественного определения цитоплазматической активности Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{цит.}$), спектроскопия электронного парамагнитного резонанса

(ЭПР), эпифлуоресцентная микроскопия, анализ морфологических и биохимических симптомов запрограммированной клеточной гибели (ЗКГ) и методика количественного ПЦР-анализа [10, 11].

Анализ ингибирующего воздействия различных уровней Ni^{2+} на рост основного корня показал классическую S-образную зависимость, согласно которой полумаксимальный эффект достигался при введении 0,2-0,3 мМ Ni^{2+}, а полное ингибирование развивалось при добавлении 3 мМ Ni^{2+}. Гистидин (Гис), в соотношении 2 Гис / 1 Ni^{2+} снижал токсическое действие Ni^{2+} на рост корня, смещая кривую ингибирования приблизительно на половину порядка в сторону более высоких уровней Ni^{2+}. Гистидин также модифицировал вызываемую никелем запрограммированную гибель клеток корня, препятствуя ее развитию при высоких уровнях данного металла в среде.

Интересно, что рост основного корня нокаутных мутантов *gork1-1*, лишенных функционального K^+-канала GORK, а также растений с модифицированным АФК-чувствительным центром в канале GORK демонстрировал пониженную чувствительность к никелю, по сравнению с растениями дикого типа и *gork1-1* с возмещенным нативным GORK. Это свидетельствует о том, что АФК-активируемый K^+-канал GORK может выступать в роли одной из первичных мишеней токсического действия Ni^{2+}. Схожим образом, в корнях растений, лишенных полноценного GORK или его АФК-сенсора, обнаруживалась значительно меньшая доля клеток с морфологическими и биохимическими симптомами запрограммированной клеточной гибели при 15-часовой обработке их никелем (по сравнению с диким типом и возмещенным GORK).

Добавление никеля (0,01-3 мМ Ni^{2+}) к корням растений, экспрессирующих экворин, не вызывало изменений $[Ca^{2+}]_{цит.}$, однако добавление его на фоне гистидина (2 Гис / 1 Ni^{2+}) индуцировало значительное временное увеличение $[Ca^{2+}]_{цит.}$, т.е. стимулировало Ca^{2+}-сигнал. По форме и фармакологическому профилю данный сигнал был схож с сигналами, индуцируемыми гидроксильными радикалами [11]. Таким образом, комплексы никель-гистидин были способны к индукции Ca^{2+}-сигналов в цитоплазме клеток корня.

Опыты с ЭПР-спектроскопией и спиновой ловушкой 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксидом (ДМПО) показали, что никель (0,01-3 мМ Ni^{2+}) не вызывает формирования гидроксильных радикалов в

стандартных биологических условиях в присутствие 1 мМ L-аскорбата и 1 мМ H_2O_2. В то же время, введение никеля на фоне гистидина (2 Гис / 1 Ni^{2+}) вызывало мощный синтез гидроксильных радикалов.

В работе была протестирована экспрессия группы генов (16 генов), ассоциированных с абиотическими стрессовыми воздействиями, включая никелевый стресс. Значительное увеличение относительной концентрации транскрипта под действием никеля было отмечено для НАДФН-оксидазы RBOHC, глутатион-редуктазы GR1, Ca^{2+}-зависимой протеинкиназы CPK6, супероксиддисмутазы CSD2, каталазы CAT2, K^+-канала GORK, а также некоторых других генов. Гистидин снижал никель-зависимую стимуляцию экспрессии данных генов. Соответственно, гистидин частично блокировал никель-индуцируемое изменение экспрессии ключевых генов редокс-метаболизма. Примечательно, что только в присутствии гистидина и никеля индуцировалась экспрессия гена, кодирующего циклин B CycB2.

Разделы данного исследования, связанные с тестированием K^+-каналов GORK и трансгенных линий на их основе, а также разделы по ЭПР-анализу, финансировались Российским Научным Фондом (грант № 15-14-30008; руководитель: В.В. Демидчик). Разделы по выявлению изменений в экспрессии генов под действием никеля и никель-гистидиновых комплексов финансировались грантов European Union grant “Plant adaptation to heavy metal and radioactive pollution” PIRSES-GA-2013-612587.

1. Salt D.E., Kato N., Kramer U., Smith R.D., Raskin I. The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of *Thlasp* // Phytoremediation of contaminated soil and water. 2000. P. 189–200.

2. European Union risk assesment - nickel (CAS No: 7440-02-0). Danish evironmental protection agency. København K, Denmark, 2008.1715 p.

3. Серегин И. В., Кожевникова А. Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения // Физиология растений. 2006. Т 53. С. 285–308.

4. Bergmann W. Nutritional disorders of plants - development, vis-

ual and analytical diagnosis. – Heidelberg: G. Fisher, 1992. 368 p.

5. Koppenol W.H. The Haber-Weiss cycle – 70 years later // Redox reports. 2001. Vol. 6. P. 229–234.

6. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford, UK: OUP, 1999. 936 p.

7. Ingle R.A., Mugford S.T., Rees J.D., Campbell M.M. and Smith J.A.C. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants // The Plant Cell. 2005. Vol. 17. P. 2089–2106.

8. Krämer U., Cotter-Howells J.D., Charnock J.M., Baker A.J.M., Smith J.A.C. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel // Nature. 1996. Vol. 379. P. 635–638.

9. Sosan A., Svistunenko D., Straltsova D., Tsiurkina K., Smolich I., Lawson T., Subramaniam S., Golovko V., Anderson D., Sokolik A., Colbeck I., Demidchik V. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify physiology of Arabidopsis thaliana plants // Plant journal. 2016. Vol. 85. P. 245–257.

10. Demidchik V., Shang Z., Shin R., Thompson E., Rubio L., Chivasa S., Slabas A.R., Glover B.J., Schachtman D.P., Shabala S.N., Davies J.M. Plant extracellular ATP signaling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca^{2+} channels // Plant journal. 2009. Vol. 58. P. 903–913.

11. Demidchik V., Cuin T.A., Svistunenko D., Smith S.J., Miller A.J., Shabala S., Sokolik A., Yurin V. *Arabidopsis* root K^+ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death // Journal of cell science. 2010. Vol. 123. P. 1468-1479.

РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНОВ СТРЕССОВЫХ ОТВЕТОВ У ЦИАНОБАКТЕРИЙ

К.С. Миронов[1*], П.В. Федураев[1,2], А.А. Зорина[1], Д.А. Лось[1]

[1] Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

[*] e-mail: ksmironov@gmail.com

[2] Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград

У зеленых водорослей и высших растений, транскрипция, стабильность мРНК, сплайсинг, трансляция и фосфорилирование белков могут регулироваться редокс-состоянием фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). У цианобактерий некоторые гены (тиоредоксина, десатураз жирных кислот, белков теплового шока) находятся под контролем процессов, сопряженных с транспортом электронов в ЭТЦ.

Для изучения редокс-регуляции генов стрессовых ответов у цианобактерий мы использовали модельный штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803 и исследовали влияние ингибиторов фотосинтеза 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевины (DCMU или диурона) и 2,5-дибром-3-метил-6-изопропилп-бензохинона (DBMIB или дибромотимохинона) на экспрессию генов ответа на холодовой и окислительный стрессы (*ndhD2*, *pgr5, desB, ocp, rbpA, katG, trx*) в ответ на изменение редокс-статуса пластохинонового пула.

DCMU блокирует пластохиноновый сайт связывания фотосистемы II (ФС II), препятствуя току электронов от P_{680} к пластохинону. DBMIB предотвращает окисление пластохинона цитохромом b*6*/*f* комплекса. Два ингибитора имеют противоположные эффекты на окислительно-восстановительный статус пула пластохинона: пластохинон окисляется в присутствии DCMU и восстанавливается в присутствии DBMIB.

Транскрипция всех исследованных генов возрастала на сильном свету (1500 мкмоль фотонов$\cdot м^{-2}\cdot с^{-1}$). DBMIB также увеличивал транскрипцию стресс-зависимых генов. DCMU подавлял транскрипцию гена *ocp*, однако усиливал другие гены: количество мРНК *desB* увеличивалось почти в 4,5 раза (Рис. 1).

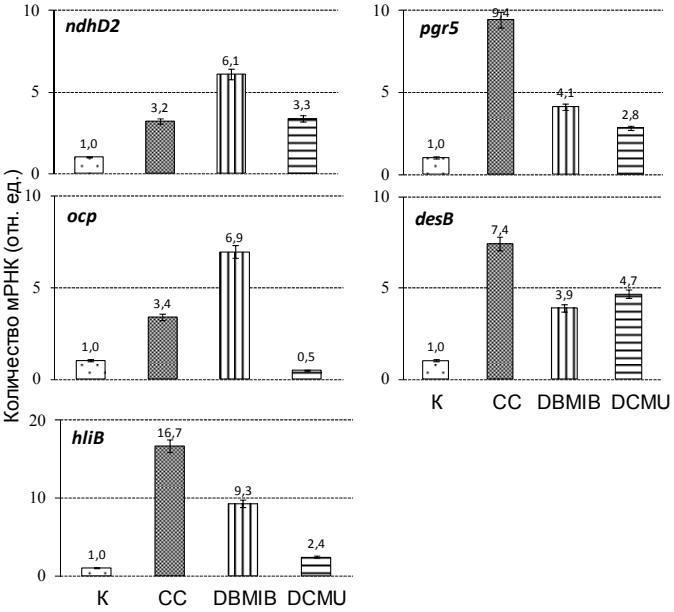


Рисунок 1. Транскрипция стресс-индуцируемых генов (ndhD2, pgr5, ocp, desB, hliB) Synechocystis дикого типа в контрольных условиях (K = 70 мкмоль фотонов·м$^{-2}$·с$^{-1}$; 32°C), на сильном свету (CC = 1500 мкмоль фотонов·м$^{-2}$·с$^{-1}$), в присутствии DCMU или DBMIB (10 мкМ).

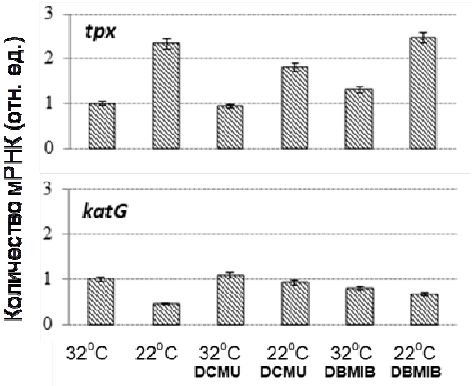


Рисунок 2. Транскрипция генов каталазы katG и тиоредоксин-пероксидазы tpx Synechocystis в ответ на холодовой стресс (22°C 30 мин) и действие разобщителей ЭТЦ – DCMU или DBMIB (10 мкМ).

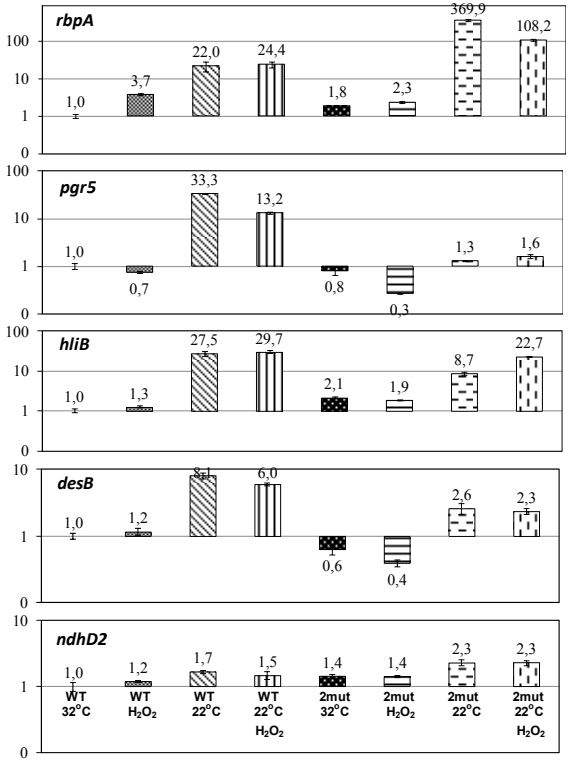


Рисунок 3. Транскрипция стресс-индуцируемых генов в клетках Synechocystis дикого типа (WT) и двойного мутанта $katG^{-}/tpx^{-}$ (2mut) в оптимальных условиях (32°C), в условиях холодового стресса (22°C 30 мин) и/или в присутствии 0,25 мМ перекиси водорода (30 мин H_2O_2).Под воздействием холодового стресса и/или DBMIB снижалась транскрипция *katG*, в то время как *trx* индуцировался холодом и/или DBMIB (Рис. 2).

Измерение количества H_2O_2 с помощью диацетата 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина (DCFH-DA) в клетках показало увеличение уровня перекиси водорода при воздействии сильного света (в 3 раза) или DBMIB (в 2 раза), но не DCMU.

Для оценки сигнальной роли низкомолекулярных агентов окислительного стресса (H_2O_2) использовали мутантный штамм *Synechocystis*, дефектный по двум генам – каталазы *katG* и тиоредоксин-пероксидазы *tpx* (*$katG^{-}/tpx^{-}$*) (Рис. 3).

Для большинства исследуемых генов *(rbpA, pgr5, desB, hliB)* клеток дикого типа *Synechocystis* показано увеличение экспрессии генов в условии холодового стресса, как в присутствии перекиси, так и без нее. Схожая тенденция наблюдается и в эксперименте с мутантами, стресс зависимые гены (*hliB, rbpA*) ответили усилением экспрессии в ответ на холод, как в присутствии пероксида водорода, так и без него.

Работа поддержана грантом РНФ № 14-24-00020.

ВЛИЯНИЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ ФУНГИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СОСТОЯНИЕ ПРО-/АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

Р.А. Набеева, И.А. Ярмухаметова, А.А. Ишмухаметов

ФГБОУ ВО Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия; e-mail: frg2@mail.ru

Фунгицидные препараты влияют на функционирование антиоксидантной системы растений [1]. Химические средства защиты растений вызывают различное по продолжительности увеличение содержания активных форм кислорода (АФК) в компартментах растительных клеток [2]. Таким образом, активация генерации АФК, под действием экзогенных веществ, может рассматриваться как фактор повышающий устойчивость растений к фитопатогенам.

Работа проводилась на растениях яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Башкирская 26, в лабораторных условиях. В работе были использованы водорастворимые соли 1,3-аминосульфидов [3], N,N–бис (диметиламинометил) – тиомочевина, (БТМ), препараты – «Бисол», «Купробисан» и «Биодукс».

Образование супероксид-аниона рассматривается в литературе как одна из основных защитных реакций растения на заражение его фитопатогеном [4]. Скорость образования супероксид-аниона в побеге при использовании исследованных препаратов возрастала в ряду соединение 1,3-аминосульфид >Биодукс > Бисол > БТМ > Купробисан (рис. 1А).

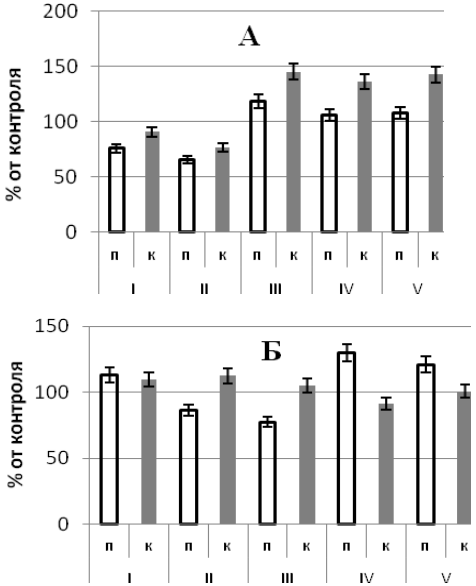


Рисунок 1. Влияние «БТМ» (I), «Купробисана» (II), 1,3-аминосульфида III (III), «Бисола» (IV) и «Биодукса» (V) на скорость образования супероксид-аниона (А), на активность СОД (Б) в побегах (п) и корнях (к) проростков пшеницы (% от контроля, 100 %)

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД), показало разный характер активности этого антиоксидантного фермента у проростков пшеницы после предпосевной обработки исследуемыми соединениями. Наибольшая активность фермента в побегах наблюдалась при использовании препаратов «Бисол» > «Биодукс» > соединения «БТМ» (рисунок 1 Б).

Изучение содержания перекиси водорода показало, что обработка 1,3-аминосульфидом III снижала содержание H_2O_2 (рисунок 2 А), что может быть связано с активацией пероксидазы в корнях (рисунок 3А).

Определение содержания малонового диальдегида (МДА) показало, что под действием предпосевной обработки препаратами «Купробисан» и «Бисол», а также соединения «БТМ», в побегах проростков пшеницы наблюдался более низкий уровень содержания МДА (рисунок 2Б). У растений, выросших на фоне препарата «Биодукс» и

соединения 1,3-аминосульфид III, наоборот было установлено высокое содержание МДА в побегах (рисунок 2Б). Накопление МДА в побегах растений, обработанных «Биодукс» и соединением 1,3-аминосульфид III, может свидетельствовать о высокой скорости образования АФК [5]. Определение активности пероксидазы показало, что наибольшая активность фермента отмечалась в побеге у проростков, выросших на фоне препарата «Купробисан» и соединения «БТМ» и было на 30 % выше, чем в контроле (рис 3А).

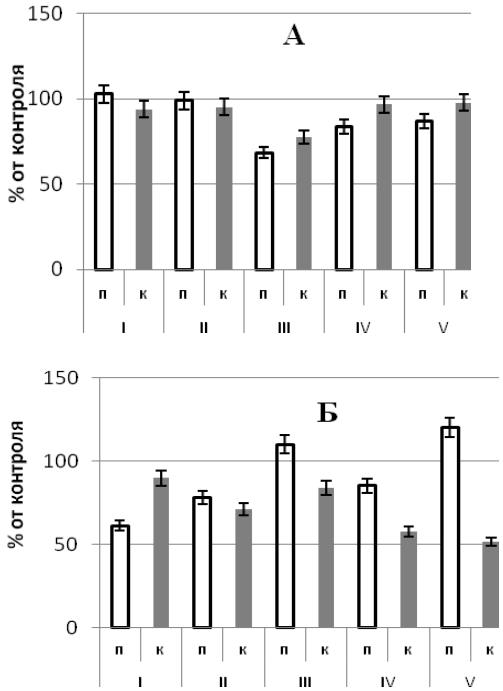


Рисунок 2. Влияние «БТМ» (I), «Купробисана» (II), 1,3-аминосульфида III (III), «Бисола» (IV) и «Биодукса» (V) на содержание H_2O_2 (А) и МДА (Б) в побегах (п) и корнях (к) проростков пшеницы (% от контроля, 100 %)

Однако активность фермента в корнях под действием препарата «Купробисан» и соединения «БТМ» была ниже контроля на 15 % и 63%, соответственно. У растений обработанных препаратом «Бисол» и соединением 1,3-аминосульфид III установлена наибольшая активность пероксидазы в корнях (рис 3А). Наблюдаемое нами повышение ак-

тивности пероксидазы в побеге, вероятно, было направлено на нейтрализацию высокого уровня H_2O_2 (рис 2А).

Под влиянием препаратов «Биодукс», «Бисол» и соединения 1,3-аминосульфид III в побегах растений возрастала активность каталазы (рис. 3Б). По сравнению с корнями, в побегах уровень активности каталазы был выше примерно в 2 раза. Противоположная картина наблюдалась у растений, выросших на фоне соединения «БТМ» и препарата «Купробисан», активность фермента была выше в корнях, чем в побегах на 63 и 84 % соответственно.

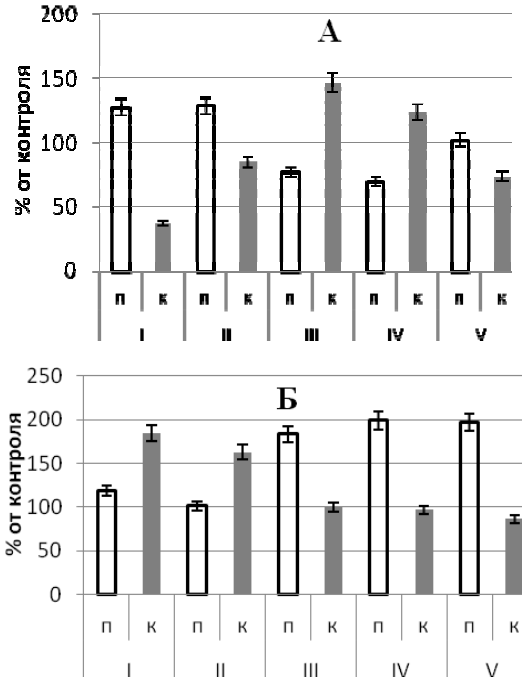


Рисунок 3. Влияние «БТМ» (I), «Купробисана» (II), 1,3-аминосульфида III (III), «Бисола» (IV) и «Биодукса» (V) на активность пероксидазы (А) и каталазы (Б) в побегах (п) и корнях (к) проростков пшеницы (% от контроля, 100 %)

Таким образом, исследование влияния соединений 1,3-аминосульфид III и «БТМ», а также препаратов «Бисол», «Биодукс», «Купробисан» на про-/антиоксидантную систему растений пшеницы,

показало наличие активного действия данных соединений на процессы генерации АФК и связанную с ними энзиматическую систему растений. Изменения в интенсивности образования АФК, вызванные протравливанием семян, а также активации пула ферментов антиоксидантов (супероксид-дисмутаза, каталаза, пероксидаза) может вести к формированию системной приобретенной устойчивости растений.

1. Jacob, C. Anwar A. The chemistry behind redox regulation with a focus on sulphur redox systems // Physiologia Plantarum. 2008.Vol. 133. № 3. P. 469-480.

2. Miteva, L. Ivanov S., Alexieva V. Compartative effect of 2,4-D on the glutathione levels, glutathione S-transferase and glutathione reductase activities in pea (*Pisum sativum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) // Докл. Бълг. АН. 2003. Vol. 56. № 3. P. 53-58.

3. Ямалеева, А.А. Хайруллина Р.Р., Набеева Р.А., Ямалеев А. М., Фархутдинов Р.Г., Ибрагимов А.Г. Синтез 1,3-аминосульфидных комплексов, их биологическая эффективность к фитопатогенам, вызывающих корневые гнили и индуцирование реакции устойчивости у *Triticum aestivum* L. // Вестник Башкирского университета. Т. 20. № 1. 2015. С. 66-72.

4. Пожерукова, В.Е., Плотникова Л.Я., Дегтярев А.И. Устойчивость пшеницы Тимофеева к бурой ржавчине определяется генерацией активных форм кислорода и подавлением образования гаусторий гриба *Puccinia triticina* // Фундаментальные исследования. 2015. № 2-2. С. 285-292.

5. Набеева, Р.А. Федяев В.В., Фархутдинов Р.Г., Ярмухаметова И.А., Хайруллина Р.Р., Ямалеева А.А., Ибрагимов А.Г. Влияние некоторых фунгицидных препаратов на окислительно-восстановительный обмен растений пшеницы // Современные проблемы науки и образования. № 2 (часть 2). - 2015. URL:http://www.science-education.ru/128-22332.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РАСТЕНИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД

М.В. Нарушко, А.М. Субботин, С.А. Петров

ФГБУН Тюменский научный центр СО РАН, г.Тюмень, Россия; e-mail: narushkomv@mail.ru

В настоящее время для интенсификации производства без использования химических средств защиты растений и удобрений с целью получения экологически чистой продукции и уменьшения вредного влияния на окружающую среду современное высокоэффективное растениеводство заинтересовано в поиске препаратов биологического и, в частности, микробиологического происхождения.

Создание фитостимуляторов на основе бактерий, выделенных из многолетнемёрзлых пород (ММП) является перспективным, данные микроорганизмы способны длительное время сохранять свою активность в экстремальных условиях, обладают устойчивостью к низким температурам, повышают адаптивные показатели растений[1,2,3,4].

Из многолетнемёрзлых пород (ММП), отобранных в Западной и Восточной Сибири выделены штаммы бактерий, сохранившие жизнеспособность. Создана рабочая коллекция бактерий. 29 штаммов бактерий протестировано на растениях. Отобрано 2 штамма, наиболее перспективных для разработки микробиологических препаратов. Данные штаммы депонированны во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ) ФГУПГосНИИГенетика.

Цель работы - исследовать влияние различных штаммов бактерий, выделенных из образцов многолетнемёрзлых пород отобранных в Западной и Восточной Сибири, на фенотипическую изменчивость морфофизиологических параметров растений.

В исследовании использовались бактерии, выделенные из проб ММП преимущественно галоценового периода, полученных при бурении скважин в районе Тарко-Сале (Западная Сибирь) и из многолетнемёрзлых береговых отложений реки Чара (Восточная Сибирь) с разных глубин залегания ММП.

Культивирование штаммов бактерий осуществляли 24 часа в

аэробных условиях в термостате при температуре от +25 до +36 °С. Штаммы выращивали путём посева клеток бактерий штрихом в стандартные пробирки на скошенный питательный агар для культивирования микроорганизмов (ГРМ – агар, г. Оболенск). Затем производили смыв микроорганизмов из каждой пробирки 5 мл дистиллированной воды. Концентрацию микроорганизмов определяли культуральным методом серийных разведений по количеству КОЕ на агаризованной питательной среде в чашках Петри. Плотность культур доводили до рабочей концентрации в 1-3 х 10^7 или 1-3 х 10^9 КОЕ в 1мл стерильной дистиллированной воды.

Семена растений (n=100) помещали в 50 мл бактериальной суспензии на 2 часа. Посевы проводились в песок или торфогрунт, двукратно прокалённые при t=250ºС в течение часа. В отдельные вегетационные сосуды объемом 0,5 л высевали по 25 семян и однократно поливали 50 мл бактериальной суспензией, повторность опыта 4-х кратная. Семена проращивали в лабораторных условиях при температуре 22±1,5ºС. На 3 сутки определяли энергию прорастания, на 7 сутки - лабораторную всхожесть семян, на 20 сутки эксперимента производили измерения морфометрических показателей растений [5]. Количество хлорофиллов *a, b* и каротиноидов определяли спектрофотометрическим методом. Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы «SPSS ver. 11.5.for Windows» (среднее значение, дисперсия средних, параметрическое сравнение по *t*-критерию Стьюдента, частотный анализ).

Штамм *Bacillus cereus* 875 TS, выделен из многолетнемёрзлых пород возрастом 10-12 тысяч лет, отобранных из бурового керна с глубины 10 м при бурении скважины в районе Тарко-Сале (Тюменская область).

Штамм бактерий *Bacillus cereus* 875 TS повысил энергию прорастания на 97%, лабораторную всхожесть на 17%, привел к увеличению длины побега проростков пшеницы на 10%, длины колеоптиля на 19%, длины и площади первого листа около 30%, количеству корней на 9%. При этом наблюдается активация системы фотосинтеза: значительное увеличение в проростках растений хлорофила a, хлорофила b, каротиноидов и, соответственно, их суммарного количества.

Штамм *Bacillus megaterium* 2-06-TS1, выделен из многолетнемёрзлых пород (отторфованая глина), отобранных из бурового керна

с глубины 10 м при бурении скважины в районе Тарко-Сале (Тюменская область).

Штамм бактерий *Bacillus megaterium* 2-06-TS1 повысил энергию прорастания на 35%, лабораторную всхожесть на 23%, привел к увеличению количества корней на 22%. Наблюдается активация системы фотосинтеза: значительное увеличение в проростках растений хлорофилла b на 35%, каротиноидов на 10% и суммарного количества пигментов фотосинтеза растений на 14%.

Исследованные штаммы перспективны для разработки промышленных образцов бактериальных препаратов для повышения продуктивности растений.

1. Нарушко М.В., Субботин А.М., Петров С.А., Мальчевский В.А. Использование бактерий из многолетнемёрзлых пород для повышения устойчивости яровой пшеницы к низким температурам. // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: Материалы VIII-й международной научной конференции. - Минск, 2015. - С.81

2. Narushko M.V., Subbotin A.M., Bazhin A.S., Petrov S.A., Malchevskiy V.A. Assessment of sustainability of spring wheat treated with bacteria isolated from permafrost, to low temperature conditions. // International Conference “Permafrost in XXI Century: basic and applied researches”, Pushchino, Russia, 2015 P. 106-107.

3. Субботин А.М., Нарушко М.В., Симонова Е.О. Отбор штаммов бактерий, выделенных из многолетнемёрзлых пород, по влиянию на адаптивные показатели растений. // Арктика, Субарктика: мозаичность, контрастность и вариативность криосферы: Труды Международной конференции. – Тюмень, 2015. – С.372-374.

4. Субботин А.М., Нарушко М.В., Боме Н.А. и др. Влияние микроорганизмов из многолетнемерзлых пород на морфофизиологические показатели яровой пшеницы. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т. 20. № 5. С. 666-672.

5. Боме Н.А., Белозерова А.А., Боме А.Я. Биологические свойства семян и феногенетический анализ культурных растений: учебно-методическое пособие. Тюмень, 2007.

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ

И.А. Нилова, Л.В. Топчиева, А.Ф. Титов

ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия; e-mail: im-ira@mail.ru

Действие высоких температур на растения вызывает у них усиление генерации активных форм кислорода (АФК). АФК могут выступать в качестве сигнальных молекул, но при достижении высоких концентраций они способны повреждать различные клеточные структуры и макромолекулы. Чтобы предотвратить негативное воздействие АФК на клетки у растений активизируется антиоксидантная система (АС), важным компонентом которой является фермент супероксиддисмутаза (СОД), катализирующая дисмутацию супероксидного анион-радикала в перекись водорода [1]. Однако, имеющиеся литературные данные, касающиеся генерации АФК и активизации (а в некоторых случаях ингибирования) АС при действии на растения высоких температур, весьма неоднозначны [2, 3]. В частности, это касается сведений о накоплении H_2O_2, генерации O^-_2 и активизации СОД при тепловых воздействия разной интенсивности. Учитывая это, цель данного исследования заключалась в изучении накопления перекиси водорода, генерации супероксидного радикала и активности СОД в листьях пшеницы при высокотемпературных воздействиях разной интенсивности.

Исследования проводили с недельными проростками озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, которые подвергали в течение 3 сут воздействию температур 37 и 43°С. Активность СОД и содержание H_2O_2 определяли спектрофотометрически [4, 5], супероксидный анион-радикал в листьях проростков пшеницы выявляли по образованию преципитата формазана [6].

Было установлено, что при температуре 37°С в листьях проростков пшеницы содержание перекиси водорода повышается уже через 15 мин, но через час этот показатель снижается. При температуре 43°С содержание H_2O_2 становится ниже в первые минуты опыта, через час повышается примерно до исходного уровня и далее снова снижается (табл.).

Таблица

Влияние высоких температур на относительное содержание перекиси водорода в листьях проростков пшеницы, %

Температура, °С	Экспозиция, ч					
	0	0,25	0,5	1	24	72
37	100	149±24,5*	117±11,3*	78±15,5*	64±11,2*	33±8,5*
43	100	65±11,1*	65±17,2*	88±18,2	43±11,9*	34±14,9*

** – отличия от исходного уровня достоверны при P≤0.05.*

Необходимо подчеркнуть, что помимо перекиси водорода при действии на растения высоких температур генерируется и другие АФК, например, супероксидный анион-радикал. Нами было установлено, что генерация супероксидного радикала в листьях пшеницы при действии на них температуры 37°С происходит через 15 мин от начала воздействия, а затем, через час, она снижается. При этом температура 43°С не вызывает накопление супероксидного радикала [7].

Известно, что генерация АФК тесно связана с активностью АС. В ходе исследования было выявлено, что активность СОД в их листьях достоверно возрастает на вторые сутки опыта (рис.). В отличие от этого, при действии температуры 43°С активность СОД повышается уже в первые минуты и достигает максимума на третьи сутки.

Необходимо подчеркнуть, что устойчивость растений также существенным образом зависит от температуры, которая действует на растение. В частности, температура 37°С приводит к постепенному повышению теплоустойчивости растений и является закаливающей для данного сорта пшеницы.

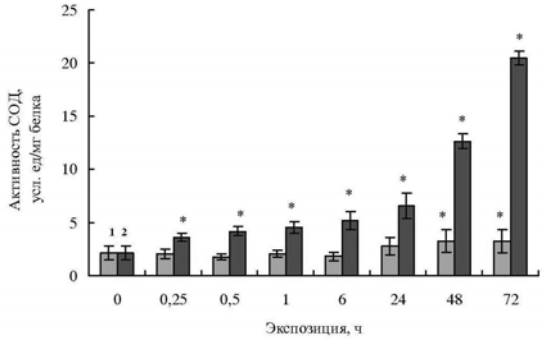


Рисунок. Динамика активности СОД в листьях проростков пшеницы при действии высоких температур 1 – 37°С, 2 – 43°С. (* – отличия от исходного уровня достоверны при P≤0.05).

Напротив, температура 43°С вызывает повышение теплоустойчивости растений только в первые часы её воздействия, а в их дальнейшем теплоустойчивость резко падает и растения погибают [8].

На основании полученных данных можно предположить, что температура 37°С в первые минуты воздействия приводит к генерации АФК, в дальнейшем же концентрация АФК снижается, что может быть связано с активацией АС, в частности, фермента СОД. Важно, что активизация СОД происходит на вторые сутки эксперимента, в это же время отмечен максимум теплоустойчивости [8]. Не исключено, что при температуре 37°С АФК могут выступать в качестве сигнальных молекул, участвующих в запуске механизмов формирования повышенной устойчивости растений, далее активизируется СОД, что позволяет нейтрализовать супероксидный анион-радикал, предотвращая повреждение клеток, и в целом это способствует повышению теплоустойчивости растений и их успешному выживанию в условиях действия температуры 37°С. Напротив, при температуре 43°С, генерация АФК не происходит, возможно, за счет быстрого повышения активности АС, поэтому АФК не включают какую-то часть защитных механизмов, приводящих к повышению общей устойчивости. Следует отметить, что высокая активность АС, в данном случае, совпадает с максимумом теплоустойчивости (1 час), однако при этой же температуре чуть позднее наблюдаются повреждения и гибель растений [8].

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют заключить, что тепловое воздействие разной интенсивности (37 и 43°С) на проростки пшеницы по-разному влияет на содержание перекиси водорода, генерацию супероксидного анион-радикала и активность СОД. При этом, с одной стороны, перекись водорода и супероксидный анион-радикал могут участвовать в запуске в клетках растений защитных механизмов, с другой стороны, активизация СОД и нейтрализация АФК также являются важными элементами устойчивости.

1. Бараненко В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. 2006. Т. 48. №6. С. 465 – 474.

2. Kumar R., Sharma S. K. Gadpayle K. A. Singh Kh., Sivaranjani R., Goswami S., Rai R. D. Mechanism of action of hydrogen peroxide in wheat thermotolerance – interaction between antioxidant isoenzymes, pro-

line and cell membrane // African Journal of biotechnology. 2012. Vol. 11. P. 14368 – 14379.

3.Wang X., Cai J., Liu F., Dai T., Cao W., Wollenweber B., Jiang D. Multiple heat priming rnhances thermo-tolerance to a later high temperature stress via improving subcellular antioxidant activities in wheat seedlings // Plant Physiology and Biochemistry. 2014. Vol. 74. P. 185 – 192.

4. Beauchamp Ch., Fridovich I. Superoxide Dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. Vol. 44, no. 1. P. 276–287.

5. Bellincampi D., Dipperro N., Salvi G., Cervcone F., De lorenzo G. Extracellular H2O2 indused by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the Auxin-Regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants // Plant Physiology. 2000. V. 122. P. 1379 – 1385.

6. Rao M. V., Davis K. R. Ozone-imdused cell death occurs via two distinct mechanisms in Arabidopsis: the role of salicylic acid // The Plant Journal. 1996. Vol. 17, No. 6. P. 603 – 614.

7. Нилова И. А., Топчиева Л. В., Репкина Н. С. Влияние низкой и высокой закаливающей температур на содержание супероксид радикала в листьях проростков пшеницы // Ботаника и природное многообразие растительного мира: Сб. тез. II Всероссийской научной интернет-конференции с международным участием (Казань, 16 декабря 2014 г.). 2014. С. 89 – 90.

8. Нилова И. А., Титов А. Ф. Динамика теплоустойчивости проростков пшеницы в зависимости от интенсивности высокотемпературного воздействия // Труды КарНЦ РАН, сер. Экспериментальная биология. 2014. № 5. С. 214 – 217.

МОДИФИКАЦИЯ АФК-СЕНСОРА В K^+-КАНАЛЕ GORK ПОДАВЛЯЕТ АКТИВАЦИЮ НАРУЖУ-НАПРАВЛЕННОЙ K^+-ПРОВОДИМОСТИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГИДРОКСИЛ-ГЕНЕРИРУЮЩИХ СМЕСЕЙ

И.Ю. Новосельский[1], П.В. Гриусевич[1], Д.Е. Стрельцова[1], В.В. Самохина[1], В.С. Мацкевич[1], К.С. Добрякова[2], Е.В. Тютерева[2], А.М. Малышева[1], А.И. Соколик[1], О.В. Войцеховская[2], В.В. Демидчик[1,2]

[1]*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь; e-mail: dzemidchyk@bsu.by*

[2]*Ботанический Институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия*

Активные формы кислорода (АФК) вовлечены как в процессы нормальной физиологии, так и патофизиологические явления у высших растений [1]. АФК синтезируются несколькими путями в различных клеточных компартментах. В последние годы показана особая роль внеклеточного (апопластного) пула АФК, в частности, его вовлечение в ключевые регуляторные реакции растений, такие как контроль растяжения клеток корня и пыльцевых трубок, закрывание устьиц, ответы на стрессовые воздействия и индукция иммунитета [1]. Однако до сих пор дискуссионным остается вопрос о сенсорах на поверхности клетки, ответственных за восприятие АФК-сигнала и, соответственно, индуцирующих вышеуказанные реакции. В настоящем исследовании мы представляем данные, демонстрирующие роль K^+-каналов GORK в первичных взаимодействиях растительной клетки с АФК. Данные каналы в присутствии АФК способны катализировать выход калия из клеток корня, что вероятно опосредует метаболические перестройки адаптивного характера, а также индукцию запрограммированной клеточной гибели [2].

Анализ структуры GORK показал его аналогию с K^+-каналом SKOR, который отвечает за загрузку K^+ в сосуды ксилемы [3]. У SKOR выявлен АФК-чувствительный центр, инкорпорированный в молекулу канала и ответственный за активацию под действием АФК [3]. Схожий центр идентифицирован нами в канале GORK, который обильно экспрессируется в клетках коры корня и эпиблемы. АФК-чувствительной аминокислотой данного центра является цистеин в положении 151 (Цис-151). Его модификация может приводить к изменению калиевой проводимости мембраны и снижению чувствительности к АФК.

Использовались корни *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh четырех типов: 1) дикий тип Wassilevskija – ‘WS-0’; 2) нокаутные мутанты *gork1-1*, лишенные функционального белка GORK, кодирующего наружу-выпрямляющий K^+-канал (1 линия); 3) *gork1-1* с возмещенным нативным GORK (2 линии); 4) *gork1-1*, экспрессирующий GORK с

заменой C151S (3 линии). Данные растения были предоставлены группой профессора Инго Дреера (Университет Тальки, Чили). Экспрессия модифицированных транскриптов и нативного GORK были верифицированы с помощью количественного ПЦР-анализа.

Все линии выращивались в стерильной «вертикальной» культуре на гелевой среде, содержащей 100% солей по стандартной прописи Мурашиге и Скуга с витаминами, 0,25% фитагеля, 1% сахарозы (pH 6) [4].

Электрофизиологические измерения производились при помощи пэтч-кламп усилителя Dagan PC-ONE и АЦП на базе Axon Instruments (Molecular Devices, США). Использовались стандартные пэтч-кламп-протоколы, ранее развитые в наших лабораториях [4]. Подавались прямоугольные импульсы напряжения от +120 до -180 мВ в гиперполяризующем направлении. Регистрировались токи на максимуме активации, строились и анализировались стационарные вольт-амперные кривые.

Анализ выходящих токов калия у растений дикого типа (WS-0) продемонстрировал наличие быстро- и медленно-активирующихся компонент в наружу-направленной проводимости плазматической мембраны. Введение в окружающий раствор смесей, генерирующих гидроксильные радикалы (1 мМ $CuCl_2$, 1 мМ H_2O_2, 1 мМ L-аскорбиновой кислоты), вызывало многократное увеличение медленно-активирующиеся компоненты выходящего тока и небольшой рост мгновенных токов (быстрой компоненты проводимости).

У растений-нокаутов *gork1-1*, лишенных функционального белка GORK, медленно-активирующаяся компонента тока отсутствовала, а обработка их смесью, генерирующей гидроксильные радикалы, не приводила к заметным изменениям данной компоненты. Примечательно, что для *gork1-1* была характерна более выраженная активация мгновенных K^+ токов по сравнению с диким типом. У растений *gork1-1* с возмещенным нативным GORK наблюдалась нормальная активация медленных наружу-направленных токов, даже несколько превышающая дикий тип. Линии *gork1-1*, экспрессирующие GORK с заменой цистеина 151 на серин, демонстрировали снижение чувствительности к смесям, генерирующим гидроксильные радикалы. Таким образом, полученные данные указывают на то, что Цис-151 в комплексе K^+-канала GORK участвует в прямом взаимодействии с АФК

и опосредует активацию данного канала в ответ на продукцию в среде АФК. Явление активации K^+-канала GORK под действием АФК может потенциально вовлекаться в реакции, связанные с регуляторными функциями АФК, а также лежать в основе индукции запрограммированной клеточной гибели и автофагии в корне высших растений.

Данное исследование было поддержано Российским Научным Фондом (грант № 15-14-30008; руководитель: В.В. Демидчик).

1. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology // Environmental and experimental botany. 2015. Vol. 109. P. 212-228.

2. Demidchik V., Straltsova D., Medvedev S.S., Pozhvanov G.A., Sokolik A., Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K^+-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment // Journal of experimental botany. 2014. Vol. 65. P. 1259-1270.

3. Garcia-Mata C., Wang J., Gajdanowicz P., Gonzalez W., Hills A., Donald N., Riedelsberger J., Amtmann A., Dreyer I., Blatt M.R. A minimal cysteine motif required to activate the SKOR K^+ channel of *Arabidopsis* by the reactive oxygen species H_2O_2 // Journal of biological chemistry. 2010. Vol. 285. P. 29286–29294.

4. Demidchik V., Cuin T.A., Svistunenko D., Smith S.J., Miller A.J., Shabala S., Sokolik A., Yurin V. *Arabidopsis* root K^+ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death // Journal of cell science. 2010. Vol. 123. P. 1468-1479.

НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА ЛИНОЛЕВОЙ И ЛИНОЛЕНОВОЙ КИСЛОТ В КОРНЯХ ЗЛАКОВ

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

ФБГУН Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН, г. Казань, Россия; e-mail: anyuta_ogorodnik@mail.ru

В ходе метаболических процессов в растениях происходит окисление полиненасыщенных жирных кислот, катализируемое липоксигеназами, так называемый, липоксигеназный каскад. Результатом включения липоксигеназной сигнальной системы является образование оксигенированных производных жирных кислот – оксилипинов, многие из которых приводят к экспрессии «защитных» генов. Внимание исследователей к оксилипинам вызвано участием этих веществ в механизмах защиты растений - оксилипины ответственны за устойчивость растений к стрессам, в ряде случаев - за формирование системной устойчивости растений к различным экстремальным факторам, регуляцию роста. На сегодняшний день известны алленоксидсинтазное, дивинилэфирсинтазное, гидропероксидлиазное и эпоксиалкогольсинтазное направления липоксигеназного пути. Ключевыми ферментами липоксигеназного каскада, обеспечивающими разнообразие продуктов, являются липоксигеназы (9- и 13-специфичные) и цитохромы Р450 семейства CYP74: алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). При этом АОС и ДЭС являются дегидратазами, тогда как ГПЛ и ЭАС – изомеразами.

Достигнутый в настоящее время уровень знаний по геномике растений свидетельствует о широком разнообразии генов, контролирующих липоксигеназный путь растений. Несмотря на достигнутые успехи в изучении липоксигеназного пути растений достаточно многие аспекты остаются неисследованными. Как правило, проведённые до сих пор работы касались преимущественно узкого круга высших растений. Имеющаяся в настоящее время геномная информация свидетельствует о том, что разнообразие ферментов липоксигеназного пути значительно превышает область сегодняшних знаний. Кроме того, большинство опубликованных работ касается фотосинтезирующих органов высших растений, в то время как нефотосинтезирующие органы, как правило, существенно отличаются направленностью липоксигеназного пути. Ранее были опубликованы работы посвященные метаболизму *in vitro* линолевой и α-линоленовой кислот в нефотосинтезирующих органах высших растений [1-3]. Нами был изучен метаболизм этих кислот в некоторых злаках: корнях риса и кукурузы [4]. В корнях риса реализуется в основном ЭАС направление, опосредованное действием 9-липоксигеназы, ГПЛ активность несколько

ниже. Активность ЭАС подтверждается также образованием тригидроксикислот. Идентифицированы АОС продукты – а-кетолы. В корнях кукурузы – реализуется в основном АОС направление, опосредованное действием 9-липоксигеназ.

В продолжение исследований метаболизма *in vitro* ненасыщенных жирных кислот в нефотосинтезирующих органах высших растений из семейства Злаки было выбрано несколько представителей: пшеница (*Triticum aestivum* L.), сорго *(S. occidentocuresicum* Jak*., S. sudanense* Jak*., S.chinense* Jak.), просо (*Panicum miliaceum* L.), овёс (*Avena sativa* L.), ячмень *(Hordeum vulgare* L.). Изучены профили оксилипинов корней проростков этих злаков. Обнаружено большое разнообразие продуктов. Среди обнаруженных оксилипинов преобладали продукты 9-липоксгеназного каскада, но присутствовали и продукты 13-липоксгеназного каскада. Идентифицированные оксилипины являются продуктами путей, контролируемых гидропероксидлиазами (ГПЛ), алленоксидсинтазами (АОС) и эпоксиалкогольсинтазами. К продуктам ГПЛ относятся 9-оксононановая кислота (минорный продукт со временем удерживания около 5,1 мин), продукт 1 - 4-гидрокси-2-ноненовая кислота (продукт окисления 3Z-ноненаля); азелаиновая кислота (нонан-1,9-диовая кислота) -2 основной продукт, образуется в результате окисления продукта 3 -9-оксононановой кислоты, первичного продукта 9-ГПЛ, продукт 4 - (3Z)-травматиновая кислота ((3Z)-додецен-1,12-диовая кислота), продукт окисления (9Z)-12-оксо-9-додеценовой кислоты, которая является первичным продуктом 13-ГПЛ. Продукты 1-4 были обнаружены нами ранее в развивающихся корнях гороха [5]. Помимо продуктов ГПЛ, в профиле оксилипинов некоторых злаков (пшеница, сорго, ячмень) в порядке возрастания полярности присутствуют неизвестные продукты 5, 6 и 7 (их масс-спектры не соответствуют никаким известным соединениям из библиотечных масс-спектров), гидроксиоктадекадиеновые кислоты 9-ГОД и ГОД, 10-оксо-11-фитоеновая кислота 8 (минорный продукт), цис-12-оксо-10,15-фитодиеновая кислота (9), эпоксиспирты: 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота (продукт 10) и 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота (продукт 11), альфа-кетолы: 9- гидрокси-10-оксо-12-октадеценовая кислота (продукт 12) и (9*Z*)-12-оксо-13-гидрокси-9-октадеценовая кислота (продукт 13). Наконец, самыми полярными

продуктами были тригидрокси-кислоты (время удерживания 19-21 мин.). Соединения 1-3 являются продуктами 9-ГПЛ, а соединение 4 – продуктом 13-ГПЛ. Соединения 8, 9, 12 и 13 – продукты пути, контролируемого АОС. Соединения 10, 11 и тригидроксикислоты – продукты пути, контролируемого эпоксиалкогольсинтазой (ЭАС). Таким образом, корни проростков пшеницы проявляют исключительное разнообразие оксилипинов. В них одновременно экспрессированы гены 9- и 13-липоксигеназ, ГПЛ, АОС и ЭАС. По-видимому, роль оксилипинов в развивающихся корнях связана как с регуляцией онтогенеза, так и с защитными функциями. Например, азелаиновая кислота известна своим антимикробным действием. Недавно азелаиновая кислота была идентифицирована как эндогенный сигнал, инициирующий развитие системной устойчивости в растениях арабидопсиса, поражённых локальной инфекцией [6].

Среди обнаруженного разнообразия оксилипинов, с нашей точки зрения, особый интерес представляют соединения 5-7. При этом соединения 5-7 относились к основным оксилипинам корней злаков (пшеницы, сорго, ячменя). Спектры не совпадали с каким-либо ранее известным соединением, но были идентичны спектру продукта перегруппировки Фаворского, который образовывался в качестве минорного продукта превращения 9-гидроперекиси α-линоленовой кислоты с ферментативным препаратом семян льна. Эта реакция контролировалась алленоксидсинтазой и протекала через промежуточную окись аллена и циклопропанон [7]. Каталитическое гидрирование соединений 5-7 привели к соединению, спектр которого точно соответствует спектру восстановленного продукта Фаворского.

Для окончательного подтверждения структуры и уточнения положения и геометрии двойной связи в исследуемых соединениях 5-7 были зарегистрированы их ^{1}H-ЯМР спектры, гомокорреляционный ^{1}H-^{1}H-COSY и гетерокорелляционные спектры HSQC и HMBC. В слабопольной области спектров ЯМР наблюдаются шесть хорошо разрешенных мультиплетных сигналов олефиновых протонов. Проследив пути переноса намагниченности по наличию кросспиков в спектре ^{1}H-^{1}H-COSY, удалось выполнить практически полное соотнесение спектральных линий. Так, химические сдвиги сигналов протонов одинарных связей соединения 5 полностью соответствуют химическим сдвигам сигналов протонов полученного ранее родствен-

ного соединения из семян льна. Важным отличием, позволяющим утверждать, что соединение 5 является новым соединением, является наличие в нём единственной двойной связи H2'-H3' (Таблица 1). Значение константы спин-спинового взаимодействия протонов двойной связи J = 10,9 Гц указывает на цис-конфигурацию.

Таким образом, новые оксилипины – соеднения 5-7 - в корнях злаков - продукты превращения линолевой и α-линоленовой кислот по механизму перегруппировки Фаворского. Соединения 5-7 является продуктами алленоксидсинтазного пути. Первичный продукт алленоксидсинтазы, короткоживущая окись аллена, превращается в нестабильный циклопропанон. Напряжённое трёхчленное кольцо циклопропанона раскрывается в результате нуклеофильной атаки воды с образованием продукта Фаворского. О новом направлении алленоксидсинтазного пути в корнях злаков до настоящего времени не сообщалось.

1. Hamberg M. New cyclopentenone fatty acids formed from linoleic and linolenic acids in potato // Lipids. 2000. V. 35. N. 4. P.: 353-363.

2. Grechkin A.N., Ogorodnikova A.V., Gnezdilov O.I., Mukhtarova L.S. Detection of a pathway from linoleate to a novel cyclopentenone: cis-12-oxo-10-phytoenoic acid in sunflower roots // Chembiochem. 2007. V. 8. N. 18. P.: 2275-2280.

3. Ogorodnikova A.V., Latypova L.R., Mukhitova F.K., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Detection of divinyl ether synthase in Lily-of-the-Valley (Convallaria majalis) roots // Phytochemistry. 2008. V.69. N.16. P.: 2793-2798.

4. Ogorodnikova A.V., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., Mukhitova F.K., Toporkova Y.Y., Hamberg M., Grechkin A.N. Stereospecific biosynthesis of (9S,13S)-10-oxo-phytoenoic acid in young maize roots // Biochim Biophys Acta. 2015. V. 1851. N. 9. P.: 1262-1270.

5. Mukhtarova L.S., Mukhitova F.K., Gogolev Y.V., Grechkin A.N. Hydroperoxide lyase cascade in pea seedlings: Non-volatile oxylipins and their age and stress dependent alterations // Phytochemistry. 2011. V.72. N. 4-5. P.: 356-364.

6. Jung H.W., Tschaplinski T.J., Wang L., Glazebrook J., Greenberg J.T. Priming in systemic plant immunity // Science. 2009. V.324. N. 5923. P.: 89-91.

7. Grechkin A.N., Lantsova N.V., Toporkova Y.Y., Gorina S.S.,

Mukhitova F.K., Khairutdinov B.I. Novel allene oxide synthase products formed via Favorskii-type rearrangement: mechanistic implications for 12-oxo-10,15-phytodienoic acid biosynthesis // Chembiochem. 2011. V.12. N.16. P.: 2511-2517.

БРАССИНОСТЕРОИДЫ И УРОВЕНЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ

О.В. Панибрат

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь; e-mail:panisestra@tut.by

В настоящее время известно, что активные формы кислорода (АФК), такие как гидроксил-радикал (OH•), супероксид-анион ($O_2^{\bullet -}$), пероксид водорода (H_2O_2) оказывают множество как отрицательных, так и положительных биологических эффектов. Они участвуют в регуляции клеточного цикла, в процессе апоптоза, ряде метаболических реакций являются медиаторами сигнальной трансдукции и др. Отрицательное их действие заключается в том, что это весьма реакционно способные соединения, которые приводят к окислительным повреждениям биологически важных молекул: белки, липиды, нуклеиновые кислоты, следствием чего может быть нарушение функций, и даже гибель клеток [1].

В ряде работ показано, что стероидные гормоны растений – брассиностероиды (БС) – помимо участия в регуляции роста и развития растений, способны повышать их устойчивость к стрессовым факторам среды, посредством изменения активности ферментов антиоксидантной защиты, таких как супероксиддисмутаза. каталаза, глутатион редуктаза, пероксидаза и т.д [2]. У млекопитающих они проявляют антиоксидантное действие при некоторых патологиях, таких как гипергликемия и болезнь Паркинсона. Также в эксперментах по изучению генотоксичности АФК было показано, что она значительно снижается под действием кастастерона в концентрации 10^{-9}М [3].

Кроме того у ряда брассиностероидов была обнаружена антипролиферативная активность в отношении раковых клеточных линий.

Считается, что в основе механизма их антипролиферативного действия лежит арест клеточного цикла, изменение экспрессии циклинзависимых протеинкиназ, что приводит к апоптозу [4].

На сегодня известно свыше 200 типов онкологических патологий. Во многих случаях возникновение и развитие заболевания связывают с изменением уровня АФК [1].

Цель настоящей работы – выяснение взаимосвязи антипролиферативной активности и уровня АФК в раковых клетках под действием брассиностероидов.

До недавнего времени уровень АФК можно было проследить лишь косвенным путем, например, после разрушения клетки и определения степени перекисного окисления липидов. В последние годы появилась возможность характеризовать уровень АФК непосредственно в живой клетке. В частности, для этого используется метод флуориметрии и флуоресцентный зонд – 2′,7′- дихлордигидрофлуоресцеин диацетат. Наличие ацетатных групп у этого соединения обеспечивает эффективное проникновение его в клетку и после гидролиза и окисления вещества внутриклеточными АФК наблюдается интенсивная флуоресценция. Ограничивает применение флуорофора его исключительно высокая стоимость. В связи с этим нами была освоена методика синтеза [5] данного соединения.

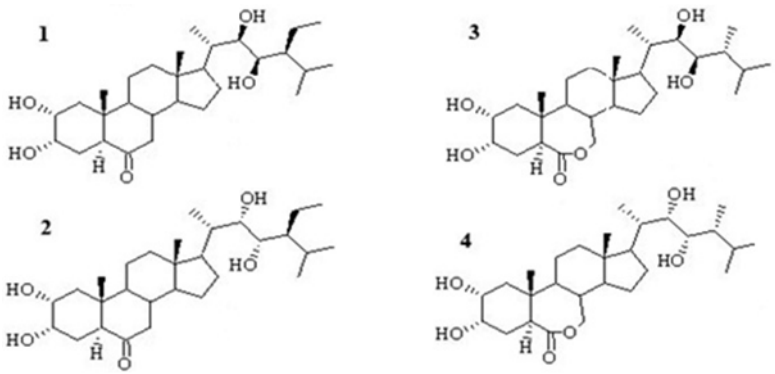


Рисунок 1. Структура исследованных соединений: 1 - 28-гомокастастерон, 2 - (22S,23S)-28-гомокастастерон, 3 - 24-эпибрассинолид, 4 - (22S,23S)-24-эпибрассинолид

В настоящей работе методом проточной флуоресцентой цитометрии измерен уровень внутриклеточных АФК в раковой клеточной линии А549 (карцинома легких), подверженной действию природных БС и их синтетических изомеров (рис.1), и сопоставлен с антипролиферативной активностью этих БС (рис.2 А.).

В соответствии с радикальной концепцией возникновения и развития раковых заболеваний противоопухолевую активность следовало бы связывать с ингибированием АФК. Однако из наших экспериментов следует, что введение в раковую клетку БС сопряжено с увеличением интенсивности внутриклеточной флуоресценции, которая в случае наиболее эффективного в отношении гибели раковых клеток соединения более чем в 5 раз превышает контрольное значение (рис.2 Б.).

Для харакеристики возможного механизма воздействия исследуемых соединений на клеточную гибель было проведено двойное окрашивание клеток этидиум бромидом (Et-Br) и 2′,7′- дихлордигидрофлуоресцеин диацетатом. Известно, что Et-Br обладает интенсивной флуоресценцией после связывания с ДНК. С помощью данной метки было охарактеризовано влияние уровня АФК на проницаемость клеточной мембраны.

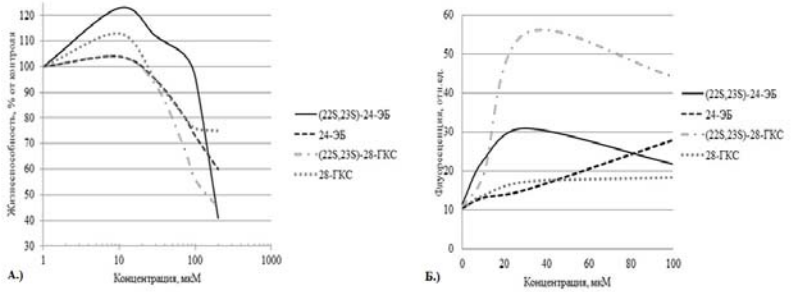


Рисунок 2. А) Зависимость влияния брассиностероидов на пролиферацию раковых клеток (линия А549) от концентрации изученных соединений; Б) Зависимость средней интенсивности флуоресценции DCF в клетках от концентрации брассиностероидов.

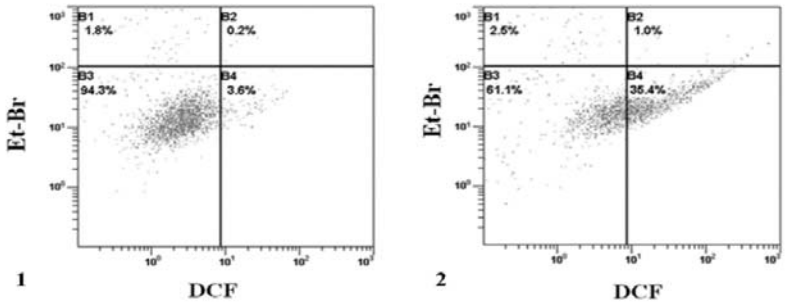


Рисунок 3. Сопоставление гибели клеток и уровня внутриклеточных АФК в раковой клеточной линии А549: 1-контроль; 2-10 мкМ (22S,23S)-28-гомокастестерон

Как следует из рис.3, при добавлении синтетического изомера природных БС - (22S,23S)-28-гомокастестерона наблюдается прямая корреляция между интенсивностью свечения клеток, вызванного воздействием Et-Br (ось ординат) и уровнем АФК (ось абсцисс). Это может быть обусловлено тем, что повышение уровня АФК приводит постепенному нарушению проницаемости клеточной мембраны для Et-Br, что является признаком некроза. Чуть менее выраженная корреляция показана и со вторым синтетическим изомером- (22S,23S)-24-эпибрассинолидом.

Можно предположить, что такое действие БС связано с регуляцией ими активности ферментов антиоксидантной защиты, подобно тому, как они действуют в клетках растений [2]. Но, так как в опухолевых клетках активность ферментов антиоксидантной защиты повышена из-за высокого исходного уровня АФК [6], то может наблюдаться действие БС отличное от такового в нормальных клетках.

1. Valko,M., Leibfritz, D.,Moncol, J., Cronin,M. T.,Mazur,M., & Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // Int J Biochem Cell Biol. 2007. Vol. 39. P. 44–84.

2. Vardhini BV., Anjum NA. Brassinosteroids make plant life easier under abiotic stresses mainly by modulating major components of antioxidant defense system // Front Environ Sci. 2015. Vol.2. Article 67.

3. Zhabinskii V.N., Khripach N.B., Khripach V.A. Steroid plant hormones: effects outside plant kingdom // Steroids. 2015. Vol. 97. P.87-97.

4. Swczynová J, Malíková J, Hoffmannová L, Kohout L, Strnad M.

Anticancer properties of brassinosteroids // Planta Med 2006; Vol. 72. P066.

5. Brandt R., Keston AS. Synthesis of diacetyldichlorofluorescin: A stable reagent for fluorometric analysis // Anal Biochem 1965.Vol. 11(1). P.6-9.

6. Toyokuni S, Okamato K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer // FEBS Lett 1997. Vol.358. P.1-3.

РОЛЬ СУПЕРОКСИД-АНИОНА В ЗАЩИТЕ ПШЕНИЦЫ ТИМОФЕЕВА И ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ С ЕЕ ГЕНАМИ ОТ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ

Л.Я. Плотникова, А.И. Дегтярев, В.Е. Пожерукова

ФГБОУ ВО Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, г. Омск, Россия; e-mail: lplotnikova2010@yandex.ru

В последние годы уделяется большое внимание участию активных форм кислорода (АФК) в защите растений от стрессовых факторов. Образование АФК в растении происходит в ответ на абиотические и биотические стрессы [4]. Первичной формой АФК является супероксид-анион $O_2^{\bullet-}$, остальные формы (перекись водорода H_2O_2, пероксидный радикал $HO_2^{\bullet}$, гидроксильный радикал $OH^{\bullet}$, и синглетный кислород $^1O_2$) образуются из него спонтанно или с помощью ферментов антиоксидантной системы [5]. АФК оказывают многообразное влияние на патогенез: разрушают клетки паразитов; запускают сигнальную трансдукцию, приводящую к активации набора защитных механизмов; участвуют в реализации реакции сверхчувствительности (СВЧ) и в укреплении клеточных стенок.

Для эффективной защиты от биотрофных ржавчинных грибов необходимо придавать растениям механизмы длительной устойчивости, сходные с теми, что существуют у иммунных видов (видов-нехозяев). Пшеница Тимофеева *Triticum timopheevii* Zhuk. считается одним из наиболее ценных источников генов устойчивости к грибным болезням [2], однако ее механизмы устойчивости к ржавчине находятся в стадии изучения. Ранее было установлено, что супероксид-анион образуется при взаимодействии аппрессориев неспециали-

зированных ржавчинных грибов *Puccinia triticina* Erikss. с овсом, а также *P. coronata* с мягкой пшеницей [6]. Значение $O_2^{\bullet-}$ во взаимодействии *P. triticina* с другими устойчивыми видами не исследовано достаточно.

В связи с этим целью работы было определение значения супероксид-аниона $O_2^{\bullet-}$ в устойчивости образца *T. timopheevii* и интрогрессивных линий с ее генами к бурой ржавчине.

Объектом исследований были образец вида *T. timopheevii* к-47793, созданный в Федеральном исследовательском центре Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР им. Н.И. Вавилова), а также интрогрессивные линии АНК-37А, АНК-37В, АНК-37С, созданные в Институте цитологии и генетики (ИЦиГ) РАН. Известно, что местные стародавние сорта представляют собой популяции, полиморфные по различным признакам, включая устойчивость к заболеваниям. Образец к-47793 был получен путем отбора растений по устойчивости к ржавчинным болезням. Для сравнения результатов в опытах использовали восприимчивый к бурой ржавчине сорт яровой мягкой пшеницы Памяти Азиева. Исследования проводили на растениях в стадии проростков.

В ходе экспериментов определяли тип реакции растений на заражение по 5-бальной шкале (0 – иммунитет, 1, 2 - устойчивость, 3-4 – восприимчивость) [3]. Содержание $O_2^{\bullet-}$ определяли акцепторным методом по превращению адреналина в адренохром [1]. Локализацию супероксид-аниона в тканях выявляли путем витального окрашивания листьев 0,1 %-ым водным раствором нитросинего тетразолия (НСТ), который образовывал нерастворимое синее соединение в присутствии $O_2^{\bullet-}$ [7]. В тех же листьях после фиксации лактофенольной смесью и окраски анилиновым синим изучали развитие инфекционных структур патогена.

На листьях восприимчивого сорта мягкой пшеницы в тканях развивался мицелий с большим числом гаусторий, а через 10 сут п/ин формировались большие пустулы, признаков несовместимости не наблюдалось (балл 4). Часть растений (70 %) образца к-47793 были устойчивы (балл 1-2), на их листьях гриб формировал мелкие пустулы, размерами в 3-4 раза меньше, чем на мягкой пшенице, окруженные некротической тканью, остальные были иммунны (балл 0), на их листьях наблюдались только мелкие некротические пятна. Ранее, было

показано, что другие образцы *T. timopheevii* полиморфны по устойчивости к западносибирской популяции гриба на ювенильной стадии развития, в них встречались как иммунные, так и восприимчивые растения [8]. Растения образца к-47793 проявили меньшие различия по устойчивости, чем ранее исследованные образцы к-38550 и к-30920 [9] что, вероятно, определяется большей генетической однородностью, связанной с отбором растений, проведенным учеными ВИР.

Определение содержания супероксид-аниона в тканях растений показало, что во всех листьях, независимо от образца и заражения присутствовал супероксид-анион в фоновом содержании 1,8-1,9 мкмоль/г сырого веса. В листьях мягкой пшеницы инокуляция не вызывала достоверного изменения

$O_2^{\bullet}$, а в образце к-47793 слабое увеличение до 2,1-2,2 мкмоль/г сырого веса отмечен через 0,5 - 2 сут после инокуляции. В то же время наибольшее содержание $O_2^{\bullet-}$ образовывалось в тканях АНК-37А и АНК-37С после заражения авирулентным клоном. Отмечен пик накопления супероксид-аниона через 0,5 сут после инокуляции, достигавший 3,4-3,8 мкмоль/г сырого веса.

Причина различий была выявлена после локализации $O_2^{\bullet-}$ в тканях растений и изучения особенностей развития патогена. На листьях образца к-47793 небольшая часть инокулюма останавливалась на поверхности листьев, на этапе контакта с устьицами, после внедрения в единичные клетки, но основная часть прекращала развитие на стадии мелких колоний с единичными гаусториями, в редких случаях образовывались мелкие пустулы, окруженные зонами некроза (рисунок).

Через 0,5 суток после инокуляции на образце к-47793 и на иммунных линиях пшеницы массово образовывались аппрессории, при этом на иммунных линиях АНК-37А и АНК-37С все аппрессории погибали, а на образце к-47793 погибала часть аппрессориев. В местах контакта аппрессориев с устьицами генерировался $O_2^{\bullet-}$. Ранее было показано, что в западносибирской популяции появлялись изоляты, которые сочетали разные гены вирулентности к линиям АНК. Эти результаты свидетельствуют о том, что у пшеницы Тимофеева по крайней мере 2 гена определяют узнавание патогена на этапе контакта с устьицами и проявляются на той же стадии, что и в других иммунных видах [6]. Дополнительно в образце к-47793 был выявлен $O_2^{\bullet-}$ при от-

мирании клеток в результате реакции сверхчувствительности. В тоже время в тканях линии АНК-37В в более медленно отмирающих клетках $O_2^{\bullet-}$ не установлен. Это свидетельствует об особенностях действии интрогрессированных генов устойчивости *T. timopheevii.*

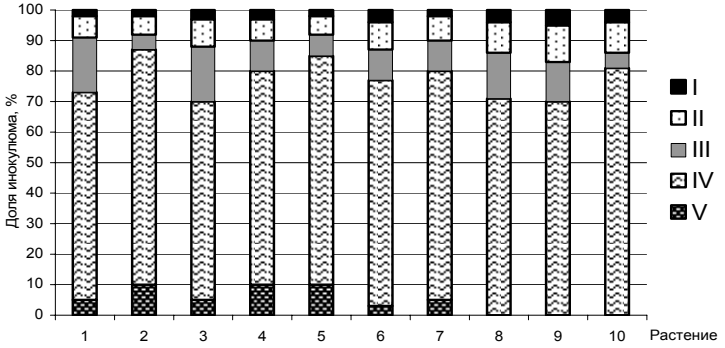


Рисунок. Соотношение инокулюма, погибшего при разных вариантах взаимодействия P. triticina с образцом T. timopheevii к-47793. Варианты: I – остановка на стадии ростковой трубки, II – прекращение развития на стадии аппрессория/ подустьичной везикулы, III – гибель колоний с проявлением реакции СВЧ, IV – гибель колоний без СВЧ, V – колонии с пустулами.

Таким образом, выявлено повышение уровня супероксид-аниона в листьях *T. timopheevii* на ранних этапах патогенеза через 0,5 – 1сут п/ин. Генерация $O_2^{\bullet-}$ коррелировала с отмиранием части аппрессориев на устьицах, а также проявлялась в некоторых вариантах взаимодействия, сопровождающихся реакцией СВЧ.

1. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R. and Bolwell G.P. // Early Signalling Events in the Apoplastic Oxidative Burst in Suspension Cultured French Bean Cells Involve cAMP and Ca^{2+} // New Phytologist. 2001. V. 151. P. 185–194.

2. Вавилов Н.И. Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям // Избранные сочинения, 1986 – Т.4. – М. Наука. – 520 с.

3. Mains E. B., Jackson H.S. Physiological specialization in the leaf rust wheat *Puccinia triticina* Erikss.// Phytopathology, 1926. – V.16. – № 1. – P. 89–95

4. Максимов И.В., Сорокань А.В., Черепанова Е.А., Сурина О.Б., Трошина Н.Б., Яруллина Л.Г. Влияние салициловой и жасмоновой кислот на компоненты про-/ антиоксидантной системы в растениях картофеля при фитофторозе // Физиология растений, 2011. Т. 58. С. 243–251.

5. Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиология растений, 2003. –Т. 50. – № 3. – С. 459-464.

6. Плотникова Л.Я. Влияние поверхностных свойств и физиологических реакций растений-нехозяев на развитие клеточных структур ржавчинных грибов // Цитология, 2008. – Т. 50. - №5. – С. 439-446

7. Плотникова Л.Я., Мешкова Л.В. Эволюция цитофизиологических взаимоотношений возбудителя бурой ржавчины и пшеницы при преодолении устойчивости, детерминированной геном Lr19 // Микология и фитопатология, 2009. – Т. 43. – Вып. 4. – С. 63–77.

8. Плотникова Л.Я., Пожерукова В.Е., Митрофанова О.П., Дегтярев А.И. Цитологические аспекты адаптации возбудителя бурой ржавчины *Puccinia triticina* к виду *Triticum timopheevii* Zhuk. // Третий Всероссийский съезд по защите растений. Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем: материалы съезда в трех томах. – СПб., 2013. – С. 444-446.

9. Пожерукова В. Е., Плотникова Л. Я., Дегтярев А.И. Устойчивость пшеницы Тимофеева к бурой ржавчине определяется генерацией активных форм кислорода и подавлением образования гаусторий гриба *Puccinia triticina* // Фундаментальные исследования, 2015. – №2 (часть 2). – С. 285-292.

УЧАСТИЕ КАЛИЯ В РЕГУЛЯЦИИ АВТОФАГИИ У *Arabidopsis thaliana* В НОРМЕ И ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ

К.К. Рабаданова[1], Е.В. Тютерева[1], К.С. Добрякова[1], В.В. Демидчик[1,2], О.В. Войцеховская[1]

[1]ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: CRabadanova@binran.ru

[2] Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

В ответ на поступление питательных элементов в эукариотической клетке активируются анаболические процессы, а также программы пролиферации и клеточного роста. Одним из ключевых регуляторов, реагирующих на оптимальные концентрации питательных веществ, выступает TOR-киназа (mTOR, mammalian/mechanistic target of rapamycin) – высококонсервативная серин-треониновая протеинкиназа эукариот [1-4]. Хорошо известно, что достаточное снабжение клетки, в первую очередь, глюкозой и аминокислотами, активирует TOR-киназу, а через нее запускает такие процессы, как анаболические реакции, деление и рост клеток. Более того, TOR-киназа является важным регулятором автофагии – процесса утилизации повреждённых компонентов клетки и рециклирования макромолекул. Как для животной, так и для растительной клетки показана негативная регуляция автофагии TOR-киназой [4]. При недостатке питательных веществ, в частности, азота и углерода, активность TOR-киназы снижается, что приводит к запуску автофагии, утилизации «второстепенных» клеточных структур и высвобождению макромолекул и энергии, необходимых для выживания клетки. Ключевым посредником при запуске стресс-индуцированной автофагии служит белок ATG13 [2, 5]. Блокатором TOR-киназы является рапамицин [6, 9].

Калий – один из важнейших макроэлементов, который, наряду с азотом, углеродом и др., необходим для жизнедеятельности эукариотической клетки. Однако, пока неизвестно, может ли уровень клеточного калия влиять на запуск ана- и катаболических программ клетки аналогично тому, как влияет доступность углерода и азота (углеводов и аминокислот). Ранее на модели нокаутных линий *Arabidopsis thaliana gork1-1* со сниженной активностью наружу-выпрямляющих K^+-каналов GORK и, следовательно, увеличением задержки калия в цитоплазме клеток корня, была установлена положительная взаимосвязь между потерей калия клетками, индукцией автофагии и запуском программы клеточной гибели при солевом стрессе [7, 8].

В данной работе исследовалось влияние недостатка калия в среде выращивания на активность одного из ключевых регуляторов в растительной клетке - TOR-киназы. Кроме того, на модели инсерционных мутантов *atg* по ключевым автофагическим генам изучали роль автофагии в запуске программированной клеточной смерти (ПКС), вызванной потерей калия из клеток корня при солевом стрессе.

Определение активности TOR-киназы *in vivo* представляет собой сложную задачу. Для растений существует пока только один пример решения этой задачи, при этом использовались линии *Arabidopsis thaliana* со сверхэкпрессией одного из субстратов данного фермента – белка S6-киназы (S6K), меченного тегом FLAG, с целью последующей детекции фосфорилированной и нефосфорилированной форм S6K с помощью антител [9]. В данной работе использовали ту же систему; растения арабидопсис со сверхэкспрессией *S6K* были любезно предоставлены Dr. Jen Sheen (Гарвард, США). Для экспериментов 10-12-дневные проростки выращивались в условиях недостатка калия (0,01 мМ K^+) либо в нормальных условиях (2 мМ K^+). В качестве положительного контроля активации TOR-киназы в среду добавляли глюкозу (30 мМ), а инкубация растений в течение 24 ч. в 10 мкМ растворе рапамицина [9] использовалась как отрицательный контроль. Содержание тотального и фосфорилированного белка S6K оценивалось методом иммуноблоттинга с использованием антител, специфичных либо к FLAG, либо к Phospho-Thr449-S6K. Такие же антитела использовали в работе [9].

Исследование роли автофагии в активации вызванной потерей клеточного калия ПКС проводилось на инсерционных мутантах по генам автофагии *atg5 (CS39993), atg10 (CS39994), atg13 (SALK_065240C* и *SALK_011672C).* Линии *CS39993* и *CS39994* являются гомозиготами по генам *atg5* и *atg10* соответственно [10, 11]. Для проверки гомозиготности линий *atg13* проводили ПЦР с помощью специфичных праймеров к целевому гену и к Т-ДНК [12]. В ходе эксперимента 10-дневные проростки мутантных линий помещались в условия засоления (50 мМ NaCl), вызывающие выход K^+ из клеток; кроме того, к раствору добавляли блокаторы калиевых каналов: ионы тетраэтиламмония (TEA^+) и Ba^{2+}. Интенсивность процессов ПКС *in vivo* оценивалась с помощью световой микроскопии; активность автофагии−с применением флуоресцирующего красителя для автофагосом монодансилкадаверина [13].

В докладе будут представлены результаты проведенных исследований. Исследование поддержано РНФ (грант №15-14-30008). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург) и Ре-

сурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

1. Булгакова О.В, Киян В.С., Берсимбай Р. И. Регуляция физиологических функций TOR сигнальной системой в *Arabidopsis thaliana* // *Вестник ЕНУ им. Л.Н. Гумилева,* 2012, №4.

2. Рябовол В.В. Характеристика морфологических, биохимических и молекулярных признаков аутофагии в корнях *Triticum aestivum* при стрессе: дис. на соискание учёной степени степени канд. биол. наук: 03.01.05: защищена 23.12.13. Казань: Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 2014. 150 с.

3. Liu Y., Bassham D.C. TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana* // *PLoS ONE,* 2010. 5(7): e11883.

4. Chang Y.-Y., Neufeld T.P. An Atg1/Atg13 Complex with multiple Roles in TOR-mediated autophagy regulation // *Molecular Biology of the Cell,* 2009. Vol. 20, pp. 2004–2014.

5. Alers S., Sebastian Wesselborg S., Stork B. ATG13: Just a companion, or an executor of the autophagic program? // *Autophagy,* 2014. 10:6, pp. 944-956.

6. Yip1 C.K., Murata K., Walz T.,3, Sabatini D.M., Kang S.A. Structure of the human mTOR Complex I and its implications for rapamycin inhibition // *Mol Cell*, 2010. 38(5), pp. 768–774.

7. Demidchik V., Cuin T.A., Svistunenko D., Smith S.J., Miller A.J., Shabala S., Sokolik A., Yurin V. *Arabidopsis* root K^+ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death // *Journal of cell science*. 2010. Vol. 123. P. 1468-1479.

8. Demidchik V., Tyutereva E.V., Voitsekhovskaja O.V. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses// *Functional Plant Biol*, 2017. in press

9. Xiong Y., Sheen J. Rapamycine and Glucose-Target of rapamycine (TOR) protein signaling in plants // *Journal of biological chemistry,* 2012. Vol. 287, No. 4, pp. 2836–284.

10. Thompson A.R., Doelling J.H., Suttangkakul A., Vierstra R.D. Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways // *Plant Physiology*, 2005. Vol 138, No. 4, pp. 2097–2110.

11. Phillips A.R., Suttangkakul A. and Vierstra R.D. The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. // *Genetics,* 2008. Vol. 178, pp. 1339-1353.

12. Alonso M.J. et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* // *Science*, 2003. Vol. 301, No. 8, pp. 653−657.

13. Contento A.L., Xiong Y., Bassham D.C. Visualization of autophagy in Arabidopsis using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein // *Plant journal*, 2005. Vol. 42, pp. 598–608.

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И ЭКСПРЕССИЮ КОДИРУЮЩИХ ЕЕ ГЕНОВ У РАСТЕНИЙ ОГУРЦА ПРИ ДЕЙСТВИИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

Н.С. Репкина, В.В. Таланова, А.А. Игнатенко

ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия; e-mail: nrt9@ya.ru

Важную роль в формировании устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды играют фитогормоны, в том числе салициловая кислота (СК) [1]. Большое количество работ свидетельствует об участии этой сигнальной молекулы в устойчивости растений к биотическим стрессам, в то время как подобного рода сведений о ее роли в повышении устойчивости к абиотическим факторам значительно меньше [2]. Считается, что один из механизмов повышения устойчивости к абиотическим стрессам связан с влиянием СК на активность антиоксидантных ферментов, что препятствует развитию окислительного стресса и способствует защите клеток от повреждений, вызываемых активными формами кислорода (АФК) [2].

К ключевым антиоксидантным ферментам относится супероксиддисмутаза (СОД) [3]. Данный фермент катализирует реакцию диспропорционирования супероксидных анион-радикалов до молекулярного кислорода и пероксида водорода [4]. Одной из особенностей растительной СОД является множественность изозимов разных форм СОД, количество которых видоспецифично. Например, в ли-

стьях огурца Cu/Zn-СОД представлена 2-мя изоформами, Mn-СОД – 4-мя, тогда как изоформы Fe-СОД не обнаружены. Известно, что стресс-факторы разной природы способны активировать и/или ингибировать активность СОД, что свидетельствует о неоднозначности ответной реакции антиоксидантной системы на стрессовое воздействие, которая может различаться в зависимости от его продолжительности и интенсивности.

Учитывая вышеизложенное, целью данной работы явилось изучение влияния салициловой кислоты на активность супероксиддисмутазы и кодирующих ее генов (*Cu/Zn-SOD* и *MnSOD*) у огурца при низкотемпературном воздействии разной интенсивности.

В качестве объекта исследования использовали проростки огурца (*Cucumis sativus* L.) гибрида F1 Зозуля. Растения выращивали на питательном растворе с добавлением микроэлементов в климатической камере. По достижении недельного возраста проростки подвергали действию низких температур 12°С или 4°С в течение 72 ч. Экзогенную обработку проростков СК (100 мкМ) проводили за 24 ч до воздействия низкой температуры. Контролем служили не обработанные СК растения. Проницаемость мембран клеток определяли кондуктометрически по выходу электролитов из высечек листьев огурца [5]. Активность СОД оценивали спектрофотометрически [6]. Накопление транскриптов генов (*Cu/Zn-SOD* и *MnSOD*) в листьях огурца анализировали методом ПЦР в режиме реального времени.

В ходе исследований установлено, что температура 12°С приводит к небольшому обратимому повышению выхода электролитов из семядольных листьев проростков огурца через сутки от начала воздействия (Табл. 1). В отличие от этого при температуре 4°С выход электролитов из клеток листьев огурца увеличивался через 1 сутки примерно в 4 раза, а через 3-е суток – в 7 раз. Важно отметить, что экзогенная обработка салициловой кислотой способствовала снижению выхода электролитов из клеток листьев как при 12, так и 4°С (Табл. 1). В частности, уже через 1 сут действия низких температур уровень выхода электролитов был ниже у растений, подвергнутых обработке СК, чем у растений без обработки. При увеличении продолжительности низкотемпературного воздействия до 3 суток этот эффект салициловой кислоты усиливался.

Таблица 1

Влияние СК (100 мкМ) на выход электролитов (% от полного выхода) из клеток семядольных листьев проростков огурца при действии низких температур

Температура, °С	Концентрация СК, мкМ	Экспозиция, ч		
		0	24	72
12	0	12,81±0,50	18,94±0,74*	14,81±0,52*
	100	14,53±0,57	15,80±0,35*	13,50±0,18
4	0	12,81±0,50	52,39±1,45*	87,64±1,66*
	100	14,53±0,57	45,16±1,69*	77,85±1,75*

**различия с исходным уровнем достоверны при $P \leq 0.05$.*

Установлено, что температуры 12 и 4°С оказывают разное влияние на активность СОД в листьях огурца. В частности, действие температуры 12°С приводило к повышению активности СОД на протяжении 3 суток, тогда как температура 4°С в начальный период действия (1–5 ч) повышала активность СОД, однако уже через 1 сутки вызывала ее снижение.

Обработка проростков огурца салициловой кислотой оказывала положительное влияние на активность СОД. Так, 1-суточная предобработка СК еще до начала действия низкой температуры приводила к повышению активности фермента, при температуре 12°С происходило ее дальнейшее увеличение в течение 3 суток. Обработка СК также способствовала повышению активности СОД как в начальный период (1–5 ч) действия температуры 4°С, так и при более длительном (1–3 суток) ее действии.

Экзогенная обработка СК в течение 1 суток в условиях действия нормальной температуры (22°С) приводила к небольшому повышению экспрессии генов *Cu/Zn-SOD* и *MnSOD* в листьях проростков огурца. В дальнейшем при температуре 12°С предобработка СК вызывала повышение уровня мРНК генов *Cu/Zn-SOD* и *MnSOD* через 1 и 3 суток (рис. 5). СК также способствовала значительному накоплению мРНК генов *Cu/Zn-SOD* и *MnSOD* через 1 сут воздействия температуры 4°С, тем самым нивелировала ее отрицательный эффект на экспрессию гена *MnSOD*.

На основании полученных данных можно заключить, что экзогенная обработка салициловой кислотой приводит к повышению холодоустойчивости проростков огурца и активности фермента СОД, а

также к накоплению транскриптов генов *Cu/Zn-SOD* и *MnSOD* в листьях в условиях действия низких температур. Сделан вывод о том, что СК играет важную роль в регуляции активности СОД, способствуя повышению устойчивости к гипотермии. Таким образом, активизация СОД может быть ключевым процессом в формировании индуцированной салициловой кислотой устойчивости растений огурца к низким температурам.

1. Hayat Q., Hayat S., Irfan M., Ahmad A. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review // Environ. Exp. Bot. 2010. Vol. 68. P. 14–25.

2. Pal R.S., Agrawal P., Bhatt J.C. Molecular approach towards the understanding of defensive systems against oxidative stress on plant: A critical review // J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2013. Vol. 22. P. 131–138.

3. Miller A-F. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights // FEBS Letters. 2012. Vol. 586. P. 585–595.

4. Dinakar C., Djilianov D., Bartels D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense // Plant Sci. 2012. Vol. 182. P. 29–41.

5. Гришенкова Н.Н., Лукаткин А.С. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода // Поволжский экологический журнал. 2005. № 1. С. 3–11.

6. Beauchamp Ch., Fridovich I. Superoxide Dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. Vol. 44. P. 276–287.

РОЛЬ АФК И ФЕРМЕНТОВ ПРО-/АНТИОКСИДАНТ-НОЙ СИСТЕМЫ В РАЗВИТИИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К ЗЛАКОВОЙ ТЛЕ *Schizaphis graminum*

Румянцев С.Д., Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В.

ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия; e-mail: Rumyantsev-Serg@mail.ru

Одним из основных вредителей пшеницы, ухудшающим качество урожая, считается злаковая тля (*Aphididae*), в частности наиболее

распространенный на территории России вид - обыкновенная злаковая тля (*Schizaphis graminum*). Отличительной особенностью тлей, заключающейся в их типе питания, является минимальное нанесение повреждений растению, и, как следствие, вместо классической ответной реакции на поранение индуцируется защитный ответ как при инфицировании патогенами [1]. Элиситоры тлей, содержащиеся в их слюне, могут вызывать неспецифическую защитную реакцию в растениях на транскриптомном и протеомном уровнях, вовлекая гены и белки связанные с сигнальными путями салициловой и жасмоновой кислот, окислительным стрессом, засухой, поранением и инфицированием патогенами [2]. Однако слюна тлей содержит также свободные аминокислоты, ферменты, такие как 1,4-глюкозидазы, пектиназы, целлюлазы, полифенолоксидазы, пероксидазы и липазы, которые предположительно, могут ослаблять иммунную систему растений и поддерживать благоприятные условия для кормления тлей, уменьшая оксидативный стресс, осуществляя детоксикацию фенольных соединений и предотвращая накопление каллозы [3]. Кроме того, многочисленные работы показывают, что колюще-сосущие насекомые, питающиеся флоэмным соком, вызывают изменения в метаболизме хлоропластов, резко снижают фотосинтетическую активность, уменьшают содержания хлорофилла и каротиноидов у восприимчивых линий растений [4]. Все эти процессы оказывают влияние на другие функции листа, в том числе генерацию активных форм кислорода (АФК), имеющую большое значение в защите растений от тлей [2, 4, 5].

Хотя биохимические механизмы устойчивости к злаковой тле еще до конца не изучены, «окислительный взрыв» в месте инфицирования считается типичной реакцией устойчивости к тле [5]. Неоднократно было показано, что вовлечение H_2O_2 с участием пероксидаз в реорганизацию и укрепление клеточной стенки играет решающую роль в развитии устойчивости растений к колюще-сосущим насекомым [2, 4, 6]. Кроме того, индуцированное накопление H_2O_2 у устойчивых к тлям форм растений было связано, как с сигнальной функцией H_2O_2 и активацией ей экспрессии защитных генов, так и с прямым токсическим эффектом H_2O_2, вызывающим повреждения у тлей [2]. Напротив, поддержание более высокого уровня антиоксидантов у восприимчивых фенотипов растений, возможно, было связано с ос-

лаблением защиты против колюще-сосущих насекомых [4]. Предполагается, что у устойчивого фенотипа должны присутствовать механизмы сводящие ущерб от повышенной генерации АФК к минимуму, через синтез фенольных соединений и лигнификацию клеточной стенки, поддерживающие защитный ответ и в то же время поддерживающие фотосинтез для компенсации потерь питательных веществ при кормлении насекомых флоэмным соком [4]. Однако взаимосвязь этих процессов в растениях при инфицировании тлями изучена недостаточно.

В данной работе было изучено влияние обыкновенной злаковой тли (*S. graminum*) на показатели про/-антиоксидантной системы и рост листьев у двух контрастных по устойчивости сортов пшеницы Жница и Омская 35 (Ом35), а также проведен тест на антибиоз как показатель толерантности сорта.

Наши результаты показали, что особи тли, питающиеся на двух различных сортах, имели разные показатели плодовитости и смертности (табл.). У тлей, питающихся на сорте Жница, показатели смертности были низкие, при этом выносливость растений этого сорта также была невысокой – скорость роста листьев уменьшалась почти в 2 раза по сравнению с контролем (табл.). У тлей, питающихся на сорте Ом35, процент смертности был в 2 раза выше по сравнению с сортом Жница (табл. 1). При этом скорость роста 1ого листа снижалась всего на 16,7% по сравнению с контролем (табл.). Таким образом, можно заключить, что сорт Жница является восприимчивым, а сорт Ом35 – толерантным (устойчивым) по отношению к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*.

Таблица

Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на рост листьев у растений пшеницы и показатели смертности и плодовитости тлей, питающихся на разных сортах

	Смертность, %	Плодовитость, %	Прирост 1ого листа, % от контроля	Прирост 2ого листа, % от контроля
Восприимчивый сорт - Жница	7,6±0,5	92,4±2,8	65,7±5,6	43,5±1,4
Устойчивый сорт – Омская 35	17,1±1,6	82,9±2,6	83,3±5,8	53,8±3,2

Одним из важных показателей толерантности сорта является редокс-статус растения, инфицированного тлей [2, 4, 7]. В наших экспериментах устойчивый сорт Ом35 отличала интенсивная генерация H_2O_2, более быстрая и повышенная активность пероксидазы и ингибирование активности каталазы в течение всего эксперимента (рис.). У восприимчивого сорта Жница было обнаружено снижение содержания H_2O_2 и повышение активности каталазы, активность пероксидазы незначительно повышалась только на 6-ые и 10-е сутки эксперимента (рис.). Данные наших опытов в целом соответствуют результатам аналогичных исследований, полученным на растениях ячменя, инфицированных *Diuraphis noxia*, где у устойчивых форм ячменя в отличие от восприимчивых был обнаружен «окислительный взрыв», приводивший к развитию СВЧ-реакции [7].

Обнаруженное нами снижение активности каталазы у устойчивого сорта Ом35, скорее всего, позволяло растениям накапливать H_2O_2, что соответствует данным литературы [8]. Напротив, повышение активности этого фермента у восприимчивого сорта Жница приводило к снижению содержания H_2O_2 в инфицированных растениях. Результаты многих работ показывают, что, как и в других системах, растение-насекомое, тли могут выделять антиоксидантные ферменты для детоксикации АФК и уменьшения окислительного стресса [7].

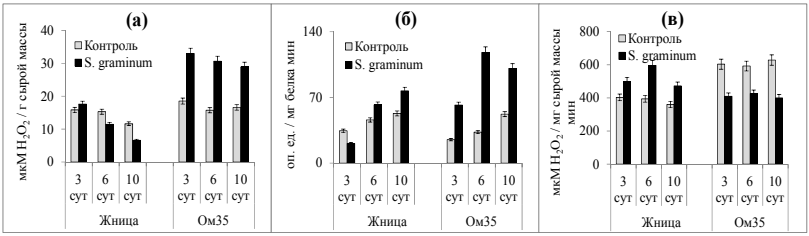


Рисунок. Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на содержание перекиси водорода (а), активность пероксидазы (б) и активность каталазы (в) у контрастных по устойчивости сортов пшеницы.

Стоит обратить внимание, что у обоих сортов повышение активности пероксидазы следовало после увеличения генерации H_2O_2 (рис.), что соответствует литературным данным [9]. Это предполагает, что увеличение активности растворимых пероксидаз было следствием «окислительного взрыва» и, по-видимому, указывает на то, что

накопление H_2O_2 могло служить началом каскада событий, который запускал физиологический и молекулярный ответ растений после атаки насекомыми. Однако у восприимчивого сорта Жница накопление H_2O_2 было небольшим и транзиторным, что, по-видимому, не позволило растениям этого сорта развить защитные реакции. Таким образом, наши результаты предполагают, что более высокая активность пероксидаз у устойчивого сорта Ом35 позволяла растениям свести ущерб от повышенного содержания H_2O_2 к минимуму, скорее всего за счет вовлечения H_2O_2 в синтез фенольных соединений и лигнина [2, 6].

1 Guan W., Ferry N., Edwards M.G., Othman H., Gatehouse A.M.R. Proteomic analysis shows that stress response proteins are significantly up-regulated in resistant diploid wheat (*Triticum monococcum*) in response to attack by the grain aphid (*Sitobion avenae*) // Mol Breed. 2015. V. 35. P. 57.

2 Morkunas I., Mai V.C., Gabrys B. Phytohormonal signaling in plant responses to aphid feeding // Acta Physiol. Plant. 2011. V. 33. P. 2057–2073.

3 Moran P.J., Cheng Y., Cassell J.L., Thompson G.A. Gene expression profiling of Arabidopsis thaliana in compatible plant-aphid interactions // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 2002. V. 51. P. 182–203.

4 Koch K.G., Chapman K., Louis J., Heng-Moss T., Sarath G. Plant Tolerance: A Unique Approach to Control Hemipteran Pests // Front. Plant Sci. 2016. 7:1363.

5 Moloia M.J., van der Westhuizen A.J. The reactive oxygen species are involved in resistance responses of wheat to the Russian wheat aphid // Journal of Plant Physiology. 2006. V. 163. P. 1118—1125.

6 Park S.J., Huang Y., Ayoubi P. Identification of expression profiles of sorghum genes in response to greenbug phloemfeeding using cDNA subtraction and microarray analysis // Planta. 2006.V. 223. P. 932–947.

7 Lei J., Zhu- Salzman K. Enhanced aphid detoxification when confronted by a host with elevated ROS production // Plant Signaling & Behavior. 2015. V. 10. 4, e1010936

8 Zhu-Salzman K., Salzman R.A., Ahn J.E., Koiwa H. Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding

aphid // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 420–431.

9 Argandona V.H., Chaman M., Cardemil L., Munoz O., Zuniga G.E., Corcuera L.J. Ethylene production and peroxidase activity in aphid-infested barley // J. Chem. Ecol. 2001. V. 27. P. 53–68.

ЗАМЕНА АМИНОКИСЛОТЫ ЦИСТЕИН-151 В K^+-КАНАЛЕ GORK ПОДАВЛЯЕТ ВЫХОД K^+ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ И СНИЖАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *Arabidopsis thaliana* К H_2O_2

В.В. Самохина[1], В.С. Мацкевич[1], К.С. Добрякова[2], Е.В. Тютерева[2], П.В. Чикун[1], И.Ю. Новосельский[1], А.М. Малышева[1], А.И. Соколик[1], О.В. Войцеховская[2], В.В. Демидчик[1,2]

[1]Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь; e-mail: dzemidchyk@bsu.by

[2]Ботанический Институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

АФК играют важные роли в таких физиологических процессах в растении, как стрессовые и гормональные ответы, рост и развитие, гравитропическая реакция, контроль минерального обмена и др. [1]. При стрессе АФК накапливаются во внеклеточном пространстве, где антиоксидантная активность ниже, чем в цитоплазме или органеллах клетки [1]. В результате внеклеточные АФК выступают ключевым «усилителем» и посредником стрессовых реакций, кодируя их качественные и количественные показатели.

Одновременно с синтезом АФК у растений наблюдается выход из клеток K^+ [2]. После органогенов калий является наиболее обильным элементом в растительной клетке, вовлеченным в широкий спектр метаболических превращений и регуляторных взаимодействий [2]. Данный металл играет роль ключевого генератора осмотических, химических и электрических градиентов в растительной клетке. В сельскохозяйственной практике калий используется как средство борьбы со стрессами, главным образом, засолением [3].

Большинство работ в области изучения калиевого обмена у растений направлены на установление структуры и механизмов функ-

ционирования систем поглощения калия клетками. В то же время, системы, обеспечивающие наружу-направленный поток этого катиона, т.е. его выход из клеток, остаются практически неизученными [4]. Недавние работы наших лабораторий и других авторов показали, что выход K^+ из клеток корня опосредуется активностью наружу-выпрямляющих K^+-каналов, кодируемых геном GORK [1, 2, 4, 5]. Стрессы активируют канал GORK и усиливают отток из клеток корня калия, что приводит к индукции запрограммированной клеточной гибели, ионному дисбалансу и возможно к снижению конститутивного уровня анаболических реакций [1, 2, 4, 5]. Исследование структуры K^+-канала GORK показало его аналогию с K^+-каналом SKOR, который экспрессируется в центральном цилиндре корня и отвечает за загрузку K^+ в сосуды ксилемы для нужд минерального питания [6]. Для SKOR продемонстрировано наличие АФК-чувствительного центра, непосредственно инкорпорированного в молекулу канала и ответственного за его активацию под действием экзогенных АФК [6]. Схожий центр выявлен нами в канале GORK, экспрессирующемся в клетках корневого эпидермиса и коры. Ключевой АФК-чувствительной аминокислотой данного центра является цистеин по положению 151 (Цис-151). Его замена или устранение потенциально может приводить к изменению как транспортных свойств мембраны, так и к модификации общей чувствительности клеток корня к АФК.

Целью настоящей работы являлось выявление изменений в конститутивном и стресс-индуцированном выходящем потоке K^+ при замене Цис-151 (англ.: C151) на серин (англ.: C151S) у растений *Arabidopsis thaliana* L. Heynh (арабидопсис). Также было исследовано, каким образом данная замена отражается на росте корневой системы в контроле и в присутствие различных уровней H_2O_2.

Объектом исследования являлись корни проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh четырех линий: 1) дикий тип Wassilevskija – ‘WS-0’; 2) нокаутные мутанты *gork1-1*, лишенные функционального белка GORK, кодирующего наружу-выпрямляющий K^+-канал; 3) *gork1-1* с возмещенным нативным GORK; 4) *gork1-1*, экспрессирующий GORK с заменой C151S. Данные линии были любезно предоставлены группой профессора Инго Дреера (Университет Тальки, Чили). Наличие модифицированных транскриптов, а также уровень экспрессии линий GORK, были верифицированы с помощью оригинальных праймеров

и методики количественного ПЦР-анализа. Все линии культивировались в стерильной «вертикальной» культуре на гелевой среде, содержащей 100% солей по стандартной прописи Мурашиге и Скуга с витаминами, 0,25% фитагеля, 1% сахарозы (pH 6) [5]. Для ростового теста культура целых растений выращивалась полные 4 сут. Затем производилась замена части среды (от уровня кончиков корней). Регистрировался ежедневный прирост главного корня. В работе был использован трейсер K^+ – $^{86}Rb^+$ в форме хлорида (POLATOM; Польша). Проростки закреплялись в специальных держателях и погружались в раствор следующего состава (мМ): 0,1 KCl, 0,1 $CaCl_2$, pH 6,0, 2 Трис / 4 Мес, содержащий $^{86}Rb^+$. В течение 30 мин проростки загружались $^{86}Rb^+$, после чего переносились в раствор без изотопа. Остаточная активность проростков измерялась через определенные интервалы времени при помощи β-радиометра, имеющего увеличенный детектор (5 см / 7 см), на который помещались корни. Через 5 мин с момента начала регистрации выхода $^{86}Rb^+$ производилась обработка 10 мМ H_2O_2. По окончании эксперимента измерялась масса тестируемых корней и вычислялась удельная активность $^{86}Rb^+$, на основе чего производился расчет кинетических параметров выхода $^{86}Rb^+$ из корней.

Анализ выходящего потока $^{86}Rb^+$ продемонстрировал наличие 3 фаз: 1) быстрая фаза (до 5 мин); 2) первая медленная фаза (до 10 мин); 3) вторая медленная фаза (до 25 мин). Быстрая фаза соответствовала выходу $^{86}Rb^+$ из клеточной стенки (апопласт). Медленные фазы были связаны с выходом $^{86}Rb^+$ из клеток корня (т.н. выход из симпласта). Согласно литературным данным и нашим собственным исследованиям первая медленная фаза соответствовала выходу $^{86}Rb^+$ из цитоплазмы. Фокус нашей работы был направлен на данную «цитоплазматическую» фазу. Для нее рассчитывалась скорость выхода $^{86}Rb^+$ в контроле и после обработки 10 мМ H_2O_2.

Было показано, что в присутствие H_2O_2 у растений дикого типа выход $^{86}Rb^+$ ускорялся в 2,5-3 раза. Близкие значения увеличения скорости выхода изотопа были зарегистрированы в случае растений *gork1-1* с возмещенным GORK. В то же время, скорость H_2O_2-индуцируемого потока $^{86}Rb^+$ была в 2 раза ниже у нокаутов по K^+-каналу *gork1-1*, а также *gork1-1*, экспрессирующих GORK с заменой C151S. Эти данные свидетельствуют, что GORK напрямую вовлека-

ется в выход K^+ в ответ на H_2O_2. При этом сенсором H_2O_2 выступает функциональный Цис-151.

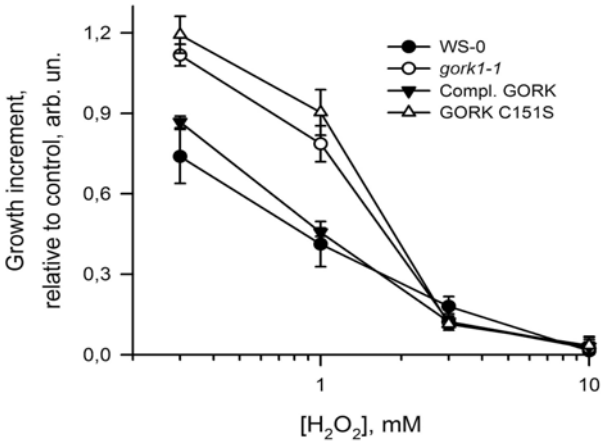


Рисунок. Зависимость длины основного корня молодых растений арабидопсиса различных генотипов от концентрации H_2O_2.

WS-0 – дикий тип; *gork1-1* – мутант, лишенный функционального K^+-канала GORK; compl. *gork1-1* – мутант без K^+-канала GORK с возмещением нативного GORK; GORK-C151S – мутант без K^+-канала GORK с возмещением GORK с заменой Цис-151 на серин. Представлены средние значения для 5 независимых опытов, в каждом из которых было проанализировано 15-20 растений (± S.D.).

В дальнейшем были проведены опыты по тестированию влияния H_2O_2, введенной в среду выращивания, на скорость роста корней вышеуказанных линий (Рис. 1). Растения изначально культивировались на среде без H_2O_2 в течение полных 4 сут, а затем среда на уровне ниже кончиков корней заменялась на среду с различным содержанием H_2O_2 (0,01-10 мМ). В течение последующих 6 сут регистрировалась прибавка длины основного корня (Рис. 1). Как можно видеть из данных, представленных на Рис. 1, H_2O_2 в концентрации 3-10 мМ вызывала почти полное угнетение прироста основного корня. В присутствие 0,3 и 1 мМ H_2O_2 прирост корня у растений дикого типа и растений *gork1-1* с возмещенным GORK статистически достоверно затормаживался (Рис.). В то же время, данный параметр оставался неизменным или слегка увеличивался у нокаутов по K^+-каналу *gork1-1*, а также у растений с заменой C151S (Рис. 1). Таким образом, замена

C151S способствовала не только снижению выброса K^+ под действием H_2O_2, но и подавлению ингибирующего эффекта H_2O_2 на рост основного корня. Примечательно, что 0,01 мМ H_2O_2 вызывало небольшую стимуляцию роста.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы: 1) H_2O_2 стимулирует выход K^+ из клеток корня арабидопсиса; 2) K^+-канал GORK опосредует индуцируемый H_2O_2 выход K^+ из корней арабидопсиса (так как нокаутные растения по данной транспортной системе демонстрируют замедление выхода $^{86}Rb^+$); 3) Цис-151 ответственен за активацию GORK под действием АФК и, соответственно, за АФК-индуцируемый выход K^+; он же, вероятно, участвует в ингибировании роста основного корня у растений дикого типа.

Данное исследование было поддержано Российским Научным Фондом (грант № 15-14-30008; руководитель: В.В. Демидчик).

1. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology // Environmental and experimental botany. 2015. Vol. 109. P. 212-228.

2. Demidchik V., Straltsova D., Medvedev S.S., Pozhvanov G.A., Sokolik A., Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K^+-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment // Journal of experimental botany. 2014. Vol. 65. P. 1259-1270.

3. Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance // Annual reviews of plant biology. 2008. Vol. 59. P. 651-681.

4. Demidchik V. Mechanisms and physiological roles of K^+ efflux from root cells // Journal of plant physiology. 2014. Vol. 171. P. 696-707.

5. Demidchik V., Cuin T.A., Svistunenko D., Smith S.J., Miller A.J., Shabala S., Sokolik A., Yurin V. *Arabidopsis* root K^+ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death // Journal of cell science. 2010. Vol. 123. P. 1468-1479.

6. Garcia-Mata C., Wang J., Gajdanowicz P., Gonzalez W., Hills A., Donald N., Riedelsberger J., Amtmann A., Dreyer I., Blatt M.R. A minimal cysteine motif required to activate the SKOR K^+ channel of *Arabidopsis* by the reactive oxygen species H_2O_2 // Journal of biological chemistry. 2010. Vol. 285. P. 29286–29294.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АЦИЛ-ЛИПИДНЫХ ДЕСАТУРАЗ У РАСТЕНИЙ *Arabidopsis thaliana* ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ ЗАКАЛИВАНИИ

А.А. Селиванов, О.В. Антипина, В.Н. Попов, И.Е. Мошков

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия; e-mail: aselivanov123@yandex.ru

Изучение устойчивости растений к гипотермии – одна из старейших проблем биологии растений. Принято, что при воздействии гипотермии основными повреждающими факторами являются: образование льда (в случае отрицательных температур), окислительный стресс, вызванный активными формами кислорода, и изменение текучести мембран. При снижении температуры мембраны переходят из жидкокристаллической фазы в фазу твердого геля, что нарушает их барьерные свойства и приводит, в конечном итоге, к гибели клетки [1]. Температура фазового перехода липидов мембран снижается при наличии в составе липидов жирных кислот с одной или несколькими двойными связями. За образование этих двойных связей ответственны ферменты десатуразы [2]. Десатуразы работают строго последовательно, продукт каждой реакции служит субстратом для последующей. Ферментативную активность десатураз померить непосредственно невозможно, но можно судить об этой активности по содержанию ненасыщенных жирных кислот липидов и – косвенно – по транскрипции соответствующих генов. В связи с этим целью нашей работы было выяснение особенностей экспрессии генов ацил-липидных десатураз жирных кислот при низкотемпературном закаливании растений *Arabidopsis thaliana.*

К настоящему времени в геноме арабидопсиса выявлено 24 гена десатураз и десатуразоподобных белков [3]. Мы сосредоточили внимание на ацил-липидных десатуразах в связи с тем, что данный тип десатураз ЖК подробно изучен у сине-зеленых водорослей, которые, по одной из теорий, в процессе эволюции стали симбиотическими предшественниками хлоропластов у эукариотических клеток. Для исследования были выбраны гены ADS2, FAD2, FAD3, FAD6, FAD7 и FAD8. Ген ADS2 относится к группе Δ9-десатураз, образующих первую двойную связь в молекулах ЖК, и в литературе имеются данные

об его активации при гипотермии. Группа Δ12-десатураз катализирует образование второй двойной связи и включает в себя гены FAD2 и FAD6. Группа ω3-десатураз катализирует образование третьей двойной связи в молекулах ЖК и состоит из генов FAD3, FAD7 и FAD8. Использованные в работе гены десатураз кодируют белки, полностью покрывающие схему десатурации ЖК.

Прежде всего, мы изучали изменение количества транскриптов в течение первых суток закаливания. Обнаружили рост содержания транскриптов уже на первые часы закаливания у гена ADS2, кодирующего Δ9-десатуразу, в несколько меньшей степени наблюдали рост содержания транскриптов генов FAD2 (Δ12-десатураза) и FAD7 (ω3-десатураза). Уровень содержания транскриптов генов FAD3 и FAD6 почти не изменялся, а у гена FAD8 транскрипционная активность практически отсутствовала. Транскрипцию трех генов (ADS2, FAD2, FAD7), для которых был выявлен рост содержания транскриптов, исследовали при помощи ПЦР в реальном времени. Содержание транскриптов гена ADS2 возрастало уже на первые сутки закаливания. Несколько позже, к концу периода закаливания и в меньшей степени, возрастала активность генов FAD2 и FAD7. Интересен не только сам факт роста содержания транскриптов генов десатураз, но и временная иерархия активации их транскрипции, соответствующая логике работы ферментов. Вначале наблюдается рост содержания транскриптов у гена, кодирующего, Δ9-десатуразу, катализирующую образование первой двойной связи в молекулах жирных кислот, служащих субстратом для работы Δ12- и ω3-десатураз, а затем активация транскрипции происходит у генов FAD2 и FAD7, кодирующих, соответственно, Δ12- и ω3-десатуразы.

По видимому, повышение содержания транскриптов генов десатураз приводит к увеличению содержания соответствующих белков, что в итоге должно отразиться на липидном составе клеточных мембран. В связи с этим мы исследовали количественное содержание и соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в хлоропластах листьев. Общее содержание жирных кислот в процессе закаливания увеличивается примерно на 50%. При этом изменяется содержание полиненасыщенных жирных кислот с 16 и 18 атомами углерода в ацильной цепи, что выражается в повышении индекса ненасыщенности с 1,756 до 1,909. Этот факт свидетельствует о повыше-

нии устойчивости мембранного аппарата к гипотермии.

Повышение содержания полиненасыщенных жирных кислот способствует поддержанию функционирования органелл клетки, в том числе и хлоропластов, при воздействии гипотермии, что в конечном итоге и приводит к формированию устойчивости растений арабидопсиса к гипотермии.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 16-34-00967 мол_а.

1. Lyons J.M. Chilling injury in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 1973. V. 24. P. 445−466.

2. Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений. Вестник РАН. 2005. Т. 75. С. 338−345.

3. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. Москва: Научный мир, 2014. 372 с.

УЧАСТИЕ NO и АФК В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *CYCD3;1* В КАЛЛУСАХ ГРЕЧИХИ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ГОРМОНОЗАВИСИМОСТИ

Г.В. Сибгатуллина, А.Н. Акулов, Н.И. Румянцева

ФБГУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, Россия; e-mail: kam-guz@yandex.ru

Исследования, проводимые в последние десятилетия, показывают, что активные формы азота (АФА) наравне с активными формами кислорода (АФК) играют важную роль в регуляции клеточного цикла [1-2]. Классическими триггерами клеточного цикла являются гормоны и сахароза [3]. При этом согласованность продвижения по клеточному циклу с сигналами окружающей среды (в первую очередь с наличием и доступностью питательных веществ) обеспечивают циклины D-типа [4]. Известно, что гормоны могут оказывать влияние на внутриклеточное содержание АФК и АФА. Показано, что ауксин индуцирует значительное увеличение образования АФК в суспензии *Chenopodium rubrum* [5], а генерация NO быстро индуцируется в ответ на добавление цитокининов в клеточных культурах арабидопсиса, петрушки, и табака [6-7]. При этом выявлено, что окислительный

стресс и ауксин действуют синергично, индуцируя деления в тканях и протопластах *Arabidopsis thaliana* и протопластах люцерны [8-9], а в распространении ауксинового сигнала участвует NO, индуцируя экспрессию *CYCD3;1* и, следовательно, активируя клеточный цикл [10]. Тем не менее, согласованность АФК-, АФА- и гормональных сигналов в регуляции клеточного цикла к настоящему времени еще слабо изучена.

Цель данной работы заключалась в выявлении взаимосвязи между экспрессией гена клеточного цикла *CYCD3;1*, ростовыми процессами, динамикой внутриклеточного содержания NO и редокс–статусом клеток неморфогенных каллусов гречихи, различающихся по гормонозависимости.

В работе были использованы гормонозависимые неморфогенные каллусные линии гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn 1-8р и ORI и полученные из них путем переноса на среду культивирования без добавления гормонов гормононезависимые линии 1-8р б/г и ORI б/г, соответственно.

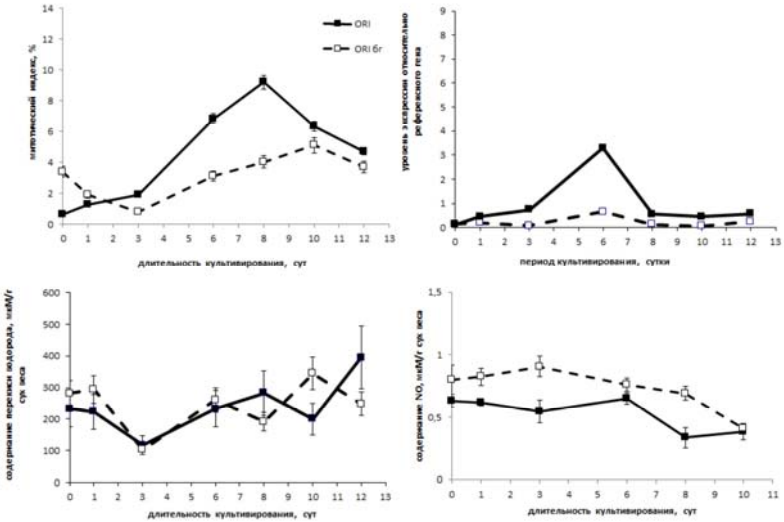


Рис.1. Характеристики каллусных линий ORI и ORI б/г.

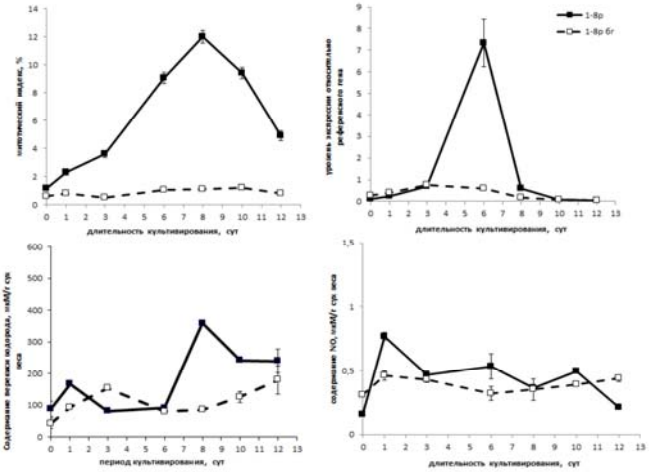


Рис.2. Характеристики каллусных линий 1-8р и 1-8р б/г.

Культуры, различающиеся по гормонозависимости, имели различные ростовые характеристики: показатели прироста биомассы и митотического индекса были ниже у гормононезависимых каллусов. Между митотической активностью каллусов и уровнем экспрессии *CYCD3;1* была отмечена прямая корреляция. В гормонозависимых линиях, характеризующихся более высокой пролиферативной активностью, уровень экспрессии *CYCD3;1* был выше по сравнению с медленно-пролиферирующими гормононезависимыми линиями. Кроме того, наибольшее значение уровня экспрессии исследуемого гена было отмечено в линии 1-8р, характеризующейся самым высоким показателем митотического индекса. Для всех культур за исключением 1-8р б/г была выявлена следующая закономерность: максимум экспрессии *CYCD3;1* предшествовал пику митотической активности. При этом в гормононезависимой линии ORI б/г был отмечен не только более низкий митотический индекс, но и продолжительность периода деления клеток была более растянутой по сравнению с гормонозависимой линией, а для линии 1-8р б/г отсутствие выраженного пика уровня экспрессии *CYCD3;1* коррелировало с отсутствием пика митотической активности. Важно отметить, что для линии ORI б/г было отмечено повышенное по сравнению с исходной линией содержание NO. Вероятно, NO может компенсировать недостаток гормонов и активировать деление клеток.

Таким образом, в культурах, различающихся по гормонозависимости, прослеживается связь между уровнем экспрессии *CYCD3;1*, митотическим индексом и содержанием перекиси водорода и NO. Можно заключить, что данную систему можно эффективно использовать для изучения влияния экзогенных гормонов как на редокс-статус и содержание NO, так и на уровень экспрессии генов клеточного цикла.

1. Ötvös K., Pasternak T., Miskolczi P., Domoki M., Dorjgotov D., Bottka S., Dudits D., Fehér A. Nitric oxide is required for, and promotes auxin mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures: NO in cell division // Plant J. 2005. V. 43, № 6. P. 849–860.

2. Correa-Aragunde N. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato // J. Exp. Bot. 2006. V. 57, № 3. P. 581–588.

3. Inzé D., De Veylder L. Cell cycle regulation in plant development // Annu. Rev. Genet. 2006. V. 40, № 1. P. 77–105.

4. Koroleva O.A. CycD1, a putative g1 cyclin from *Antirrhinum majus*, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY 2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 PHASEs // Plant cell online. 2004. V. 16, № 9. P. 2364–2379.

5. Pfeiffer W., Höftberger, M. (2001). Oxidative burst in *Chenopodium rubrum* suspension cells // Physiologia Plantarum. 2001. V. 111, №2. P. 144-150.

6. Tun N.N., Holk A., Scherer G.F. Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin // FEBS Lett. 2001. V. 509, № 2. P. 174–176.

7. Zhang K., Letham D.S., John P.C. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2 like H1 histone kinase // Planta. 1996. V. 200, № 1. P. 2–12.

8. Pasternak T. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level // J. Exp. Bot. 2005. V. 56, № 418. P. 1991–2001.

9. Pasternak T.P., Ötvös K., Domoki M., Fehér A. Linked activation of cell division and oxidative stress defense in alfalfa leaf protoplast de-

rived cells is dependent on exogenous auxin // Plant Growth Regul. 2007. V. 51, № 2. P. 109–117.

10. Correa-Aragunde N., Graziano M., Lamattina L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato // Planta. 2004. V. 218, № 6. P. 900–905.

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ БАКТЕРИЙ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД

Е.О. Симонова, А.М. Субботин, С.А. Петров

ФГБУН Тюменский научный центр СО РАН, г. Тюмень, Россия; e-mail: mailsimonova@gmail.com

В настоящее время мировая тенденция повышения продуктивности растениеводства заключается в поиске экологически чистых биологически активных препаратов и добавок для обработки посевного материала с целью повышения адаптивного потенциала растений. Одним из путей в данном направлении является применение ассоциативных микроорганизмов с возможностью применять их как PGRM (plant growth promoting bacteria) [1]. Микроорганизмы способны влиять не только на рост и развитие растений, но так же улучшать структуру почвы [2].

Более 9/10 площади Тюменской области относится к условиям Крайнего Севера. Сочетание неблагоприятных природных процессов и экологических ошибок в хозяйственной деятельности приводят к солонцеватости почв. Солончаки в верхнем слое содержат значительное количество хлористых, сернокислых и углекислых соединений натрия, калия и кальция. В южной сельскохозяйственной зоне плодородие почв существенно снижено из-за засоленности и заболоченности почв [3]. В Тюменской области имеется около 602,1 тыс. га солонцовых земель [4]. Соли оказывают отрицательное влияние на прорастание семян, накопление солей в зоне роста корней понижает водный потенциал почвенного раствора, что затрудняет поступление воды в корни. Таким образом, возникает физиологическая засуха. Даже небольшое снижение водного потенциала листа ведет к серьез-

ным физиолого-биохомическим нарушениям синтетических процессов, структуры белков и активности ферментов. Также вредное воздействие на растения оказывают и сами соли [5].

Ассоциативные микросимбионты, часто присутствующие на всех стадиях развития макросимбионта, могут влиять на его рост, развитие и продуктивность [6], вырабатывать фитогормоны, витамины, аминокислоты и другие активные вещества. Они способны защищать растения от фитопатогенов, вырабатывая антибиотические факторы или подавляя патогенную микрофлору иным способом [7], стимулировать антиоксидантную систему растений. Таким образом, создавая комфортную среду для роста и развития растения. Уникальными свойствами обладают микроорганизмы из многолетнемерзлых пород. Устойчивые формы бактерий с большим адаптивным потенциалом сохраняют свою популяцию в обедненных условиях внешней среды и вероятно обладают необходимым набором свойств, который обеспечивает им выживание. Ряд исследований, проведенный с микроорганизмами из ММП на лабораторных животных, мухах, простейших и растениях показал, что адаптивные свойства микроорганизмов из ММП можно перенести в современные живые системы [8].

Исследования проведены в 2014-2017 гг. в лаборатории ФБГУН Тюменский научный центр СО РАН. Материалам для исследования послужили образцы семян овса ярового (Avena sativa L.) сорта Тюменский голозерный и бактерии штамма *Achromobacter spanius*. 10-50-TS2, выделеные из многолетнемёрзлых пород, отобранных из бурового керна с глубины 30м. при бурении скважины в районе Тарко-Сале (Тюменская область).

Посеянные на питательный агар (ГРМ – агар) микроорганизмы культивировали в течении 24 часов при температуре +26 оС. Затем смывали выросшую культура бактерий дистиллированной водой в объеме 5 мл. Суспензию клеток бактерий сливали из пробирки в стерильную емкость [9]. Подсчет КОЕ проводили методом серийных разведений [10]. Рабочую концентрацию бактерий доводили до $1x10^7$ – $1x10^9$ микробных тел на миллилитр раствора. В полученной суспензии в течение часа инокулировали семена овса. Для контрольной группы семян для замачивания использовали воду. Семена проращивали в темном термостате при температуре 20-22 ^{0} С в течение 10 суток, в стерильных закрытых чашках Петри на фильтровальной

бумаге, смоченной 0,9% солевым раствором NaCl в опыте и дистиллированной водой в контроле. На четвертые сутки подсчитывали энергию прорастания, на десятые сутки определяли лабораторную всхожесть, измеряли длину корня и побега, и их массу [11].

В наших экспериментах предпосевная инокуляция семян исследуемым штаммом бактерий на фоне хлоридного засоления, повысила энергию прорастания семян на 40%, лабораторную всхожесть на 35,2%, привела к увеличению длины проростков на 59%, массы проростков в 2 раза, Отмечается увеличение количества корней на 13,3%, массы корней в 2 раза. Полученные результаты позволяют использовать штамм *Achromobacter spanius* 10-50-TS2, для разработки биопрепаратов с целью повышения продуктивности растений (роста и развитие растений, повышения энергии прорастания семян, их всхожести, стимуляции развития корневой системы), в том числе для зон с засолением почв [12].

1. Hamdia M. A., SHADDAD M. A. K. Salt tolerance of crop plants // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 2010. №3. 64-91 с.,

2. Дегтярева И. А., Дмитричева Д. С. Перспективные для сельского хозяйства биопрепараты на основе аборигенных микроорганизмов // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2012. № С.29-34

3. География Тюменской области: учебное пособие/ В.В. Бакулин, В. В. Козин - Екатеринбург: Средне-Уральское книжное издательство, 1996. - 235 с.

4. Ковда В. А. Биогеохимия почвенного покрова, М. Наука 1985. – 251с

5. Гузеева С. А. Состояние солонцовых почв юга Тюменской области и аспекты их освоения. / С. А. Гузеева // автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Тюмень: Издат-во ТГУ, 2007- 18 с.

6. Кузнецов, Вл.В. Физиология растений / Кузнецов Вл.В. - М.: Высш. шк., 2005. - 736 с. Селяев, Р.К. Стрессовые белки растений / Селяев Р.К.- Новосибирск.: Наука, 1989.- 142 с.

7. Яценко-Степанова Т. Н., Немцева Н. В., Игнатенко М. Е. Многообразие симбиозов и их роль в эволюции органического мира // Вестник ОГУ. 2014. № 13 (174). С. 142–146.

8. Штерншис М.В. Тенденции развития биотехнологии мик-

робных средств защиты растений в России // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2012. №2 (18) С.92-100.

9. ХолодОК №1 (9) 2012. Л.Ф. Каленова, А. М. Субботин. Микроорганизмы криолитозоны - объекты поиска особых адаптивных механизмов и международной экспедиции к древнейшей мерзлоте Евразии 54-60 с.

10. Герхард Т3, А.С.Лабинская, Микробиология с техникой микробиологических исследований. Изд-4 перераб и доп, М. «Медицина» 1978. 394 с.

11. Интернет ресурс: http://cldtest.ru/hdbk/chamber

12. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям: метод.руководство/Всесоюзный НИИ растениеводства имени Н. И. Вавилова «ВИР» : сост. :С. Н. Дроздов, Г. В. Еремин, Э. Л. Климашевский. – СПб, 1988.-226 с.

13. Патент RU № 2607028 C1. Российская Федерация. Штамм микроорганизмов Achromobacter spanius. 10-50-TS2 в качестве средства повышения устойчивости растений к хлоридному засолению./ Субботин А.М., Петров С.А., Симонова Е.О., заявл. 27.06.2016. вход №040092. рег. № 2016125612. опубл. 10.01.2017.; Бюл. №1. - 6с.

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ХОЛОДОСТОЙКИХ РАСТЕНИЙ ПРИ ЗАКАЛИВАНИИ К ХОЛОДУ

М.С. Синькевич

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия; e-mail sinkevich_m@mail.ru

Изучение механизмов устойчивости растений к низким температурам является важной и актуальной темой в свете того, что огромные территории, в том числе занятые сельскохозяйственными культурами, подвержены действию гипотермии. К настоящему времени сделаны существенные шаги в изучении механизмов устойчивости морозостойких растений к действию отрицательной температуры [1]. В отношении теплолюбивых растений известно, что они повреждаются от окислительного стресса уже при незначительном снижении температуры в плюсовом диапазоне. Про холодостойкие растения,

занимающие промежуточное положение между этими группами, считается, что они обладают более эффективной антиоксидантной системой, чем теплолюбивые, но практически не переносят образования льда. В чем конкретно состоят усовершенствования антиоксидантной системы холодостойких растений относительно близких теплолюбивых видов и как изменяются эти параметры при закаливании, является малоизученным вопросом.

С фундаментальных позиций представляет интерес изучение молекулярных механизмов устойчивости, что в настоящее время возможно, главным образом, на модельных объектах. С этой точки зрения в качестве объекта исследования из сельскохозяйственных культур хорошо подходят растения картофеля клубненосного (*Solanum tuberosum* L.), которые также являются типичными холодостойкими растениями, и резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana*) – в качестве примера слабо морозостойких растений.

Способность растений к закаливанию связана с включением присущих им механизмов устойчивости в период действия адаптирующих температур с целью противодействия эффектом более жесткого последующего охлаждения. На сегодняшний день выявлено несколько различных повреждающих факторов, возникающих в связи с пониженной температурой, среди которых важное место занимает окислительный стресс. Успешное противодействие окислительному стрессу отличает холодостойкие виды от теплолюбивых, при этом и те, и те обладают принципиально сходной системой защиты от данного стресса. Важнейшими показателями защиты от окислительного стресса являются скорость образования активных форм кислорода (АФК) и активность ключевых ферментов антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидаз. Целью данной работы было изучить изменения этих параметров в процессе закаливания растений арабидопсиса и картофеля.

Объектом исследования служили растения *Arabidopsis thaliana* Heinh (L.) экотипа Columbia (Col-0) и *Solanum tuberosum* L. в возрасте 7-8 недель. Для закаливания растения помещали в климатический шкаф «KBW-240» (Binder GmbH, Германия) на 5 суток при температуре 2°C (*Arabidopsis thaliana* Heinh (L.)) и 5°C (*Solanum tuberosum* L.) при освещенности 50 мкмоль фотонов/(м^2 * с) с 16 часовым фотопериодом. Контролем служили незакаленные растения. Ранее в нашей

лаборатории было показано, что растения *Arabidopsis thaliana* после закаливания при 2°С в течение 5 суток повышали свою устойчивость с LT_{50} = -3°С до LT_{50} = -6°С [2]. Аналогичным образом растения картофеля закаливались при 5°С.

Фракцию растворимых белков выделяли из листьев со всеми принятыми в данной сфере предосторожностями и очищали на колонках PD-10 midiTrap G-25 (GE Healthcare, США), затем использовали для дальнейших определений активностей ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидаз. Скорость генерации оценивали через изменение интенсивности окраски реакционной смеси с добавлением адреналина на длине волны 480 нм против смеси без адреналина и выражали в долях оптической плотности в минуту.

Согласно полученным данным, у арабидопсиса активность супероксиддисмутазы временно возрастает на 2-3 сутки охлаждения, однако затем снижается до исходных значений. Активность каталазы также временно повышалась на 2-3 сутки закаливания, и также как и активность супероксиддисмутазы постепенно снижалась к концу периода действия низкой температуры. У картофеля активность каталазы повышалась в первые сутки действия закаливающей температуры и в заметно большей степени: с ~2 до 5 ммоль H_2O_2 / (мин * г сырой массы), но в дальнейшем снижалась до исходных значений. Это было связано с повышенной активностью гваяколовых пероксидаз, достигающих максимума активности к 3 суткам закаливания.

В данной работе мы также оценивали скорость генерации АФК в динамике закаливания и обнаружили, что у растений арабидопсиса, в отличие от растений картофеля, при околонулевых положительных температурах не происходит заметного ускорения генерации АФК: наоборот она сокращается и держится немного ниже исходной в течение всего периода охлаждения. При этом активность супероксиддисмутазы подвергалась изменениям и, таким образом, не повторяла динамику скорости генерации АФК. Предполагается, что это связано с перераспределением вклада различных изоформ супероксиддисмутазы в суммарную активность [3], что приводит к повышению устойчивости к индуцированному холоду окислительному стрессу за счет увеличения вклада более устойчивых к избытку АФК Mn- и Fe-содержащих супероксиддисмутаз.

В результате работы супероксиддисмутазы более активный су-

пероксидный анион-радикал дисмутирует с образованием менее опасной перекиси водорода, которую, в свою очередь, расщепляют ферменты каталаза и пероксидазы. Активность каталазы была практически неизменна в течение всего периода закаливания в отличие от активности пероксидаз, которая возрастала. Учитывая изначальное различие в уровне активности, данные изменения позволяют сделать заключение о более важной для закаливания роли пероксидаз среди расщепляющих перекись ферментов.

Работа поддержана РФФИ (проект №16-34-01378)

1. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 2007. 54 с.

2. Синькевич М.С., Селиванов А.А., Антипина О.В., Кропочева Е.В., Алиева Г.П., Суворова Т.А., Астахова Н.В., Мошков И.Е. (2016) Активность антиоксидантных ферментов у растений *Arabidopsis thaliana* при закаливании. Физиология растений, т. 63, №6, с. 777-782

3. Нарайкина Н.В., Синькевич М.С., Демин И.Н., Селиванов А.А., Мошков И.Е., Трунова Т.И. (2014) Изменения активности изоформ СОД у растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) дикого типа и трансформированных геном Δ12-ацил-липидной десатуразы при низкотемпературной адаптации. Физиология растений, т. 61, №3, с. 359-366.

ВЛИЯНИЕ МИКРОСИМБИОНТОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ КОЛОРАДСКИМ ЖУКОМ

А.В. Сорокань, Г.А. Беньковская, Д.К. Благова, Т.И. Максимова

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа; e-mail: fourtyanns@googlemail.com

Исследованиями последних лет собрано множество доказательств участия микросимбионтов в адаптации хозяев к неблагоприятным воздействиям окружающей среды как абиотического, так и биотического характера. Так, микроорганизмы, населяющие ткани растения, вовлекаются в развитие индуцированной системной устойчивости против патогенов и вредителей, что позволяет рассматривать

их как резерв для создания экологически безопасных средств защиты растений. Однако, наличие эндосимбионтов у фитофагов также предполагает их участие в адаптации макросимбионта к окружающей среде и воздействии на иммунную систему растения-хозяина в целях снижения эффективности защитных реакций. Kerchev с коллегами [1] обобщили данные о роли АФК во взаимодействии растений и фитофагов, показав важность окислительного взрыва в защитных реакция растения от фитофага и системы детоксификации АФК для вредителя. Целью данной работы была оценка содержания перекиси водорода в растениях картофеля, инокулированных эндофитными микроорганизмами либо симбиотическими бактериями колорадского жука.

Пробирочные стерильные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Ранняя роза инокулировали эндофитными Bacillus (*B. subtilis* 26 Д, *B. thuringiensis* В-5351, а так же рекомбинантный штамм *B. subtilis* 26Д Cry (продуцирующий cry-токсин cry1Ia *B. thuringiensis* В-5351) согласно методике представленной в работе [2]. Изолят эндосимбионта колорадского жука *Enterobacter* ssp. (Бирский р-н, РБ, 2014) был использован как род, характерный как для личинок, так и для имаго колорадского жука [3]. Часть стерильных растений искусственно повреждали, нанося по 4 укола стерильной иглой на каждый лист, после чего на листья наносили по 25 мкл на 1 растение либо стерильную дистиллированную воду, либо суспензию клеток *Enterobacter* ssp., по 500, 50 и 5 КОЕ/растение. Часть имаго поили раствором 0,03% тетрациклина и нистатина для снижения содержания симбионтов. Повреждение непосредственно фитофагом проводили путем высаживания 1 имаго колорадского жука на 2-3 минуты (масса съеденного растительного материала составляла не более 2-5 мг на 1 растение).

Как видно из рис. 1., поранение листьев картофеля индуцирует более чем двукратное увеличение содержания перекиси водорода через 1 час после воздействия. Повреждение колорадским жуком с нормальной микрофлорой приводило к снижению этого показателя через 1 час и последующее возрастание к 6 часам после повреждения. Стабильно высокое содержание перекиси водорода наблюдалось в растениях картофеля поврежденных свободными от бактерий имаго.

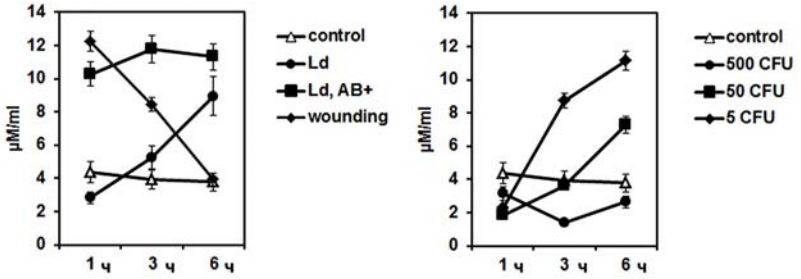


Рисунок 1. Содержание перекиси водорода в растениях картофеля при различном типе повреждений. Ld – повреждение колорадским жуком, Ld,AB+ - повреждение колорадским жуком со сниженным содержанием эндосимбионтов.

Обработка пораненных растений суспензией *Enterobacter* ssp. в любой концентрации ингибирует вызванное раневым стрессом накопление перекиси водорода, что может препятствовать немедленному развитию защитных реакций растения против повреждения фитофагом.

С другой стороны, обработка растений эндофитными штаммами *Bacillus subtilis* увеличивало содержание перекиси водорода в неповрежденных растениях и стимулировало этот показатель после повреждения колорадским жуком (Рис. 2). Для сравнения, штамм *B. thuringiensis* B-5351, продуцирующий инсектотоксчный белок и в меньшей степени способный существовать внутри тканей растений, не оказывал влияния на содержание перекиси водорода.

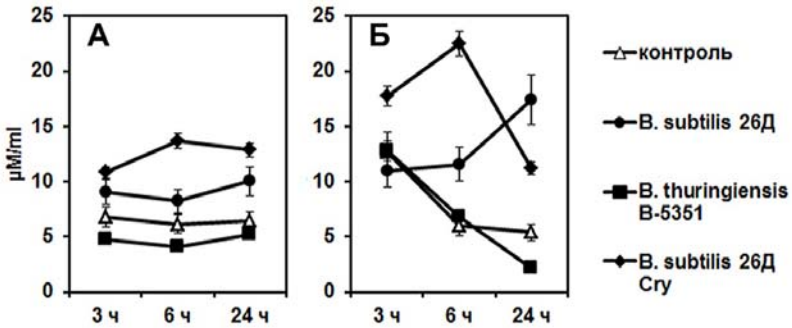


Рисунок 2. Содержание перекиси водорода в инокулированных бактериями рода Bacillus растениях картофеля в норме (А) и после повреждения колорадским жуком (Б).

Отметим, что смертность колорадского жука возрастала после кормления растениями, содержащими эндофитные микроорганизмы, в особенности, штамм *B. subtilis* 26ДСry, сочетающий свойство штамма *B. subtilis* 26Д индуцировать устойчивость растений и синтез инсектотоксичного белка.

Таким образом, увеличение содержания перекиси водорода в растениях картофеля является важной защитной реакцией на повреждение колорадским жуком и эндосимбионты вредителя задерживают ее накопление, увеличивая его вредоносность.

Таблица

Смертность имаго колорадского жука после кормления инокулированными бактериями рода Bacillus растениями картофеля

Вариант опыта	смертность, %
Контроль	6.7±0.5
B. subtilis 26Д	38.1±2.2*
B. thuringiensis B-5351	60.0 ± 10.6*
B. subtilis 26ДСry	80.7 ± 13,3*

1. Kerchev P.I., Fenton B., Foyer C.H., Hancock R.D. Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways // Plant, Cell and Environment. 2012. V. 35. P. 441–453.

2. Максимов И.В., Сорокань А.В., Нафикова А.Р., Беньковская Г.В. Совместное применение на растениях картофеля бакте-рии *Bacillus subtilis* 26Д и гифомицета *Beauveria bassiana* Уфа-2 снижает выжива-емость колорадского жука и пораженность фитофторозом // Микология и фитопатология. 2015, т. 49, №5. С. 317-324.

3. Sorokan A. V., Ben'kovskaya G. V., Maksimov I.V. The influence of potato endophytes on *Leptinotarsa decemlineata* endosymbionts promotes mortality of the pest //Journal of Invertebrate Pathology

АКТИВНОСТЬ ЛАККАЗЫ В ЛИШАЙНИКЕ *Cladonia Mitis*

Д.А. Степанкова[1,2], Л.В. Викторова[1], Ф.В. Минибаева[1]

[1]*ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, Россия;*

[2]*ФГБОУ ВО Казанский национальный исследовательский технологический университет, г. Казань, Россия;*
e-mail: dar.lomaeva@yandex.ru

Cladonia mitis, или «олений мох», - кустистый лишайник, обладающий высокой устойчивостью к действию стрессовых факторов. Содержит различные лишайниковые вещества, в том числе усниновую кислоту, которые являются сырьём для получения различных лекарств и препаратов. Большой вклад в формирование устойчивости лишайника *Cladonia* вносят окислительно-восстановительные процессы. В связи с этим, изучение активности и биохимических свойств оксидоредуктазного фермента лакказы лишайника важно как с фундаментальной, так и прикладной точки зрения. Кинетический анализ активности лакказы регидратированного лишайника проводили с использованием специфических субстратов ABTS и *о*-дианизидина.

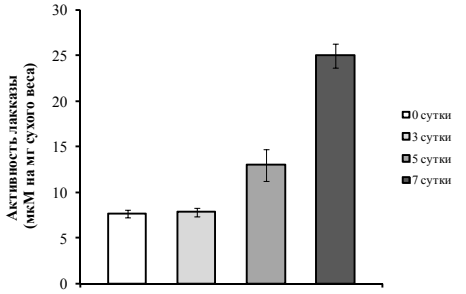


Рисунок 1. Активность лакказы (субстрат ABTS) на 0, 3, 5 и 7 сутки регидратации.

Обнаружено, что лишайник *C. mitis* обладает лакказной активностью. Активность лакказы значительно подавлялась ингибиторами медь-содержащих ферментов ДДК и азидом натрия, что указывает на наличие иона меди в каталитическом центре фермента.

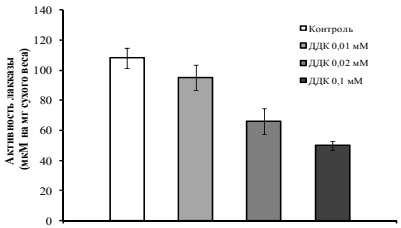


Рисунок 2. Активность лакказы в *C. mitis* при действии ДДК.

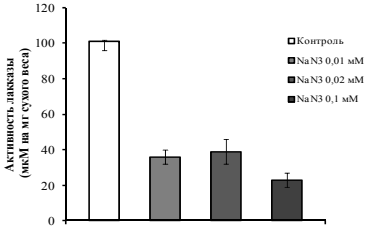


Рисунок 3. Активность лакказы в *C. mitis* при действии NaN_3

Анализ временно́й динамики активности лакказы в ходе 14-дневной регидратации сухого таллома лишайника показал повышение активности фермента в течение первых 7 дней. Анализ изоферментного состава лакказ *C. mitis* с помощью нативного гельэлектрофореза и изоэлектрофокусирования выявил наличие одной доминирующей изоформы с молекулярной массой около 300 кДа и p*I* 9.0. Для сравнения было проведено изоэлектрофокусирование лакказ другого вида лишайника *C. rangiferina*. Обнаружено, что у *C. rangiferina* присутствует широкий спектр лакказ с преобладанием кислых изоформ с p*I* 4,0-4,5.

Полученные данные свидетельствуют о высокой активности лакказы в талломе лишайника рода *Cladonia*. Повышение активности при регидратации сухого таллома, наличие разнообразных изоформ и доминирование щелочной изоформы этой оксидоредуктазы у *C. mitis* предполагает вовлечение лакказы в стрессовые ответы лишайника.

Известно, что редокс-активность лишайников тесно связана с наличием в них вторичных метаболитов, обладающих широким спектром физиологических эффектов. Нами был выявлен бактериостатический эффект лишайниковых веществ, экстрагированных из *C. mitis*. Наибольшая активность лишайниковых веществ наблюдалась по отношению к споровым бактериям, которые являются природными антагонистами фитопатогенных грибов. Лишайники представляют собой симбиотические ассоциации грибов и микроскопических зеленых водорослей, поэтому избирательное действие лишайниковых веществ направлено в первую очередь на подавление споровой микрофлоры.

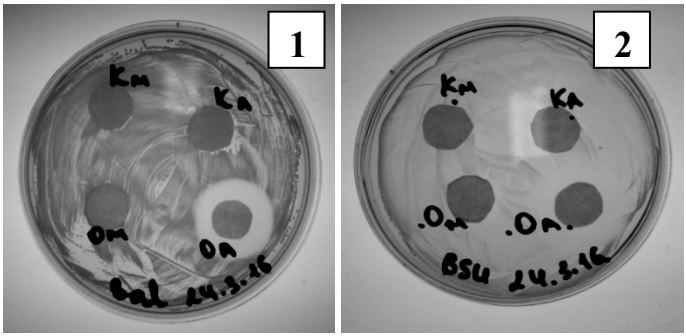


Рисунок 4. 1– *Bacillus altitudinis*; 2 – *Bacillus subtilis*; Км – контроль/метанол; Ка – контроль/ацетон; Ом – опыт/метанол; Оа – опыт/ацетон.

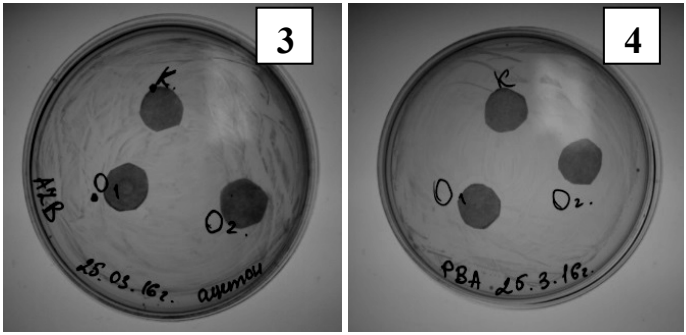


Рисунок 5. 3 – *Pectobacterium atrosepticum*; 4 – *Azospirillum brasilence*; К – контроль/ацетон; O_1 – опыт/ацетон; O_2 – опыт/ацетон.

Несмотря на продемонстрированное ранее наличие лакказ в лишайниках, биохимические свойства этих ферментов остаются слабо изученными. Учитывая высокую устойчивость лишайников к неблагоприятным факторам среды, изучение особенностей лакказ этих организмов представляется важным и актуальным. Особый интерес представляет также изучение эффектов лишайниковых веществ – фенольных метаболитов, которые не только могут служить субстратами лакказ, но и обладают биологической активностью.

ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ПРОРОСТКАХ ОЗИМОЙ И ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ХОЛОДА

С.И. Ступак

ФГБОУ ВО Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия; e-mail: okinayuko@gmail.com

Образование активных форм кислорода (АФК) при неполном восстановлением молекулы в процессе работы электронтранспортных цепей является нормальным процессом в живой клетке. Основные формы АФК: гидроксильный радикал, супероксидный анион, пероксид водорода. Уровень данных веществ в клетке контролируется сложной системой низкомолекулярных антиоксидантов (глутатион, аскорбат, каратиноиды, флаваноиды, полиамины и др.) и антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидазы, а также ферменты биосинтеза низкомолекулярных антиоксидантов). Абиотические и биотические стрессы нарушают равновесие между образованием и утилизацией АФК, что является сигналом к запуску защитных механизмов. В случае, если резервы клетки исчерпаны, возникает дисбаланс между содержанием АФК и активностью антиоксидантной системы, что приводит к развитию окислительного стресса [1]. При этом АФК вызывают повреждение белков, ДНК, липидов, пигментов. Повреждение липидов не только нарушает мембранные структуры клетки, но и запускает цепную реакцию перекисного окисления липидов, приводящую к образованию свободных радикалов.

Образование активных форм кислорода (АФК) относится к самым ранним эффектам охлаждения растения. В ряде исследований показано быстрое накопление H_2O_2 в клетках пшеницы при гипотермии, сопровождающееся ростом активности каталазы и аскорбатпероксидазы. Считается, что при высоких концентрациях пероксида водорода каталаза наиболее эффективно противодействует окислительному стрессу. Соотношение между стресс-индуцированными изменениями концентрации АФК в клетках и количеством антиоксидантов, а также активностью антиоксидантных ферментов для пшеницы зависит от сорта, возраста растений и длительности действия низких

температур [2]. Необходимо отметить, что динамичность этого баланса определяется тем, что изменение уровня АФК может с одной стороны активировать антиоксидантные системы клетки, а с другой - зависит от работы ее компонентов.

В данной работе была исследована динамика изменения общей пероксид-разрушающей активности и уровня активности пероксидаз экстрактов корней недельных проростков пшеницы в первые часы гипотермии (10^oC и 0^oC). В работе были использованы семена мягкой озимой пшеницы сорта Мироновская Юбилейная и мягкой яровой пшеницы сорта Омская 35, предоставленные ФГБНУ Башкирский НИИ сельского хозяйства.

Эксперименты показали, что активность пероксидаз экстракта корней проростков сорта Мироновская Юбилейная выше, чем сорта Омская 35. В тоже время пероксидазы этих сортов демонстрируют сходную динамику изменения активности в диапазоне температур от 0^oC до 25^oC. Экстракты корней растений, подвергшихся гипотермии, имели в 1,5-2 раза меньшую общую пероксид-разрушающая активность по сравнению с контролем. Вероятно, снижение активности пероксид-разрушающих систем растений при кратковременном понижении температуры связано с истощением пула низкомолекулярных антиоксидантов при низкой скорости работы ферментативных систем. Это предположение подтверждается тем, что активность пероксидаз в экстрактах корней растений, подвергшихся воздействию низких температур как правило не изменялась.

1. Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И. и др. Конститутивная и индуцированная холодом устойчивость проростков ржи и пшеницы к окислительному стрессу // Физиология растений. 2016. Т. 63. С. 346–359.

2. Абдрахимова Й.Р., Тимофеева М.Г., Вильданова А.Р., и др. Холод-индуцированная динамика активности антиоксидантных систем проростков различающихся по морозоустойчивости сортов пшеницы // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2011. Т. 15. С. 126-138.

ИЗМЕНЕНИЯ ЛАТЕРАЛЬНОЙ ПОДВИЖНОСТИ КОМПОНЕНТОВ ТИЛАКОИДНОЙ МЕМБРАНЫ И РЕДОКС-ДИНАМИКА ПЛАСТОХИНОНОВОГО ПУЛА У *CHLORINA* МУТАНТОВ ЯЧМЕНЯ И АРАБИДОПСИСА

Е.В. Тютерева, А.И. Евкайкина, А.Н. Иванова,
О.В. Войцеховская

ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, ул. Профессора Попова, 2, г. Санкт-Петербург, 197376, Россия; e-mail: ETutereva@binran.ru

К настоящему времени установлено, что диффузия белковых компонентов и липидов в тилакоидной мембране является важнейшим фактором, влияющим на фотосинтез [1-3]. Размер и плотность упаковки интегральных пигмент-белковых комплексов фотосинтетического аппарата в мембране определяют протекание таких диффузионно-зависимых процессов, как перемещение тримеров ССКII между фотосистемами, перенос электронов в фотосинтетической электронтранспортной цепи и репарация поврежденных компонентов фотосинтетического аппарата [3-5]. В соответствии с теорией перколяции, чем больше размер пигмент-белковых комплексов и выше их упорядоченность в мембране, тем ниже вероятность образования диффузионных доменов, ограничивающих свободное перемещение молекул в мембране, и тем быстрее может происходить направленная диффузия молекул пластохинона от реакционных центров к цитохром-b6/f комплексам [3, 6]. В то же время, слишком плотная упаковка пигмент-белковых комплексов в мембране может усиливать процессы тепловой диссипации уловленной световой энергии сверх необходимого уровня, а также может препятствовать диффузии поврежденных реакционных центров ФСII из гранальных в стромальные тилакоидные мембраны к месту их репарации. Это приводит к ингибированию фотосинтеза. Таким образом, латеральная подвижность компонентов мембраны и ее эффективная регуляция оказывать значительное влияние на фотосинтетический процесс.

Размер суперкомплекса ФСII в тилакоидной мембране может варьировать от минимального по величине корового комплекса до суперкомплекса $C_2S_2M_2$ в зависимости от размера светособирающей антенны [7]. В свою очередь, размер светособирающей антенны ФСII

регулируется тонкими изменениями в биосинтезе хлорофилла *b* (Хл*b)*: чем выше уровень биосинтеза данного пигмента, тем больше количество стабилизированных белков периферической антенны [8-10]. Полное отсутствие Хл*b* приводит к конститутивной деградации в хлоропластах сразу нескольких LHC белков, что вызывает полное отсутствие тримеров ССКII и, таким образом, значительное уменьшение антенн фотосистем [11-12]. Целью данной работы было исследовать, каким образом блок биосинтеза Хл*b* влияет на латеральную подвижность белковых комплексов и липидов в мембранах хлоропластов двух мутантов - мутанта ячменя *chlorina* f2 3613 (*clo* f23613), и мутанта арабидопсиса *ch*1-3 - по сравнению с растениями дикого типа. Предполагалось выяснить, есть ли взаимосвязь между изменениями в подвижности компонентов мембраны и показанной ранее сниженной интенсивностью фотосинтеза мутантов.

Методом анализа восстановления флуоресценции после фотовыцветания (Fluorescence Recovery After Photobleaching) были определены размеры мобильных фракций хлорофилл-связывающих белков и липидов, а также временные характеристики диффузии этих компонентов в тилакоидных мембранах. Данные были сопоставлены с составом и размером антенны мутантов и растений дикого типа, с размером пластохинонового пула и его редокс-динамикой на свету по данным ПАМ-флуориметрии, а также характеристиками переноса электронов по ЭТЦ путем регистрации кривых OJIP. Для мутанта ячменя *clo* f23613дополнительно изучали: (1) накопление активных форм кислорода (АФК) в листьях на свет с помощью флуоресцентных красителей (SOSG и CM-H_2DCFDA), (2) стехиометрическое соотношение количества реакционных центров ФСII и цитохромных b6/f-комплексов методом вестерн-блоттинга, и (3) расположение частиц ФСII на поверхности выделенных гранальных мембран методами микроскопии ТЭМ.

Оказалось, что, несмотря на сходный характер изменения антенн, вызванных блоком биосинтеза Хл*b* в мутантах ячменя и арабидопсиса, подвижность белковых и липидных компонентов мембран у них изменена различным образом. В мембранах *ch*1-3 диффузия липидов была снижена по сравнению с диким типом, тогда как подвижность белков оказалась неизмененной. У *clo* f23613 диффузия пигмент-белковых комплексов оказалась замедлена, тогда как подвиж-

ность липидов была выше, чем в диком типе. Размер пула пластохинонов в листьях не отличался у мутантов и соответствующих диких типов. Поток электронов с ФСII на пул пластохинонов для обоих мутантов также не превышал таковой в диких типах: показатели уровень светосбора ABS/RC и квантового выхода электронного транспорта от Q_A к Q_B в фотосистеме 2 (ET2o/RC) не превышали таковые в соответствующих диких типах. В то же время в листьях *clo* f23613 пул пластохинонов на свету был перевосстановлен, тогда как в листьях *ch*1-3 этого не наблюдалось. Перевосстановленность пула пластохинона коррелировала с повышенным образованием АФК в листьях мутанта ячменя. Причиной могло быть сильное снижение содержания цитохромных b6/f комплексов относительно РЦ ФСII. Образования полукристаллических рядов частиц фотосистем на поверхности мембран мутанта ячменя вследствие изменения их латеральной подвижности не выявлено.

Таким образом, блок биосинтеза Хл*b* вследствие дефекта в ферменте хлорофиллид-*a*-оксигеназе (CAO) вызывает сходные изменения в составе антенны и размере частиц суперкомплексов ФСII, но разнонаправленно влияет на подвижность компонентов тилакоидной мембраны в аналогичных мутантах двух видов, что свидетельствует о сложности плейотропных эффектов, вызванных мутацией в гене CAO у разных видов. В целом можно заключить, что измененная латеральная диффузия, без сомнения, выступает одним из главнейших механизмов снижения фотосинтетической продуктивности и развития фотоокислительного стресса в лишенных Хл*b* мутантах *chlorina*.

Исследования поддержаны РНФ (грант №14-16-00120-П). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург) и Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

1. Haferkamp S., Haase W., Pascal A.A., van Amerongen H., Kirchhoff H. Efficient light harvesting by photosystem II requires an optimized protein packing density in grana thylakoids// J Biol Chem. 2010. 108:17020–17028.

2. Kirchhoff H. Architectural switches in plant thylakoid membranes// Photosynth Res. 2013. 116:481–487.

3. Kirchhoff H. Diffusion of molecules and macromolecules in thylakoid membranes// Biochim Biophys Acta. 2014. 1837:495–502.

4. Kreslavski V., Carpentier R., Klimov V., Murata N., Allakhverdiev S. Molecular mechanisms of stress resistance of the photosynthetic apparatus// Biochem (Mosc) Suppl Ser A. 2007. 1:185–205.

5. Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress// Biochim Biophys Acta. 2007. 1767:414–421.

6. Tremmel I., Kirchhoff H., Weis E., Farquhar C.D. Dependence of plastoquinol diffusion on the shape, size, and density of integral thylakoid proteins// Biochym Biophys Acta. 2003. 1607:97–109

7. Caffarri S., Kouril R., Kereiche S., Boekema E.J., Croce R., Kouřil R. and Kereïche S. Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes// EMBO Journal. 2009. 28: 3052-3063.

8. Havaux M. and Tardy F. Thermostability and photostability of photosystem II in leaves of the chlorina-f2 barley mutant deficient in light-harvesting chlorophyll *a*/*b* protein complexes// Plant Physiol. 1997. 113: 3-923.

9. Tanaka R., Tanaka A. Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes// Biochim Biophys Acta. 2011. 1807: 968–976.

10. Sakuraba Y., Balazadeh S., Tanaka R., Mueller-Roeber B., Tanaka A. Overproduction of chl *b* retards senescence through transcriptional reprogramming in Arabidopsis// Plant Cell Physiol. 2012. 53: 505-17.

11. Härtel H., Lokstein H., Grimm B. and Rank B. Kinetic studies on the xanthophyll cycle in barley leaves (Influence of antenna size and relations to nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching)// Plant Physiol. 1996. 110: 471–482.

12. Kim E.H., Li X.P., Razeghifard R., Anderson J.M., Niyogi K.K., Pogson B.J., Chow W.S. The multiple roles of light-harvesting chlorophyll *a*/*b*-protein complexes define structure and optimize function of Arabidopsis chloroplasts: a study using two chlorophyll *b*-less mutants// Biochim Biophys Acta. 2009. 1787: 973–984.

СОДЕРЖАНИЕ АНТОЦИАНОВ, АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ И ЭНЕРГОДИССИПИРУЮЩИХ СИСТЕМ В ЛИСТЬЯХ *Hylotelephium triphyllum* (HAW.) HOLUB – ПРЕДСТАВИТЕЛЯ СЕМ. ТОЛСТЯНКОВЫЕ НА СЕВЕРЕ

М.А. Шелякин, И.Г. Захожий, Г.Н. Табаленкова, О.В. Дымова, Р.В. Малышев, И.В. Далькэ, Т.К. Головко

ФГБУН Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар, Россия; e-mail: shelyakin@ib.komisc.ru

Растения сем. Толстянковые (Crassulaceae) являются в большинстве своем суккулентами и обитают в жарком климате. Благодаря способности к САМ-типу фотосинтеза, они физиологически адаптированы к воздействию высокой температуры, засухи, засолению. На территории Европейского Северо-Востока России семейство представлено четырьмя видами (*Rhodiola quadrifida*, *R. rosea* L., *Sedum acre* L. и *Hylotelephium triphyllum*), которые осуществляют ассимиляцию CO_2 как типичные C_3-растения [1, 2].

H. triphyllum – евроазиатский вид таежной зоны, больше известен как *Sedum purpureum* (очиток пурпурный). Его обычными местообитаниями являются лесные опушки, вырубки, пойменные кустарники, склоны, бечевники. Произрастает на глинистой, песчаной и супесчаной почве, известняках, сланцевых обнажениях и скалах. В зависимости от экотопа могут быть различия в структуре листовой пластинки. Мезофилл листа может быть разделен на палисадную и губчатую ткани или представлен 6-10 слоями разных по форме клеток при отсутствии четкой дифференциации. Клетки эпидермы листа содержат антоцианы в разном количестве, что придает листовой пластинке красноватый оттенок. Антоцианы (А) – пигментированные флавоноиды, входят в обширную группу фенольных соединений, обладающих широким спектром действия. Считается, что антоцианы защищают фотосинтетический аппарат (ФСА) от фотоингибирования при стрессе и могут выполнять ряд других экологических функций [3]. Однако имеющиеся в литературе сведения о функциональном значении А весьма противоречивы.

Мы провели сравнительное исследование функциональной активности ФСА листьев очитка с высоким и низким содержанием антоцианов, далее красные и зеленые листья соответственно. Целью ра-

боты было проверить гипотезу о защитной роли внепластидных пигментов флавоноидной природы. Растения произрастали на супесчаной почве в пойме р. Вымь (подзона средней тайги). В опытах использовали зрелые листья верхней части генеративных побегов.

Физиолого-биохимические параметры листьев определяли ранним утром (6 ч), после полудня (14-15 ч) и поздним вечером (20-21ч). Измеряли скорость фотосинтеза листьев (ИК-газоанализатор LiCor-7000), индуцированную флуоресценцию хлорофилла *a* ФСII (PAM-2100, Walz, Германия), скорость поглощения O_2 (Oxytherm system, Hansatech Inst., Англия) в присутствии ингибиторов дыхательных путей. Уровень липопероксидации оценивали по накоплению в листьях ТБК-реагирующих продуктов, количество пероксида – с использованием ксиленолового оранжевого. Содержание фотосинтетических пигментов и антоцианов определяли спектрофотометрически (UV-1700, Shimadzu, Япония), состав и содержание каротиноидов методом ВЭЖХ. При отборе образцов листьев для анализа регистрировали показатели микроклимата. В период проведения исследований (июль 2016 г.) к полудню температура воздуха в местообитании растений достигала 35-38 ^{0}C, относительная влажность воздуха снижалась до 35%, освещенность при ясном небе составляла около 1600 мкмоль квантов/ м^{2}с.

Определения показали, что красные листья накапливали на порядок больше антоцианов, чем зеленые, тогда как содержание хлорофиллов (в основном хл *a*) в них было в 1.5-2 раза меньше. Антоциановые листья отличались также более низким содержанием каротиноидов. В составе каротиноидов были идентифицированы β-каротин, ксантофиллы неоксантин, лютеин и пигменты ксантофиллового цикла (КЦ) – виолаксантин, антероксантин и зеаксантин. Уровень конверсии пигментов КЦ был довольно существенным в обоих типах листьев в течение всего светового дня. Максимум деэпоксидации (DEPS) пигментов КЦ наблюдали в послеполуденные часы, и он был несколько выше у зеленых листьев. Выявлена тесная связь суточных изменений уровня DEPS с величиной нефотохимического тушения (NPQ). Эти данные свидетельствуют об активации механизмов, связанных с тепловой диссипацией поглощенной солнечной радиации, что препятствует чрезмерному образованию АФК.

Судя по показателям индуцированной флуоресценции хлорофилла *a*, максимальная фотохимическая эффективность ФСII (Fv/Fm) снижалась в первой половине дня у зеленых листьев от 0.75 до 0.68 и

восстанавливалась до 0.72 вечером. Минимальная величина Fv/Fm у красных листьев с высоким содержанием А составила 0.72, а вечером возрастала незначительно, до 0.75. Понижение параметра Fv/Fm в дневное время означает, что листья перед определением испытывали стрессовое воздействие. Одновременно со снижением Fv/Fm происходило заметное уменьшение квантового выхода фотохимических реакций ФСII. Одной из причин могло быть закрывание устьиц и переход растений на CAM тип фотосинтеза. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о суточной динамике титруемой кислотности в листьях. Ранним утром величина этого показателя была на порядок выше, чем в дневные часы. При этом зеленые и красные листья мало различались по величине кислотности клеточного сока. Следует также отметить очень низкую интенсивность видимого фотосинтеза (около 0.5 мг CO_2 /г сухой массы ч) обоих типов листьев днем. Листья, отобранные в вечернее время (20 ч), поглощали CO_2 в 4 раза интенсивней.

Митохондриальная ЭТЦ, наряду с хлоропластной, является одним из мощных источников образования АФК в растительной клетке. Наши данные показали, что в утренние и дневные часы зеленые и красные листья практически не отличались по скорости поглощения O_2. Вечером дыхательная активность антоциановых листьев заметно снижалась. Значительные различия были выявлены при сопоставлении величин активности и соотношения дыхательных путей. У зеленых листьев отмечали сильное вовлечение энергодиссипирующего альтернативного пути транспорта электронов (АП) в дневное время при высокой освещенности и температуре. Соотношение интенсивностей основного цитохромного пути дыхания (ЦП) и АП снижалось днем в 2.5 раза и составило 0.5, тогда как у красных листьев на протяжении всего светлого периода суток превалировал ЦП, а соотношение ЦП/АП варьировало в пределах 1.7. Доля АП в общем дыхании антоциановых листьев не превышала 30%, тогда как у зеленых достигала днем 60%.

Листья с разным содержанием антоцианов существенно отличались по интенсивности липопероксидации. В дневные часы уровень накопления ТБК-РП в антоциановых листьях был в 4 раза ниже, чем в зеленых листьях. При этом содержание пероксида в них было в 1.5-2 раза больше.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что в исследуемой ценопопуляции *H. triphyllum* присутствовали фенотипы растений с разной способностью накапливать А в листьях. Антоциановые листья содержали значительно меньше хл *a*. Это может свидетельствовать о снижении количества реакционных центров фотосистем, куда входит данная форма хлорофилла. Листья с повышенным накоплением А сохраняли более высокую потенциальную фотохимическую активность ФСII, отличались меньшим вовлечением энергодиссипирующего АП и сравнительно низким уровнем перекисного окисления липидов. В совокупности эти результаты говорят о том, что антоцианы принимают участие в защите листа от окислительного стресса.

Исследования выполнены в рамках темы НИОКТР «Физиология и стресс-устойчивость фотосинтеза растений и пойкилогидрических фотоавтотрофов в условиях Севера» (№ АААА-А17-117033010038-7).

1. Головко Т.К., Далькэ И.В., Бачаров Д.С. Мезоструктура и активность фотосинтетического аппарата трех видов растений сем. Crassulaceae в холодном климате // Физиология растений, 2008. №5. С. 671 – 680.

2. Головко Т.К., Далькэ И.В., Бачаров Д.С., Бабак Т.В., Захожий И.Г. Толстянковые в холодном климате (биология, экология, физиология). СПб.: Наука, 2007. 205 с.

3. Steyn W. J., Wand S. J. E, Holcroft D. M., Jacobs G. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection // New Phytologist. 2002. V. 155. № 3. P. 349–361.

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И КАРБОНИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ РАСТЕНИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АНОКСИИ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

А.Е. Шиков, В.В. Ласточкин, Т.В. Чиркова, В.В. Емельянов

СПбГУ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: shik-999@inbox.ru

Стрессовые условия широко распространены в природе. К примеру, наводнения, образование снежной корки, засуха, избыточное содержание солей, воздействие загрязнителей, таких как озон, способны спровоцировать развитие окислительного стресса. Этот процесс в основном связан с генерацией активных форм кислорода (АФК) [1]. Окислительные повреждения часто ведут к программируемой клеточной гибели или некрозу тканей из-за последствий повреждения клеточных мембран [2], системного энергетического кризиса [3], окислительного повреждения белков и ацидоза цитоплазмы [4]. Общепринятым фактором, вызывающим окислительный стресс принято считать аноксию (кислородное голодание), во время которого образуются АФК, что особенно усиливается после реоксигенации [3]. Устойчивые к окислительным повреждениям растения, как правило, демонстрируют большую устойчивость и к остальным стрессорам, благодаря так называемой кросс-адаптации [5]. Таким образом, защита растений от активных форм кислорода – это очень актуальная тема исследований, представляющая большой интерес для прикладных областей, в первую очередь, земледелия и сельского хозяйства.

Материалами исследования были 10-дневные проростки риса (*Oryza sativa*) и 7-дневные проростки пшеницы (*Triticum aestivum*). Пшеница была использована как неустойчивое растение, в то время как рис – устойчивый к дефициту кислорода и его последствиям. Степень перекисного окисления липидов (ПОЛ) была оценена через измерения уровня малонового диальдегида (МДА). Уровень H_2O_2 был измерен спектрофотометрически с применением ксиленового оранжевого. Степень карбонилирования белков определяли на спектрофотометре с использованием красителя 2,4-динитрофенилгидразина.

Воздействие аноксии в ходе исследования вызывало снижение ПОЛ. Тем не менее, окислительные процессы постепенно усиливались по возвращении в условия нормоксии в побегах и корнях исследуемых объектов. При этом проростки пшеницы демонстрировали более значительный уровень ПОЛ по сравнению с рисом. В процессе долговременной реаэрации концентрация МДА в корнях и побегах пшеницы достигала своего пикового значения.

Анализ уровня АФК выявил следующую картину. На продукцию пероксида водорода у пшеницы аноксия повлияла незначительно, в

то время как рис в бескислородных условиях показывал заметное уменьшение генерации H_2O_2. Реоксигенация вызывала накопление АФК в обоих растениях. Нужно отметить, что образование H_2O_2 в проростках риса незначительно превышало контрольные значения, хотя в тканях пшеницы было замечено значительное увеличение концентрации перекиси (примерно в пять раз). Можно заключить, что общая динамика изменения концентрации пероксида была сходна в обоих растениях. Однако устойчивый к кислородному голоданию рис проявил тенденцию к уменьшению продукции АФК в процессе реаэрации, даже несмотря на относительно высокие значения концентрации перекиси в контроле, тогда как неустойчивая пшеница показывала отчётливое усиление генерации окислительных агентов. Описанные данные достаточно неплохо коррелируют с результатами исследования ПОЛ. Накопление АФК в проростках пшеницы, вероятно, запускает нарушения целостности мембран растительных клеток в ходе реаэрации. Напротив, устойчивый рис, по всей видимости, имеет более эффективное взаимодействие компонентов антиоксидантной системы, которая защищает растение от окислительных агентов путём утилизации H_2O_2.

Данные по исследованию степени карбонилирования были следующими. В побегах риса почти не наблюдалось возрастания концентрации карбонильных групп в молекулах белков в ходе аноксии и реаэрации по сравнению с контрольным уровнем. В корнях риса наблюдали увеличение степени карбонилирования под действием аноксии с постепенным возвращением к уровню контроля после длительной реоксгенации. В побегах пшеницы наблюдалась сходная картина, что и в корнях риса, тем не менее, общая степень карбонилирования была выше. Однако в корнях неустойчивого растения окислительное повреждение белков в значительной степени возрастало в процессе реаэрации.

Можно заключить, что усиленная продукция АФК в побегах и корнях пшеницы вызывала дестабилизацию мембран и повреждения белков, провоцируя тем самым клеточную гибель. У устойчивого к дефициту кислорода риса, напротив, благодаря поддержанию относительно постоянного уровня АФК, не происходило существенного усиления ПОЛ и губительных окислительных модификаций клеточных белков.

Исследования поддержаны грантами РФФИ 15-04-03090 и 16-04-00743.

1. Jones D.P. Redefining oxidative stress.// Antioxid. Redox Signal. 2006. V.8. P. 1865-1879.

2. Чиркова Т.В., Новицкая Л.О., Блохина О.Б. Перекисное окисление липидов и активность антиоксидантных систем при аноксии у растений с разной устойчивостью к недостатку кислорода.//. Физиология растений. - 1998. - Т.45, №1. -С.65-73

3. Drew M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol. -1997. -V.48. -P.223-250.

4. Roberts J.K.M., Wemmer D., Ray P.M., Jardetzky 0. Regulation of cytoplasmic and vacuolar pH in maise root tips under different experimental conditions. // Plant Physiol. -1982. -V.69. -P.1344-1347.

5. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. // Ann. Bot.-2003.-V.48. 91-P.179-194.

МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *Gracilaria vermiculophylla* ПРИ АДАПТАЦИИ К СОЛЕНОСТИ: РОЛЬ В СТРЕСС-УСТОЙЧИВОСТИ

И.М. Яковлева, Л.А. Несмелова

ФБГУН Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, г. Владивосток, Россия; e-mail: yakovleva72@mail.ru

Известно, что морские макрофиты, обитающие в литоральной зоне, мелководных прибрежных лагунах и эстуариях рек, часто подвержены регулярным колебаниям солености и воздействию высокой инсоляции, которые могут вызывать повышение продукции активных форм кислорода, АФК [1]. Особая роль в нейтрализации АФК в неблагоприятных условиях и обеспечении стресс-устойчивости водорослей отводится супероксиддисмутазе (СОД), которая может быть представлена изоформами, различающимися ионом металла в активном центре фермента [2]. К сожалению, сведения о поведении СОД у

морских автотрофных организмов при смене солевого режима ограничены работами, выполненными на зеленых макроводорослях [3], микроводорослях [3] и цианобактериях [4]. Кроме того, данные об участии изоформ СОД в антиоксидантном ответе морских макрофитов в условиях флуктуации солености и воздействия высокой освещенности отсутствуют. Поэтому мы исследовали влияние солевого режима и светового пресса на активность изоформ СОД красной водоросли *Gracilaria vermiculophylla*, обитающей на мелководье солоноватых лагун южного Приморья (неприкрепленная форма) и на литорали б. Сивучья Японского моря (прикрепленная форма).

В условиях лаборатории была проведена 3-х недельная акклимация лагунной и морской форм *G. vermiculophylla* к нормальной (32‰) и пониженной (15‰) солености воды в оптимальных для этого вида световых и температурных условиях. После акклимационного периода водоросли облучали светом высокой интенсивности (900 мкЕ/м^2 с) в течение 4-х часов и затем возвращали в исходные условия культивирования согласно солевым вариантам. В течение экспериментов контрольные образцы морской и лагунной грацилярии культивировали при соответствующих соленостях и оптимальной для них интенсивности света. Пробы отбирали после периода акклимации, 2-х и 4-х часов световой экспозиции, а также через 20 часов постстрессового периода. Анализировали содержание белка [5], изоферментный состав и активность СОД [6, 7]. Для оценки устойчивости грацилярии к окислительному стрессу определяли содержание малонового диальдегида (МДА, одного из конечных продуктов перекисного окисления липидов, ПОЛ) в тканях водорослей.

В результате сравнительного анализа состава и активности СОД в тканях лагунной и морской грацилярии установлено присутствие семейства Mn-содержащих изоформ СОД, которые вносили максимальный вклад в общую активность этого фермента у обеих популяций водоросли. Также отмечено присутствие Cu-ZnСОД и FeСОД изоформ в тканях как морской, так и лагунной форм водоросли. У лагунной *G. vermiculophylla* активность Cu-ZnСОД была в 2 раза ниже, а активность FeСОД на порядок выше, чем у ее морской формы. Экспериментально показано, что изменение солевого режима регулирует активность Cu-ZnСОД и FeСОД изоформ, но не оказывает влияния на активность MnСОД у обеих популяций водоросли.

Экспонирование водорослей на ярком свету после их акклимации к солености воды 32‰ или 15‰ позволило установить, что лагунная форма грацилярии проявляет более высокую устойчивость к яркому свету, чем ее морская форма при обоих солевых режимах. Об этом свидетельствует отсутствие изменений или задержка в интенсификации процессов ПОЛ в тканях лагунной *G. vermiculophylla* в течение 4-х часовой экспозиции на ярком свету и повышение уровня МДА уже после 2-х часов светового облучения в тканях морской *G. vermiculophylla*. Показано, что высокая стресс-устойчивость лагунной грацилярии обеспечивается активацией семейства MnСОД изоформ и стабильно высокой активностью FeСОД в ее тканях. Низкая резистентность к яркому свету у морской *G. vermiculophylla* при солености воды 15‰, по-видимому, связана с низкой базовой активностью FeСОД и необратимой инактивацией ее MnСОД изоформ высокими интенсивностями света.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о ключевой роли СОД и ее изоферментного состава в антиоксидантной защите морских красных водорослей в условиях колебания солености воды при дополнительной нагрузке света высокой интенсивности.

1. Kumar M., Kumari P., Reddy C.R.K., Jha B. Salinity and desiccation induced oxidative stress acclimation in seaweeds // Adv. Bot. Res. 2014. V. 71. P. 91–123.

2. Wolfe-Simon F., Grzebyk D., Schofield O., Falkowski P.G. The role and evolution of superoxide dismutases in algae. Review // J. Phycol. 2005. V. 41. P. 453–465.

3. Sung M.S., Hsu Y.T., Wu T.M., Lee T.M. Hypersalinity and hydrogen peroxide up-regulation of gene expression of antioxidant enzymes in *Ulva fasciata* against oxidative stress // Mar. Biotech. 2009. V. 11. P. 199–209.

4. Shirkey B., Kovarcik D.P., Wright D.J., Wilmoth G., Prickett T.F., Helm R.F., Gregory E.M., Potts M. Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant *sodF* mRNA in *Nostoc commune* (*Cyanobacteria*) after years of desiccation // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 189–197.

5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

6. Beauchamp C.H., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. V. 44. P. 276–287.

7. Beyer W.F, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions // Anal. Biochem. 1987. V. 161. P. 559–566.

Авторский указатель

Abdrakhimova Y.R. 21
Abdrakhimov F.A. 21
Angelis K.J. 317
Auvinen P. 28
Balcke G.U. 26, 38
Beckett R.P. 24
Bibikova T. 301
Bilova T.E. 26, 38
Birkemeyer C. 26, 38
Blokhina O. 28
Brauch D. 26, 38
Bulychev A. 301
Chasov A.V. 307
Chikun P. 305
Chychko A.A. 297
Corke F. 33
Demidchik V. 32, 33, 297, 305, 317
Doonan J.H. 33
Erofeev A. 301
Fagerstedt K.V. 28
Firsova E. N. 40
Freiberg A. 36
Frolov A.A. 38, 311
Frolova N.V. 38
Gorelkin P. 301
Häggman H. 28
Herfurth U.M. 38
Ivanov R.S. 313
Ivanova E.A. 313
Kallio P.T. 28
Kashparova L. 33
Kim A. 26
Klimova E.A. 297
Kolupaev Yu. E. 40
Komarova A. 301
Lackman P. 28
Li B. 28
Lukasheva E.M. 26. 38
Maaheimo H. 28
Macduff J. 33
Mackievic V. 33. 297 305, 313
Makavitskaya M. 33, 305
Mathews R. 33
Medvedev S. 297, 311
Mehmood T. 311
Milkowski C. 38
Minibayeva F.V. 24, 307
Navaselsky I. 305
Nibau C. 33
Onele A.O. 307
Osmolovskaya N.G. 38
Paudel G. 26, 38
Pozhvanov G. 297
Rabadanova K. 305
Rischer H. 28
Romanovskaya E.V. 311
Samohina V. 297, 305
Shapiro M. 309
Shevchenko G. 33
Shilyaev N.E. 38
Smolikova G.N. 311
Soboleva A.V. 311
Sokolik A. 305
Stanisheuski S. 309
Straltsova D. 305
Subramaniam S. 297
Sutela S. 28

Svistunenko D. 297, 305
Talalaiev A. 33
Tarakhovskaya E.R. 26, 38
Thorogood D. 33
Tissier A. 38
Törönen P. 28
Tyutereva E.V. 297, 305
Vafina G.H. 313
Vikhnina M.V. 311
Viktorova L.V. 307
Vogt T. 26, 38
Voitsekhovskaja O.V. 297, 305
Wessjohann L.A. 26, 38
Yastreb T.O. 40
Zvanarou S. 33, 313
Абайлдаев А.О. 233, 235
Абилова Г.А. 43
Абрамочкин Д.В. 158
Авальбаев А.М. 46
Акбарова Г.А. 95
Акимова Е.Е. 320
Акулов А.Н. 409
Акчурина О.В. 175
Аллагулова Ч.Р. 46, 48
Амиркулова А.Ж. 233, 235
Андрияшина Н.М. 99
Антипин А.В. 99
Антипина О.В. 211, 407
Апёнышева М.В. 320
Архипова Т.Н. 137
Астахова Н.В. 211
Ахиярова Г.Р. 52, 56
Ахтямова З.А. 141
Ахунов А.А. 59, 95
267
Баймухаметова Э.А. 346
Баранова Е.Н. 62, 66
Батова Ю.В. 121
Безрукова М.В. 70
Белкина А.В. 330
Беньковская Г.А. 419
Бердникова О.С. 101
Бережнева З.А. 346
Благова Д.К. 74, 277
419
Богданова Е.С. 226
Боднарь И.С. 324
Бойко Е.В. 78, 93
Борисова Г.Г. 162
Борисова-Мубаракшина М.М. 115
Боровик О.А. 327
Брейгина М.А. 158, 336
Бурая К.П. 80
Бурханова Г.Ф. 83, 87
288, 397
Бурьянов Я.И. 260
Валитова Ю.Н. 330
Венжик Ю.В. 340
Веселов А.П. 238, 343
Веселов Д.С. 52, 56
Веселов С.Ю. 52, 56
137, 141
Веселова С.В. 83, 87
397
Ветошкина Д.В. 115
Видершпан А.Н. 78, 93
Викторова Л.В. 423
Виссенберг К. 208
Власова Н.С. 217
Войцеховская О.В. 248, 333
354, 374
390, 402
428

Воронина В.С. 111
Высоцкая Л.Б. 141
Гайсин И.А. 199
Галибина Н.А. 188
Гильманова Р.И. 46
Головацкая И.Ф. 78, 93
Головко Т.К. 432
Голубенко З. 95
Гончарук Е.А. 108
Грабельных О.И. 327
Грабовская Ю.С. 99
Грабовский С.А. 99, 175
Гречкин А.Н. 377
Гриусевич П.В. 374
Гулевич А.А. 62
Гурьянов О.П. 270
Далькэ И.В. 432
Даминова А.И. 199
Дегтярев А.И. 386
Демидчик В.В. 208, 248
354, 374
390, 402
Дмитриев А.П. 292
Дмитриева В.А. 333
Дмитриева С.А. 330, 351
Добрякова К.С. 248, 374
390, 402
Драгун П.А. 178
Дымова О.В. 432
Дьяченко О.В. 260
Евкайкина А.И. 333, 428
Евменьева А.А. 336
Емельянов В.В. 435
Ершова А.Н. 101
Жигачева И.В. 104
Загоскина Н.В. 108
Задиранова Н.С. 222
Зайнуллин В.Г. 324
Зайцев Д.Ю. 141
Захарченко Н.С. 260
Захожий И.Г. 432
Землянухина О.А. 111
Зорина А.А. 251, 359
Зюбанова Т.И. 320
Иванов Б.Н. 115
Иванов И.И. 141
Иванов С.П. 175
Иванова А.Н. 248, 333
428
Ивановский В.В. 281
Иваченко Л.Е. 145
Игнатенко А.А. 340, 394
Ильина И.А. 185
Ильина Т.М. 377
Ишмухаметов А.А. 363
Кабальнова Н.Н. 99, 175
Казакова А.С. 119
Казанцева В.В. 108
Казнина Н.М. 121
Калаев В.Н. 111
Кальясова Е.А. 343
Караваева А.В. 133
Каримова Ф.Г. 46
Карпец Ю.В. 125
Карпова А.Б. 213
Касимова Р.И. 288
Кириллова И.Г. 129
Кирисюк Ю.В. 297, 354
Киселева Г.К. 133, 185
Климова Е.А. 333
Козулева М.А. 115
Колупаев Ю.Е. 125, 292
Кононенко Н.В. 66

Кудоярова Г.Р. 136, 137
141
Кузнецова В.А. 145
Кузьмина Л.Ю. 137
Кулдошева К.М. 95
Кулуев Б.Р. 346
Курамшина З.М. 147
Куренина Л.В. 62
Лазарева Е.М. 66
Лайдинен Г.Ф. 121
Лапшин Н.К. 203
Лапшин П.В. 108
Ласточкин В.В. 435
Ласточкина О.В. 348
Лось Д.А. 251, 359
Лубянова А.Р. 70, 150
Мазина А.Б. 351
Макеева И.Ю. 217
Максимов Е.Г. 251
Максимов И.В. 74, 83
87, 154
277, 397
Максимов Н.М. 158
Максимова Т.И. 419
Малева М.Г. 162
Малышев Р.В. 432
Малышева А.М. 374, 402
Мамасолиева М.А. 59, 267
Масленникова Д.Р. 46, 166
Мацкевич В.С. 354, 374
402
Медведев С. С. 208
Медведева Ю.В. 93
Минаева О.М. 320
Минибаева Ф.В. 169, 230
270, 273
330, 351
423
Миронов К.С. 192, 251
359
Михайлов А.Л. 171
Михайлова М.П. 145
Мишарина Т.А. 104
Мишинкин В.Ю. 175
Молчан О.В. 178
Мороз А.С. 281
Мороз Д.С. 178
Мошков И.Е. 407
Мощенская Ю.Л. 188
Муратова М.В. 288
Муринов Ю.И. 175
Мухитова Ф.К. 330, 377
Набеева Р.А. 363
Наврузов С.Б. 59, 95
Нарушко М.В. 368
Невмержицкая Ю.Ю. 171, 182
Ненько Н.И. 133, 185
Несмелова Л.А. 438
Нестеров В.Н. 226
Нечаева Т.Л. 108
Никерова К. М. 188
Николаева Т.Н. 108
Нилова И.А. 371
Нимаева О.Д. 213
Новикова Г.В. 192
Новицкая Л.Л. 188
Новосельский И.Ю. 374, 402
Носов А.В. 192
Нугуманов Т.Р. 175
Огородникова А.В. 377
Панибрат О.В. 382

Панфилова К.М. 340
Панфилова О.Ф. 196
Пахомова В.М. 199
Петров С.А. 368, 413
Петрова Н.В. 46
Пиголева С.В. 260
Пильщикова Н.В. 196
Пиотровский М.С. 203
Плотников А. 150
Плотникова Л.Я. 205, 386
Побежимова Т.П. 327
Пожванов Г.А. 208
Пожерукова В.Е. 205, 386
Попов В.Н. 211, 407
Постригань Б.Н. 346
Прадедова Е.В. 213
Пузина Т.И. 217
Пусенкова Л.И. 348
Пшибытко Н.Л. 221
Рабаданова К.К. 248, 390
Репкина Н.С. 121, 340
394
Решетник Г.В 222
Розенцвет О.А. 226
Румянцев С.Д. 397
Румянцева Н.И. 409
Рябовол В.В. 230
Саляев Р.К. 213
Самохина В.В. 374, 402
Сапко О.А. 233, 235
Сарварова Е.Р. 74
Свистуненко Д.А. 354
Селиванов А.А. 407
Середнева Я.В. 238
Сибгатуллина Г.В. 409
Симон Е.В. 78
Симонова Е.О. 413
Синетова М.А. 251
Синицына Ю.В. 248, 343
Синькевич М.С. 416
Скрыпник Л.Н. 80, 254
Скуратович Т.А. 178
Смирнова Е.А. 66
Смирнова Ю.В. 147
Смольянинова Л.В. 279
Собчук Н.А. 242
Соколик А.И. 354, 374
402
Сорокань А.В. 419
Степанкова Д.А. 423
Стрельцова Д.Е. 374
Ступак С.И. 426
Субботин А.М. 368, 413
Сулкарнаева А.Г. 330
Сундырева М.А. 246
Схаляхо Т.В. 185
Табаленкова Г.Н. 432
Таланова В.В. 340, 394
Тимофеева О.А. 171, 182
Титов А.Ф. 121, 340
371
Топчиева Л.В. 371
Трофимова М.С. 203
Турсунова А.К. 233, 235
Тютерева Е.В. 248, 333
354, 374
390, 402
428
Ульяновская Е.В. 133
Утарбаева А.Ш. 233, 235
Федина Е.О. 46
Федорова К.А. 46
Федураев П.В. 251, 254
359

Феоктистова А.В. 141
Филипцова Г.Г. 256
Фоменков А.А. 192
Фурс О.В. 260
Хади М. 285
Хайруллин Р.М. 74, 147
263
Хашимова Н.Р. 59, 267
Хрипач В.А. 125
Чабан И.А. 66
Часов А.В. 270, 273
Чебан Е.В. 324
Чебоненко О.В. 233, 235
Черепанова Е.А. 277, 288
Чигинцова А.В. 93
Чикун П.В. 402
Чиркова Т.В. 435
Чичко А.А. 354
Чмелёва С.И. 242
Чукина Н.В. 162
Чупахина Г.Н. 254
Чухряева М.И. 279
Шагрудинова П.Ш. 43
Шаймуллина Г.Х. 182
Шакирова Ф.М. 46, 48
70, 150
166
Шарипова Г.В. 52, 56
Шевчук Т.В. 260
Шелякин М.А. 432
Шестакова В.В. 133
Шиков А.Е. 435
Широких И.Г. 62
Шушарина Н.Н. 80
Юлдашев Р.А. 46, 348
Юрин В.М. 256
Яковец О.Г. 281
Яковлева И.М. 438
Якушенкова Т.П. 285
Ярмухаметова И.А. 363
Яруллина Л.Г. 288
Ястреб Т.О. 292

знак информационной продукции согласно Федеральному закону от 29.12.2010 г. №436-ФЗ

12+

Научное издание

МАТЕРИАЛЫ II МЕЖДУНАРОДНОГО СИМПОЗИУМА «МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ РЕДОКС-МЕТАБОЛИЗМА РАСТЕНИЙ» И МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ ШКОЛЫ «РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЖИЗНИ РАСТЕНИЙ»

(Уфа, 26 июня – 1 июля 2017 г.)

Печатается в авторской редакции

Комп. верстка *Д.А. Галиуллин*
Дизайн обложки *А.В. Сорокань*

Сдано в набор 02.06.2017. Подписано в печать 14.06.2017.
Формат 60x84/16. Бумага офсетная. Гарнитура «Times».
Печать ризографическая. Усл. печ. л. 25,9 Уч.-изд. л. 20,9
Тираж 150 экз. Заказ № 93 Цена договорная.

ООО «Первая типография»
450015, г. Уфа, ул. К. Маркса, 65; Тел. +7 (347) 266-10-69
https://ufaprint.net; ufaprint.net@gmail.com

Отпечатано в ООО «Первая типография»
в полном соответствии с предоставленными оригинал-макетами.
450015, г. Уфа, ул. К. Маркса, 65; Тел. +7 (347) 266-10-69
ufaprint.net@gmail.com; https://ufaprint.net
в соответствии с представленным оригинал-макетом

Симпозиум и Школа организованы при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований проект №17-04-20237 и Российского научного фонда проект №15-14-30008.

ГЕНЕРАЛЬНЫЕ СПОНСОРЫ:

ЗАО «БиоХимМак»
119992, Москва, Ленинские Горы,
МГУ им. М.В. Ломоносова, д. 1, стр. 11

www.biochemmack.ru

Merck
115054 Москва, ул. Валовая, д. 35
www.merck.ru

СПОНСОРЫ:

ООО «Агентство Химэксперт»
119180, г. Москва,
ул. Большая Якиманка, д.22

www.khimexpert.ru

ООО «Диаэм»
127299, г. Москва,
ул. Космонавта Волкова, д. 10, стр. 1

www.dia-m.ru