

**2018. № 3(1)**

**ИЗВЕСТИЯ  
УФИМСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

## СОДЕРЖАНИЕ

№ 3(1). 2018

### БИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ И ГЕНЕТИКА

- А.М. Авальбаев, Р.А. Юлдашев, К.А. Федорова, Ч.Р. Аллагулова, Р.И. Гильманова, Е.О. Федина, Н.В. Петрова, Ф.Г. Каримова, Ф.М. Шакирова*  
Вклад изменений в протеоме и тирозиновом фосфопротеоме в реализацию ростстимулирующего действия метилжасмоната на проростки пшеницы ..... 5
- Ч.Р. Аллагулова, А.М. Авальбаев, Р.А. Юлдашев, Ф.М. Шакирова*  
Сравнительный анализ защитного действия 6-бензиламинопурина и метилжасмоната на проростки пшеницы в условиях дефицита влаги ..... 11
- Алмуграби Есраа, М.И. Калимуллин, О.А. Тимофеева*  
Фитохимический состав *Brassica oleracea var. Sabellica* в разных условиях выращивания ..... 16
- А.А. Алрашиди, Е.А. Калашникова, Р.Н. Киракосян*  
Изучение биологической активности растительных экстрактов *Withania somnifera* L. in vitro ..... 22
- Г.Р. Ахиярова, Р.С. Иванов, Д.С. Веселов, С.Ю. Веселов, Г.Р. Кудоярова*  
Влияние абсцизовой кислоты на содержание ауксинов и рост боковых корней у растений ячменя ..... 29
- Г.В. Беньковская, Ю.М. Никоноров*  
Молекулярные механизмы неспецифической устойчивости к инсектицидам у колорадского жука: активация транскрипции генов рецепторных и запасных белков ..... 36
- Э.Г. Биалова, М.М. Ишмуратова, Ф.В. Садыкова*  
Особенности развития прегенеративных растений лимонов и цитронов в культуре in vitro ..... 41
- Е.В. Большакова, И.С. Емельянова, А.С. Лукаткин*  
Влияние питательных сред и регуляторов роста на органогенез орхидей in vitro ..... 48
- Я.В. Валова, Т.Г. Кутлина, Д.О. Каримов, Г.Ф. Мухаммадиева, Н.Ю. Хуснутдинова, Д.А. Смолянкин, Э.Ф. Ретина, А.Б. Бакиров*  
Анализ экспрессии генов *Cdkn1a* и *RIPK1* при индуцированном окислительном стрессе у крыс ..... 54
- Г.Х. Вафина, Р.С. Иванов, Э.А. Иванова*  
Анализ *Arg-X* протеолитической активности в трипсиноподобных комплексах супраструктур клеточных ядер в условиях влияния бутирата натрия при прорастании зародышей пшеницы ..... 59

<i>С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, Т.В. Нужная, И.В. Максимов</i> Роль НАДФН-оксидазного сигнального каскада в развитии устойчивости мягкой яровой пшеницы к возбудителю септориоза <i>Stagonospora nodorum</i> Berk .....	66
<i>Ш.Н. Галимов, А.Р. Гайсина, З.Г. Хайбуллина, Э.Ф. Галимова</i> Редокс-состояние пиридиннуклеотидов, уровень кальция и циклического АМФ в семенной плазме ассоциированы с качеством эякулята при идиопатическом бесплодии.....	75
<i>Х.Г. Ганбаров, А.Х. Сафарова, С.М. Шафиева</i> Протеолитическая активность грибов рода <i>Aspergillus</i> , выделенных из почв Азербайджана .....	80
<i>М.И. Гарипова, С.А. Башкатов, А.А. Ямалеева, Г.С. Гималетдинова</i> Определение углеводной специфичности лектинов плодовых тел <i>Agaricus arvensis</i> , <i>Armillariella mellea</i> и <i>Cantharellus cibarius</i> .....	85
<i>Л.Т. Гильмутдинова, Р.Р. Кудаярова, Б.Р. Гильмутдинов, Э.М. Назарова, Д.Р. Исеева, К.С. Ямалетдинов</i> Биохимические механизмы лечебно-профилактического действия кумыса при атерогенных дислипидемиях .....	90
<i>А.С. Григориади, В.О. Цветков, А.А. Базунова, В.П. Захаров</i> Оценка биологической активности почвы и её участия в деструкции полимерных композитов на основе вторичного полипропилена и наполнителя из растительного сырья.....	95
<i>А.С. Григориади, Г.Г. Багаутдинова</i> Влияние биопрепарата «Метаболит» на комплексы микромицетов в ризосфере и филлосфере сахарной свеклы в условиях загрязнения почвы нефтяными углеводородами.....	102
<i>А.В. Дерюгина, А.Г. Самоделкин, М.Н. Иващенко, П.С. Игнатъев, А.А. Белов, М.Н. Таламанова</i> Оценка влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на морфологию эритроцитов при стрессе методом лазерной интерференционной микроскопии .....	108
<i>М.А. Джаубермезов, Н.В. Екомасова, С.С. Литвинов, Э.К. Хуснутдинова</i> Гаплогруппа J2a-M410 в субэтнических группах балкарцев по данным микросателлитного разнообразия.....	113

## ПАМЯТИ УЧЕНОГО

Памяти Ибрагимова Рината Исмагиловича.....	117
--	-----

## CONTENTS

---

---

2018. № 3(1)

---

---

### BIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND GENETICS

- A.M. Avalbaev, R.A. Yuldashev, K.A. Fedorova, Ch.R. Allagulova, R.I. Gilmanova, E.O. Fedina, N.V. Petrova, F.G. Karimova, F.M. Shakirova*  
Changes in the proteome and tyrosine phosphoproteome contribute to realization of growth promotive action of methyl jasmonate on wheat seedlings ..... 5
- Ch.R. Allagulova, A.M. Avalbaev, R.A. Yuldashev, F.M. Shakirova*  
Comparative analysis of 6-benzylaminopurin and methyl jasmonate protective action on wheat seedlings under the water deficit conditions ..... 11
- Almughraby Esraa, M.I. Kalimullin, O.A. Timofeeva*  
Phytochemical composition of *Brassica oleracea* var. *Sabellica* in different growing conditions ..... 16
- A.A. Alrashidi, E.A. Kalashnikova, R.N. Kirakosyan*  
Study of biological activity of plant extracts of *Withania somnifera* L. in vitro ..... 22
- G.R. Akhiyarova, R.S. Ivanov, D.S. Veselov, S.Yu. Veselov, G.R. Kudoyarova*  
Abscisic acid influence on the content of auxin and growth of lateral roots of barley plants ..... 29
- G.V. Benkovskaya, Yu.M. Nikonorov*  
Molecular mechanisms of non-specific tolerance to insecticides in colorado potato beetle: activation of genes transcription of receptor and store proteins ..... 36
- E.G. Bilalova, M.M. Ishmuratova, F.V. Sadykova*  
Features of development of pregenerative plants of lemons and citrons in culture in vitro ..... 41
- E.V. Bolshakova, I.S. Emelyanova, A.S. Lukatkin*  
The effect of nutrient media and growth regulators on the organogenesis of orchids in vitro ..... 48
- Ya.V. Valova, T.G. Kutlina, D.O. Karimov, G.F. Mukhammadiyeva, N.Yu. Khusnutdinova, D.A. Smolyankin, E.F. Repina, A.B. Bakirov*  
Analysis of the expression of Cdkn1a and RIPK1 genes in induced oxidative stress in rats ..... 54
- G.H. Vafina, R.S. Ivanov, E.A. Ivanova*  
Analysis of *Arg-X* proteolytic activity of trypsin-like complexes of nuclear suprastructures under the influence of sodium butyrate during the germination of wheat germs ..... 59



<i>S.V. Veselova, G.F. Burkhanova, T.V. Nuzhnaya, I.V. Maksimov</i> Effect of NADPH oxidases cascade on mechanisms regulating defense common wheat reactions under the disease <i>Stagonospora nodorum</i> Blotch.....	66
<i>Sh.N. Galimov, A.R. Gaisina, Z.G. Khaybullina, E.F. Galimova</i> Redox-state of pyridinnucleotides, calcium level and cyclic AMP in seminal plasma associated with sperm quality in idiopathic infertility .....	75
<i>Kh.G. Ganbarov, A.X. Safarova, S.M. Shafiyeva</i> Proteolitic activity of fungi <i>Genus aspergillus</i> , isolated from soil of Azerbaijan.....	80
<i>M.I. Garipova, S.A. Bashkotov, A.A. Yamaleeva, G.S. Gimaletdinova</i> Carbohydrate specify of <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Armillariella mellea</i> and <i>Agaricus arvensis</i> lectins determination.....	85
<i>L.T. Gilmutdinova, R.R. Kudayarova, B.R. Gilmutdinov, E.M. Nazarova, D.R. Iseyeva,</i> <i>K.S. Yamaletdinov</i> Biochemical mechanisms of the medicinal and preventive action of kumys at atherogenic dislipidements.....	90
<i>A.S. Grigoriadi, V.O. Tsvetkov, A.A. Bazunova, V.P. Zakharov</i> Evaluation of the biological activity of the soil and its participation in the destruction of polymer composites based on secondary polypropylene and filler from vegetable raw materials.....	95
<i>A.S. Griroriadi, G.G. Bagautdinova</i> Effect of biological product “Metabolite” on mycological complexes in rhizosphere and fillophfere of the sugar beet in the conditions of soil pollution by oil hydrocarbons .....	102
<i>A.V. Deryugina, A.G. Samodelkin, M.N. Ivashchenko, P.S. Ignatiev, A.A. Belov,</i> <i>M.N. Talamanova</i> Evaluation of the effect of low-intensity laser radiation on morphology red blood cells under stress by laser interference microscopy .....	108
<i>M.A. Dzhaubermезov, N.V. Ekomasova, S.S. Litvinov, E.K. Khusnutdinova</i> Haplogroup J2a -M410 in sub-ethnic groups of balkars according to microsatellite diversity.....	113

## IN MEMORIAM

In memory of Rinat Ibragimov.....	117
-----------------------------------	-----

УДК 581.1

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-5-10

**ВКЛАД ИЗМЕНЕНИЙ В ПРОТЕОМЕ И ТИРОЗИНОВОМ ФОСФОПРОТЕОМЕ  
В РЕАЛИЗАЦИЮ РОСТСТИМУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ  
МЕТИЛЖАСМОНАТА НА ПРОРОСТКИ ПШЕНИЦЫ**

© А.М. Авальбаев, Р.А. Юлдашев, К.А. Федорова, Ч.Р. Аллагулова, Р.И. Гильманова,  
Е.О. Федина, Н.В. Петрова, Ф.Г. Каримова, Ф.М. Шакирова

Исследовали влияние метилжасмоната (МеЖ) в оптимальной в стимуляции роста концентрации 0.1 мкМ на распределение растворимых белков и уровень тирозинового фосфорилирования полипептидов проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Выявлено, что МеЖ оказывал активирующий эффект на протеом проростков пшеницы, о чем свидетельствует интенсификация сигналов ряда белков, в частности, участвующих в фотосинтезе (малая и большая субъединицы рибулозобисфосфат карбоксилазы (РБФК), активизатора РБФК, фруктозо-бисфосфат альдолаза, РБФК-связывающий белок), а также в регуляции роста и энергетического обмена растений (актин,  $\alpha$ -тубулин, АТФ-синтаза, глутаминсинтетаза). Кроме того, обработка МеЖ вызвала увеличение уровня тирозинового фосфорилирования ряда полипептидов проростков пшеницы, в том числе, и некоторых идентифицированных белков фотосинтеза, роста и энергетического обмена (фруктозо-бисфосфат альдолаза, актин, глутаминсинтетаза). Таким образом, выявленный нами ранее ростстимулирующий эффект метилжасмоната на растения пшеницы может являться следствием увеличения под действием гормона содержания белков и повышения уровня тирозинового фосфорилирования полипептидов, вовлеченных в интенсификацию метаболизма клеток.

Ключевые слова: метилжасмонат, протеом, посттрансляционные модификации белков, фосфорилирование белков по тирозину, *Triticum aestivum* L.

**Введение.** Жасмоновая кислота и ее активные производные, в частности метилжасмонат (МеЖ), объединены в группу эндогенных регуляторов роста и развития растений жасмонатов,

АВАЛЬБАЕВ Азамат Мэлсович – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: avalbaev@yahoo.com

ЮЛДАШЕВ Руслан Адикович – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: yuldashevra@gmail.com

ФЕДОРОВА Кристина Александровна, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: kristina-iva@yandex.ru

АЛЛАГУЛОВА Чулпан Рифовна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: allagulova-chulpan@rambler.ru

ГИЛЬМАНОВА Регина Ильдаровна, Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ  
РАН, e-mail: regina.gilmanova@qip.ru

ФЕДИНА Евгения Олеговна – к.б.н., Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ  
РАН, e-mail: lightsolo@yandex.ru

ПЕТРОВА Наталья Валентиновна – к.б.н., Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ  
КазНЦ РАН, e-mail: npetrova@inbox.ru

КАРИМОВА Фатима Габдуллазяновна – д.б.н., Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ  
КазНЦ РАН, e-mail: karimova@mail.knc.ru

ШАКИРОВА Фарида Миннихановна – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: shakirova@anrb.ru

участвующих в регуляции интегральных физиологических процессов, таких как прорастание семян, рост корней, транспорт фотоассимилятов, формирование генеративных органов, цветение, формирование семян, созревание плодов и фруктов, старение и ряда других [1]. Вместе с тем, существует большой массив данных, свидетельствующих о вовлечении жасмонатов в регуляцию защиты растений при воздействии стрессов как биотической, так и абиотической природы [1, 2]. Таким образом, разнообразие регуляторного действия жасмонатов в растениях в норме и при стрессе послужило основанием к причислению их к классу фитогормонов [1].

Сведения о вовлечении жасмонатов в регуляцию разнообразных физиологических процессов, лежащих в основе жизнедеятельности растений [1, 2], указывают на активное влияние этих фитогормонов на протеом. Следует отметить, что в настоящее время протеомный анализ находит широкое применение как мощный и перспективный инструмент для изучения молекулярных механизмов действия фитогормонов [3]. Однако, сведений о спектре белков, вовлеченных в реализацию физиологического действия жасмонатов в растениях, пока не так много. Так, в частности, на растениях кукурузы показано, что чувствительные к обработке метилжасмонатом белки вовлекаются в такие важные процессы, как фотосинтез и энергетический обмен (38.4%), фолдинг и деградация белков (15.0%), стресс (11.7%) и редокс-метаболизм (8.3%) [2].

В настоящее время особый интерес вызывает исследование молекулярных механизмов сигналинга жасмонатов. Ключевую роль в преобразовании и передаче сигналов в клетке играет фосфорилирование/дефосфорилирование белков, которое преимущественно осуществляется по остаткам аминокислот серина, треонина, гистидина и тирозина [4, 5]. Несмотря на то, что тирозиновое фосфорилирование у растений менее изучено, чем сериновое и треониновое, и составляет относительно небольшую долю от общего фосфорилирования, исследования последнего времени показали, что оно играет важную роль в распознавании и дальнейшем формировании ответа клеток на внеклеточные сигналы, в том числе на обработку фитогормонами [5].

В предыдущих исследованиях нами были получены данные о стимуляции ростовых процессов проростков пшеницы в ходе их обработки метилжасмонатом в концентрации 0.1 мкМ [6], что свидетельствует в пользу воздействия МеЖ на белковый обмен в растениях пшеницы. В связи с этим, цель работы состояла в исследовании влияния метилжасмоната на спектр растворимых белков растений пшеницы, уровень их фосфорилирования по тирозину и масс-спектрометрической идентификации наиболее чувствительных к обработке метилжасмонатом полипептидов.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Башкирская 26. Семена после стерилизации проращивали в течение 3 суток (16 часовая световая день, 15 клк) при 22-24°C. После отделения эндосперма проростки помещали на раствор 2%-ной сахарозы на сутки для снятия раневого эффекта, после чего проростки переносили на 24 ч на среду, содержащую смесь 2% сахарозы и 0.1 мкМ метилжасмоната. Контролем служили не подвергнутые действию фитогормона проростки.

Для анализа использовали побеги, которые отделяли от корней и фиксировали в жидком азоте. Экстракцию растворимых белков проводили с помощью буфера, содержащего 50 мМ Нерес КОН, pH 7.5; 1 мМ дитиотреитол (ДТТ); 1 мМ фенолметилсульфонилфторид; 10 мМ ЭГТА; 0.1 мМ ортованадат натрия; 1 мМ теофиллин и 3% поливинилпирролидон. Гомогенат центрифугировали при 12000 g и 4°C в течение 10 мин. Белки супернатанта осаждали ледяным 80% ацетоном, трижды промывали ледяным ацетоном, затем высушивали и хранили при -85°C.

Белки разделяли методом двумерного электрофореза (2DE), количество нанесенного белка составляло 150 мкг [7]. Выявление белков, фосфорилированных по тирозину, осуществляли с помощью иммуоблоттинга с использованием специфичных к фосфотирозину антител PY20 ("Amersham", Англия) [7].

Для идентификации белков из геля вырезали белковые пятна и проводили триптический гидролиз белка. Масс-спектры фрагментов белков получали на тандемном MALDI-TOF-TOF масс-спектрометре Ultraflex II («Bruker», Герма-

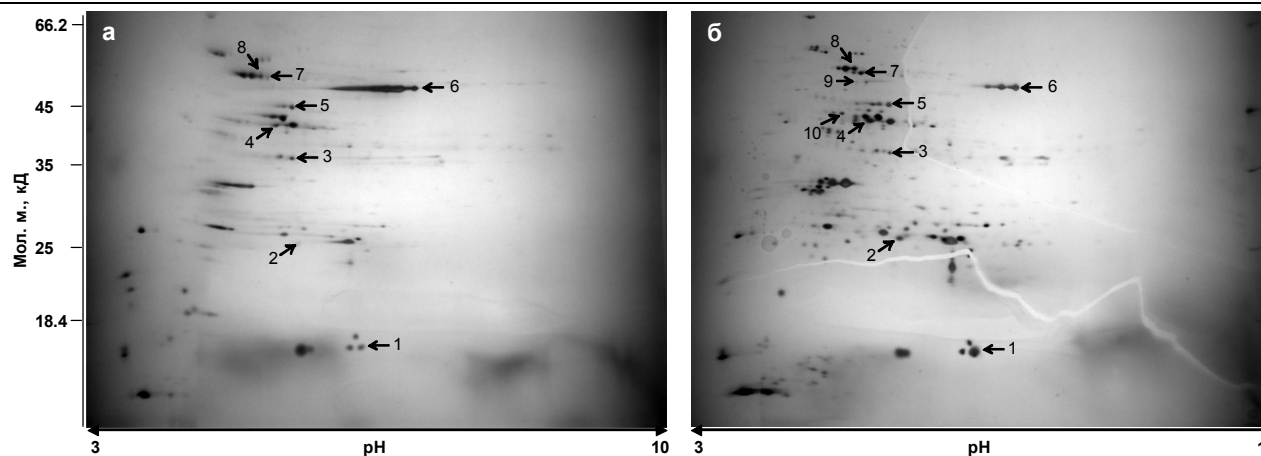


Рис. 1. Разделение растворимых полипептидов побегов 4-суточных проростков пшеницы при помощи 2DE. а – контроль; б – 0.1 мкМ МеЖ. Идентифицированные белки пронумерованы и информация о них приведена в таблице 1

ния), оснащенном УФ-лазером, в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Поиск белков осуществлялся в базах данных NCBI и UniProt (подбаза – растения). Регистрацию масс-спектров и идентификацию белков проводили в Междисциплинарном центре протеомных исследований при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Эксперименты проводили в двух–трех повторностях, приведены результаты типичного опыта.

**Результаты и обсуждение.** Ранее нами было выявлено ростстимулирующее действие метилжасмоната в концентрации 0.1 мкМ на растения пшеницы [6], что свидетельствует о вызываемых обработкой фитогормоном протеомных перестройках. На рис. 1 представлена картина разделения методом двумерного электрофореза растворимых белков побегов проростков пшеницы в контрольном варианте (рис. 1а) и при 24-часовом выдерживании на растворе МеЖ в концентрации 0.1 мкМ (рис. 1б). Проведение 2DE в диапазоне pH 3-10 позволило выявить МеЖ-индуцированное увеличение содержания большого количества полипептидов в широком диапазоне молекулярных масс и изоэлектрических точек (рис. 1). Выявленная ранее стимуляция роста проростков пшеницы под влиянием МеЖ может являться следствием изменения содержания ряда белков под действием гормонов. В связи с этим, далее с помощью

MALDI-TOF масс-спектрометрии была проведена идентификация белков, индуцируемых метилжасмонатом.

Характеристики и названия идентифицированных белков, которые были разделены по функциональным группам, представлены в таблице 1. Среди них особого внимания заслуживают белки фотосинтеза, в числе которых обнаруживались белки как световой, так и темновой фазы этого фундаментального для растений процесса. В частности, нами обнаружен предшественник полипептида (№ 2), входящего в состав кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II. Вместе с тем, обнаружены белки фотосинтетической ассимиляции CO<sub>2</sub> цикла Кальвина, среди которых выделяются изоформы малой (№ 1) и большой (№ 6) субъединиц рибулозобисфосфаткарбоксилазы (РБФК), которые составляют основу холофермента РБФК – ключевого фермента фотосинтеза. В то же время, под влиянием МеЖ происходило увеличение содержания β-субъединицы хлоропластного РБФК-связывающего белка (№ 8), необходимого для эффективного функционирования холофермента РБФК. Помимо этого были идентифицированы и другие ферменты цикла Кальвина, в частности, хлоропластная фруктозо-1,6-бисфосфат альдолаза (№ 3) и активаза РБФК (№ 4).

Наряду с белками, участвующими в фотосинтезе, нами идентифицированы белки, вовлеченные в рост и энергетический обмен растений (табл. 1), увеличение содержания которых может вносить важный вклад в МеЖ-индуциро-

Характеристика растворимых белков *Triticum aestivum* идентифицированных с помощью MALDI-TOF MS

№ пятна <sup>а</sup>	№ белка в базе NCBI или UniProt	Достоверность поиска <sup>б</sup>	Идентифицированные белки <i>Triticum aestivum</i> и тождественные белкам других организмов <sup>в</sup>
Фотосинтез			
1	gi 11990895	100	Малая субъединица РБФК <i>Triticum aestivum</i>
2	gi 21837	104	Полипептид, входящий в состав кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II <i>Triticum aestivum</i>
3	gi 357157399	76	Хлоропластная фруктозо-1,6-бисфосфат альдолаза <i>Brachypodium distachyon</i>
4	gi 723047999	130	Активаз РБФК <i>Triticum aestivum</i>
6	gi 14017580	221	Большая субъединица РБФК <i>Triticum aestivum</i>
8	gi 474438538	74	$\beta$ -субъединица хлоропластного РБФК-связывающего белка <i>Triticum urartu</i>
Рост и энергетический обмен			
5	ACT1_ORYSI	64	Актин 1 <i>Oryza sativa</i>
7	gi 473798701	61	$\beta$ -субъединица митохондриальной АТФ-синтазы <i>Triticum urartu</i>
9	gi 90289596	81	$\alpha$ -тубулин <i>Triticum aestivum</i>
10	GLNA2_HORVU	58	Хлоропластная глутаминсинтетаза <i>Hordeum vulgare</i>

Примечание: <sup>а</sup> № пятна на 2D-геле.

<sup>б</sup> Достоверность идентификации белков (Score) в базе данных NCBI и UniProt (подбаза – растения) с использованием программы Mascot, где предел отсечения составлял 58 ( $p < 0.05$ ). Критерием достоверности поиска является значение, характеризующееся уникальностью регистрируемого набора масс для белка из базы данных, количеством предполагаемых пептидов и полнотой перекрывания последовательности.

<sup>в</sup> Название белка согласно базе данных NCBI и UniProt.

ванную интенсификацию метаболизма растений пшеницы. Так, нами идентифицированы актин (№ 5) и  $\alpha$ -субъединица тубулина (№ 9), вовлеченные в процесс деления клеток. Среди белков, задействованных в энергетическом обмене, идентифицированы  $\beta$ -субъединица митохондриальной АТФ-синтазы (№ 7) и хлоропластная глутаминсинтетаза (№ 10), являющаяся одним из ключевых ферментов ассимиляции аммония, образующегося, в частности, при фотодыхании и катализирующей синтез глутамин, входящего в состав многих белков и служащего донором азота при синтезе пурина.

В литературе имеются данные о чувствительности белков фотосинтеза, роста и энерге-

тического обмена к обработке метилжасмонатом. Так, в частности, на растениях арабидопсиса и кукурузы показано, что большинство чувствительных к обработке метилжасмонатом белков составили белки фотосинтеза и энергетического обмена [2, 8]. Необходимо отметить, что в исследовании Chen et al. [8] влияние метилжасмоната на накопление белков фотосинтеза, роста и энергетического обмена носило негативный характер, что, вероятно, обусловлено чрезвычайно высокой концентрацией гормона (200 мкМ). В проведенных нами экспериментах продемонстрировано стимулирующее влияние МеЖ при использовании его в низкой концентрации (0.1 мкМ) на протеом побегов проростков

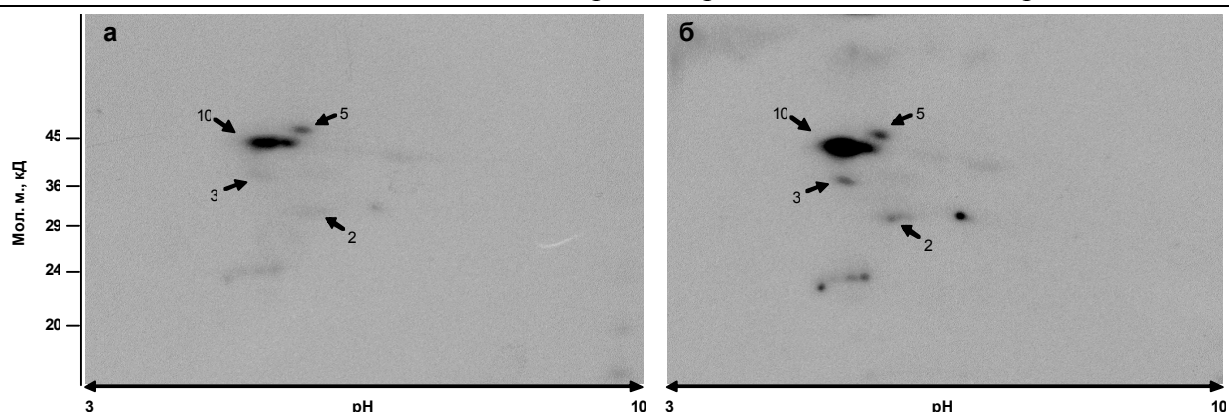


Рис. 2. Фосфорилирование по тирозину растворимых белков побегов 4-суточных проростков пшеницы. а – контроль; в – 0.1 мкМ МеЖ. Стрелками обозначены идентифицированные полипептиды, информация о них приведена в таблице 1

пшеницы, сопровождающееся увеличением содержания белков фотосинтеза, роста и энергетического обмена растений, что вносит важный вклад в реализацию ростстимулирующего действия этого фитогормона на проростки пшеницы.

Отдельный интерес представлял анализ влияния МеЖ на фосфорилирование белков проростков пшеницы по тирозину, являющегося ключевой реакцией сигнальных систем клеток и необходимым регуляторным компонентом многих интегральных процессов клеток, в том числе, поддержания клеточного гомеостаза [5]. С помощью иммуноблоттинга с применением высокоспецифичных антител к фосфотирозину выявлено, что обработка МеЖ вызывает заметные изменения в уровне тирозинового фосфорилирования белков побегов проростков пшеницы (рис. 2).

Среди белков, уровень тирозинового фосфорилирования которых увеличивался под действием гормонов, были идентифицированы белки фотосинтеза, в частности предшественник полипептида, входящего в состав кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II (№ 2) и фруктозо-бисфосфат альдолаза (№ 3). Можно предположить, что одним из механизмов регуляции формирования холофермента РБФК и его активности может выступать изменение тирозинового фосфорилирования субъединиц РБФК. Так показано, что малые субъединицы ассоциируются с большими субъединицами с образованием активного комплекса РБФК только в случае их фосфорилирования [9]. Кроме того, выявлена корреляция между скоростью транспорта пред-

шественников малых субъединиц РБФК в хлоропласты с изменением их фосфорилирования [10].

Вместе с тем, нами были идентифицированы фосфотирозиновые белки, которые принимают участие в процессах роста и энергетического обмена растений – актин (№ 5), задействованный в пролиферации клеток, а также глутаминсинтетаза (№ 10), один из ключевых ферментов азотного обмена. В литературе хорошо известно, что тирозиновое фосфорилирование полипептидов занимает относительно небольшую долю от общего фосфорилирования [5]. Тем не менее, отмечается ключевая роль тирозинового фосфорилирования в регуляции важнейших физиологических процессов в клетках, в частности, деления и дифференцировки клеток, поддержания клеточного гомеостаза [5, 7]. Можно предположить, что индуцируемое МеЖ изменение уровня тирозинового фосфорилирования белков, вовлеченных в интенсификацию метаболизма клеток, вносит важный вклад в проявление ростстимулирующего эффекта МеЖ.

Таким образом, выявленная нами ранее стимуляция роста проростков пшеницы под влиянием низкой концентрации метилжасмоната (0.1 мкМ) может быть обусловлена МеЖ-индуцированным увеличением содержания белков и уровня тирозинового фосфорилирования полипептидов, вовлеченных в интенсификацию метаболизма клеток.

*Работа выполнена в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350029-1) при частичной поддержке гранта РФФИ № 17-04-01853\_а, с привлечением приборного парка ЦКП*

«Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Wasternack C., Hause B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany* // *Ann. Bot.* 2013. V. 111. P. 1021–1058.
2. Černý M., Novák J., Habánová H., Cerna H., Brzobohatý B. Role of the proteome in phytohormonal signaling // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1864. P. 1003-1015.
3. Zhang Y.T., Zhang Y.L., Chen S.X., Yin G.H., Yang Z.Z., Lee S., Liu C.G., Zhao D.D., Ma Y.K., Song F.Q., Bennett J.W., Yang F.S. Proteomics of methyl jasmonate induced defense response in maize leaves against Asian corn borer // *BMC Genomics.* 2015. 16:224. doi: 10.1186/s12864-015-1363-1
4. Wu L., Hu X., Wang S., Tian L., Pang Y., Han Z., Wu L., Chen Y. Quantitative analysis of changes in the phosphoproteome of maize induced by the plant hormone salicylic acid // *Sci. Rep.* 2015. 5:18155. doi: 10.1038/srep18155
5. Shankar A., Agrawal N., Sharma M., Pandey A., Pandey G.K. Role of protein tyrosine phosphatases in plants // *Curr. Genomics.* 2015. V. 16. P. 224–236.
6. Avalbaev A., Yuldashev R., Fedorova K., Somov K., Vysotskaya L., Allagulova Ch., Shakirova F. Exogenous methyl jasmonate regulates cytokinin content by modulating cytokinin oxidase activity in wheat seedlings under salinity // *J. Plant Physiol.* 2016. V. 191. P. 101-110.
7. Федина Е.О., Каримова Ф.Г., Тарчевский И.А. Влияние брассинолида на тирозиновое фосфорилирование белков листьев гороха // *Биохимия.* 2006. Т. 71. Вып. 4. С. 525–532.
8. Chen Y., Pang Q., Dai S., Wang Y., Chen S., Yan X. Proteomic identification of differentially expressed proteins in Arabidopsis in response to methyl jasmonate // *J. Plant Physiol.* 2011. V. 168. P. 995–1008.
9. Wang Y., Wang Y., Zhao Y.B., Chen D.M., Han Z.H., Zhang X.Z. Protein phosphorylation differs significantly among ontogenetic phases in Malus seedlings // *Proteome Sci.* 2014. 12:31. doi:10.1186/1477-5956-12-31
10. Martin T., Sharma R., Sippel C., Waegemann K., Soll J., Vothknecht U.C. A protein kinase family in Arabidopsis phosphorylates chloroplast precursor proteins // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 40216–40223.

### CHANGES IN THE PROTEOME AND TYROSINE PHOSPHOPROTEOME CONTRIBUTE TO REALIZATION OF GROWTH PROMOTIVE ACTION OF METHYL JASMONATE ON WHEAT SEEDLINGS

© A.M. Avalbaev<sup>1</sup>, R.A. Yuldashev<sup>1</sup>, K.A. Fedorova<sup>1</sup>, Ch.R. Allagulova<sup>1</sup>, R.I. Gilmanova<sup>2</sup>, E.O. Fedina<sup>2</sup>, N.V. Petrova<sup>2</sup>, F.G. Karimova<sup>2</sup>, F.M. Shakirova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of RAS, 71, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

<sup>2</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Centre of RAS, 2, ulitsa Lobachevskogo, 420111, Kazan, Russian Federation

The effect of methyl jasmonate (MeJA) in concentration optimal for wheat plant growth (0.1 μM) on the distribution of soluble proteins and tyrosine phosphorylation in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) was studied. MeJA was shown to have an promotive effect on proteome of wheat plants as evidenced by the intensification of protein signals, in particular those involved in photosynthesis (small and large subunits of ribulose-bisphosphate carboxylase (RuBisCO), RuBisCO activase, fructose-bisphosphate aldodase, RuBisCO-binding protein), growth and energy metabolism of plants (actin, α-tubulin, glutamine synthetase). Meanwhile, MeJA treatment caused an increase in the level of tyrosine phosphorylation of a number of polypeptides, including some identified proteins involved in photosynthesis, growth and energy metabolism (fructose-bisphosphate aldodase, actin, glutamine synthetase). Thus, the growth stimulating effect of methyl jasmonate on wheat plants may be associated with both an increase in the content of proteins and in tyrosine phosphorylation of polypeptides involved in the intensification of cell metabolism.

Keywords: methyl jasmonate, proteome, post-translational modifications of proteins, tyrosine protein phosphorylation, *Triticum aestivum* L.

УДК 581.1; 631.811.982

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-11-15

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ 6-БЕНЗИЛАМИНОПУРИНА И МЕТИЛЖАСМОНАТА НА ПРОРОСТКИ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ВЛАГИ

© Ч.Р. Аллагулова, А.М. Авальбаев, Р.А. Юлдашев, Ф.М. Шакирова

В работе проведен сравнительный анализ влияния 100 нМ метилжасмоната (МеЖ) и 44 нМ 6-бензиламинопурина (БАП) на физиолого-биохимические показатели проростков пшеницы в норме и в условиях моделируемой полиэтиленгликолем (ПЭГ) засухи. Обнаружен сходный по уровню рост стимулирующий и протекторный эффекты МеЖ и БАП на растения пшеницы. Важный вклад в реализацию защитного действия МеЖ и БАП вносит их способность индуцировать транскрипцию *TADHN* гена дегидрина в норме и дополнительно усиливать его экспрессию при стрессе. Полученные данные могут служить важным аргументом в пользу выполнения эндогенными цитокининами роли гормональных интермедиатов в проявлении физиологического действия МеЖ на растения пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., метилжасмонат, цитокинины, дегидрины, транскрипция генов, засуха, абиотический стресс.

Засуха относится к числу наиболее широко распространенных стрессовых факторов внешней среды, оказывающих негативное воздействие на все звенья метаболизма растений и существенно снижающих продуктивность сельскохозяйственных культур [1–4]. Ключевую роль в адаптации растений к стрессовым факторам, вызывающим нарушение водного режима, играет абсцизовая кислота (АБК), регуляторное действие которой связано со способностью этого гормона индуцировать гены широкого спектра защитных белков, в частности, дегидринов [3–6]. В защиту растений от абиотических стрессовых воздействий вовлекаются и другие фитогормоны, в частности жасмонаты, о чем свидетельствуют данные об усилении их биосинтеза при воздей-

ствии неблагоприятных факторов среды и снижении уровня их повреждающего действия на обработанные жасмонатами растения [4, 5, 7].

Ранее нами было выявлено, что инкубирование растений пшеницы в присутствии МеЖ в концентрации 100 нМ приводит к накоплению цитокининов в норме и способствует предотвращению снижения их содержания при воздействии стрессовых факторов среды [8, 9]. Эти данные позволили предположить важную роль эндогенных цитокининов в реализации роста стимулирующего и протекторного действия МеЖ на растения пшеницы, поскольку к настоящему времени ключевая роль цитокининов в регуляции роста и развития, а также адаптации растений к неблагоприятным факторам среды не вы-

АЛЛАГУЛОВА Чулпан Рифовна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: allagulova-chulpan@rambler.ru

АВАЛЬБАЕВ Азамат Мэлсович – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: avalbaev@yahoo.com

ЮЛДАШЕВ Руслан Адикович – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: yuldashevra@gmail.com

ШАКИРОВА Фарида Миннихановна – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: shakirova@anrb.ru



зывает сомнений [8, 9]. Поскольку и цитокинины и жасмонаты характеризуются сочетанием свойств стимуляторов роста и индукторов защитных реакций растений, они весьма привлекательны для практического использования с целью повышения стресс-устойчивости и продуктивности разных культур [4, 7–9]. В связи с этим, интерес вызывает исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе индуцированной этими гормонами устойчивости растений к обезвоживанию. Учитывая, тот факт, что наиболее многочисленной группой белков, накапливаемых в тканях растений при обезвоживании, являются дегидрины [6, 10], можно предположить их участие в реализации протекторного эффекта жасмонатов или цитокининов на растения в условиях дефицита влаги. Цель работы заключалась в сравнительном анализе защитного действия метилжасмоната и цитокинина 6-бензиламинопурина на подвергнутые засухе проростки пшеницы, и оценке вклада *TADHN* гена дегидрина в этот процесс.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили проростки пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Башкирская 26. Семена стерилизовали 96%-ным этанолом и проращивали на смоченной водой фильтровальной бумаге при 21–23°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 15 клк. 3-сут проростки изолировали от эндосперма и инкубировали 24 ч на растворе 2 %-ной сахарозы. После чего 4-сут проростки обрабатывали раствором 44 нМ БАП или 100 нМ МеЖ в смеси с 2%-ной сахарозой в нормальных условиях произрастания в течение разных промежутков времени. В вариантах опыта с предобработкой гормонами с последующей стрессовой обработкой изолированные от эндосперма 3-сут проростки предварительно обрабатывали 44 нМ БАП или 100 нМ МеЖ в смеси сахарозой в течение 24 часов. Затем предобработанные и необработанные гормонами 4-сут проростки подвергали воздействию 12 %-го полиэтиленгликоля (ПЭГ), моделирующего условия засухи, в смеси с 2%-ной сахарозой в течение разных промежутков времени. Контролем во всех вариантах опытов служили проростки, инкубированные на растворе 2%-ной сахарозы. О защитном действии фитогормонов на растения судили по их линейным размерам (длина корня, побега и

целого проростка), а также по интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и проницаемости клеточных мембран проростков. Интенсивность ПОЛ оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА) с помощью цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [8]. О проницаемости клеточных мембран проростков судили по уровню выхода электролитов с использованием кондуктометра ОК 102/1 (Radelkis, Венгрия), измеряя омическое сопротивление водных экстрактов в постоянном токе [8]. Транскрипционную активность *TADHN* гена дегидрина анализировали методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров F (5'-TCCGTGGAAGAGCCCGAGGTTA-3'), R (5'-TTGTCCATGATCTTGCCAGTAGG-3'). Для выравнивания результатов ОТ-ПЦР использовали праймеры F (5'-TTGAGCAACTCATGGACCAG-3'), R (5'-GCTTCCAAGGCACAAACAT-3') для RLI (RNAse L inhibitor-like protein)-гена с конститутивной экспрессией в пшенице [10]. Контролем во всех опытах служили проростки, инкубированные на 2%-ной сахарозе. Эксперименты проводили в трех биологических и четырех-пяти аналитических повторах. На рисунках представлены данные средних арифметических двух - трех независимых опытов и стандартные ошибки, полученных с использованием компьютерных программ Statistica, Microsoft Excel.

**Результаты и обсуждение.** Интегральным показателем степени повреждающего действия стрессовых факторов на растения служат данные об их росте. В связи с этим был проведен сравнительный анализ линейных размеров необработанных и предобработанных БАП или МеЖ проростков пшеницы в норме и при воздействии моделируемой ПЭГ засухи, результаты которого приведены на рис.1. Сама обработка проростков обоими гормонами способствовала активации их роста, о чем судили по длине корней, побегов и целого проростка. При этом метилжасмонат оказал на проростки сопоставимый с действием цитокинина рост-стимулирующий эффект, что отразилось более чем в 20 %-ном увеличении линейных размеров проростков. ПЭГ-моделируемая засуха привела к существенному торможению роста проростков (рис. 1). Вместе с тем предобработанные БАП или МеЖ и подвергнутые стрессу растения характери-

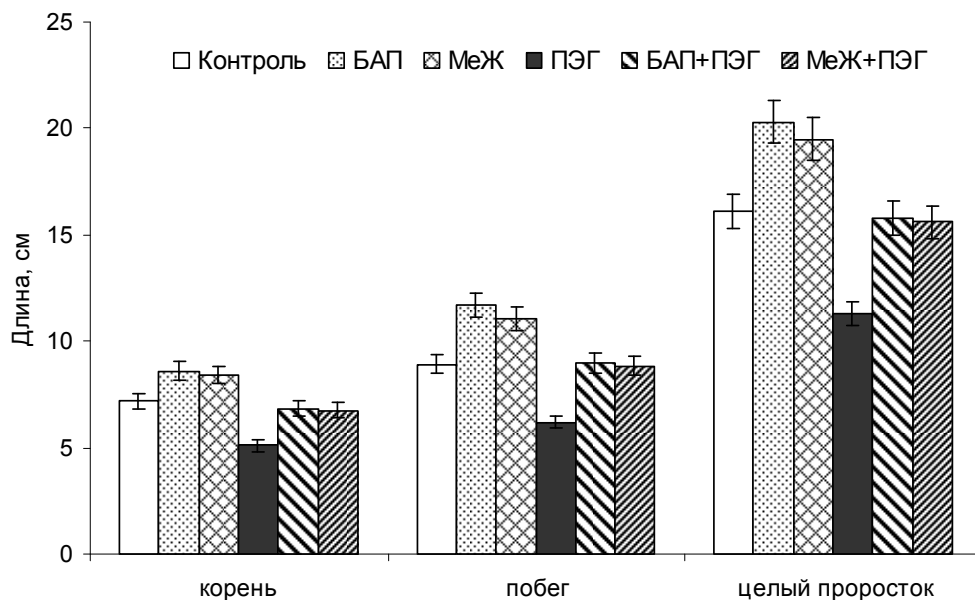


Рис. 1. Линейные размеры корней, побегов и целых 5-сут проростков пшеницы, предобработанных и необработанных 44 нМ БАП или 100 нМ МеЖ и подвергнутых действию засухи, моделируемой 12 %-ным ПЭГ

зовались поддержанием интенсивности ростовых процессов на уровне близком к контролю. Важно отметить, что и цитокинин, и метилжасмонат оказывали сопоставимый по уровню защитный эффект на рост проростков пшеницы.

Известно, что в условиях водного дефицита растения испытывают окислительный стресс, возникающий вследствие избыточной генерации активных форм кислорода (АФК), способных вызывать повреждения мембранных структур [1]. Основываясь на сведениях о способности цитокининов и жасмонатов оказывать влияние на состояние антиоксидантной системы растений [4, 7], можно было ожидать, что предобработка БАП или МеЖ будет способствовать развитию эффективной системы антиоксидантной защиты, обеспечивающей нейтрализацию стресс-индуцируемой продукции АФК. Это в свою очередь должно найти отражение в уменьшении повреждающего действия обезвоживания на целостность мембранных структур, о чем можно судить по показателям перекисного окисления липидов, в частности по содержанию одного из продуктов ПОЛ малонового диальдегида, а также по уровню выхода электролитов из тканей. Воздействие стресса вызвало сильно

выраженный повреждающий эффект на целостность мембранных структур клеток, о котором судили по существенному увеличению содержания МДА и выходу электролитов из тканей (рис. 2).

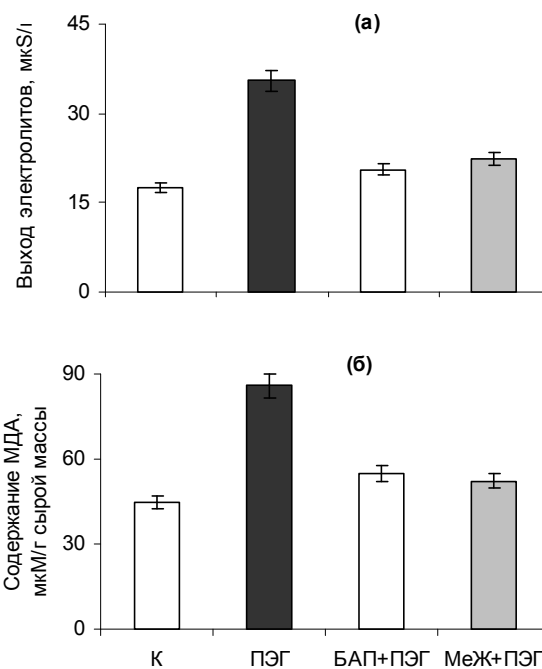


Рис. 2. Влияние предобработки 44 нМ БАП или 100 нМ МеЖ на уровень выхода электролитов (а) и накопление МДА (б) в 4-сут проростках пшеницы, подвергнутых 3 часовому воздействию 12 %-го ПЭГ

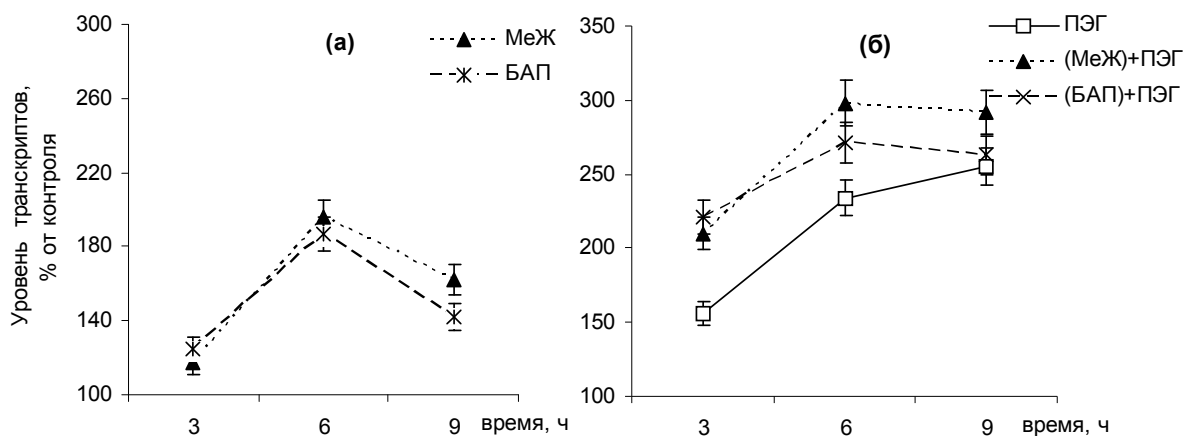


Рис. 3. Накопление транскриптов *TADHN* гена дегидрина в 4-сут проростках пшеницы: (а) в ходе обработки проростков 100 нМ МеЖ или 44 нМ БАП в нормальных условиях произрастания; (б) в проростках, предобработанных МеЖ или БАП и подвергнутых воздействию 12 %-го ПЭГ

Предобработка проростков и БАП, и МеЖ способствовала снижению негативного действия моделируемой ПЭГ засухи на целостность мембранных структур, на что указывают данные по уменьшению уровня стресс-индуцированного накопления МДА и экзоосмоса электролитов (рис. 2).

Важный вклад в формирование устойчивости растений к дефициту влаги вносят белки дегидрины [5, 6, 10]. С целью выявления их участия в развитии МеЖ- или БАП-индуцированной устойчивости пшеницы к дефициту влаги методом ОТ-ПЦР нами был проведен сравнительный анализ динамики транскрипционной активности клонированного ранее *TADHN* гена дегидрина [10] в необработанных и предобработанных гормонами проростках пшеницы в норме и в ходе их инкубирования в присутствии ПЭГ (рис.3). Обработка проростков 100 нМ МеЖ или 44 нМ БАП в нормальных условиях произрастания вызвала в них почти двукратное накопление транскриптов *TADHN* гена (рис 3а). Оба гормона вызывали увеличение уровня экспрессии исследуемого гена, при этом в обоих случаях четко прослеживается транзиторность ответной реакции с максимумом, приходящимся на 6 ч обработки. Моделируемая ПЭГ засуха вызвала в проростках поступательное накопление транскриптов *TADHN* гена, что неудивительно, поскольку дегидрины проявляют высокую чувствительность к стрессовым факторам среды, вызывающим обезвоживание. Так, к 3-м часам воздействия стресса в побегах проростков пше-

ницы выявилось 1.5-кратное усиление транскрипционной активности гена *TADHN* дегидрина в побегах, тогда как к 6-ти часам стресса уровень накопления транскриптов увеличился более чем вдвое и продолжал расти к 9-ти часам стрессового воздействия (рис. 3б). Предобработка проростков МеЖ или БАП способствовала дополнительному индуцируемому ПЭГ увеличению уровня транскриптов *TADHN* гена, что свидетельствует о вовлечении *TADHN* гена дегидрина в проявление защитного действия обоих фитогормонов на растения пшеницы к условиям засухи.

Обсуждая полученные результаты, можно заключить, что исследованные в работе фитогормоны в оптимальных в стимуляции роста концентрациях характеризуются ярко выраженным защитным эффектом на растения пшеницы, подвергнутых дефициту влаги. Обработка проростков и 44 нМ БАП, и 100 нМ МеЖ в течение 24 ч оказывала рост-стимулирующий эффект, о котором судили по значительному увеличению длины корней, побегов и целых растений. При этом предобработка гормонами существенно снизила уровень негативного действия моделируемой ПЭГ засухи на интенсивность ростовых процессов, способствуя поддержанию линейных размеров проростков на уровне контроля. Более того, предобработанные гормонами растения характеризовались поддержанием целостности мембранных структур, поскольку уровень индуцированного обезвоживанием экзоосмоса

электролитов и накопления МДА в них был существенно ниже в отличие от необработанных гормонами и подвергнутых стрессу растений. Важный вклад в проявление преадаптирующего действия и МеЖ, и БАП к последующему воздействию засухи вносит индуцирование под их влиянием транскрипции *TADHN* гена, принадлежащего к классу дегидринов, выполняющих множественные защитные функции в растениях в стрессовых условиях. Данные о сопоставимом по уровню эффекте МеЖ и БАП на показатели роста, содержание МДА, экзоосмос электролитов, накопление транскриптов *TADHN* гена в норме и при стрессе могут служить важным аргументом в пользу высказанного нами ранее предположения о выполнении эндогенными цитокинами роли гормональных интермедиатов в проявлении рост стимулирующего и протекторного действия метилжасмоната на растения пшеницы.

Работа выполнена в рамках госзадания (№ темы АААА-А16-116020350029-1) при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-04-01853\_a) с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Carvalho M.H.C. Drought stress and reactive oxygen species // *Plant Signaling Behaviour*. 2008. V.3 (3). P.156-165.
2. O'Donnell N. H., Möller B. L., Neale A. D., Hamill J. D., Blomstedt C. K., Gleadow R. M. Effects of PEG-induced osmotic stress on growth and dhurrin levels of forage sorghum // *Plant Physiol. Biochem*. 2013. V.73. P.83-92.
3. Osakabe Y., Osakabe K., Shinozaki K., Tran L.-S.P. Response of plants to water stress // *Front. Plant Sci*. 2014. V. 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>.
4. Burgess P., Huang B. Mechanisms of Hormone Regulation for Drought Tolerance in Plants. In: Hossain M., Wani S., Bhattacharjee S., Burritt D., Tran LS. (eds). *Drought Stress Tolerance in Plants*. 2016. V. 1. Springer, Cham. P. 45-75.
5. De Ollas C., Dodd I.C. Physiological impacts of ABA-JA interactions under water-limitation // *Plant Molecular Biology*. 2016. V.91. P.641-650.
6. Liu Y., Song Q., Li D., Yang X., Li D. Multifunctional roles of plant dehydrins in response to environmental stresses // *Front. Plant Sci*. 2017. V. 8. doi: 10.3389/fpls.2017.01018.
7. Per T.S., Khan M. I. R., Anjum N. A., Masood A., Hussain S. J., Khan N. A. Jasmonates in plants under abiotic stresses: Crosstalk with other phytohormones matters // *Environ. Exper. Bot*. 2018. V.145. P. 104-120.
8. 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.
9. Avalbaev A., Yuldashev R., Fedorova K., Somov K., Allagulova C., Shakirova F., Vysotskaya L. Exogenous methyl jasmonate regulates cytokinin content by modulating cytokinin oxidase activity in wheat seedlings under salinity // *J. Plant Physiol*. 2016. V. 191. P. 101-110.
10. Аллагулова Ч.Р., Гималов Ф.Р., Авальбаев А.М., Сахабутдинова А.Р., Юлдашев Р.А., Шакирова Ф.М. Структура дегидрин-подобного гена *TADHN* мягкой пшеницы и участие АБК и 24-эпибрассинолида в активации его экспрессии // *Физиология растений*. 2007. Т. 54. № 1. С. 131-136.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF 6-BENZYLAMINOPURIN AND METHYL JASMASONATE PROTECTIVE ACTION ON WHEAT SEEDLINGS UNDER THE WATER DEFICIT CONDITIONS

© Ch.R. Allagulova, A.M. Avalbaev, R.A. Yuldashev, F.M. Shakirova

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of RAS,  
71, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

A comparative analysis of the effect of 100 nM methyl jasmonate (MeJA) and 44 nM 6-benzylaminopurine (BAP) on the physiological and biochemical parameters of wheat seedlings was performed in normal and under the polyethylene glycol (PEG)-modulated drought conditions. A similar growth-promoting and protective effect of MeJA and BAP on wheat plants was observed. An essential contribution to the protective action of MeJA and BAP is their ability to induce transcription of the *TADHN* dehydrin gene under normal conditions and enhance its expression under stress. The obtained data can serve as an important argument in favor of the fact that endogenous cytokinins can play the role of hormonal intermediates in the realization of the physiological effects of MeJA on wheat plants.

Key words: *Triticum aestivum* L., methyl jasmonate, cytokinins, dehydrins, gene transcription, drought, abiotic stress.

УДК 581.1; 57.04

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-16-21

**ФИТОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ *BRASSICA OLERACEA* VAR. *SABELLICA*  
В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ВЫРАЩИВАНИЯ**

© Алмуграби Есраа, М.И. Калимуллин, О.А. Тимофеева

Впервые в условиях Республики Татарстан проведены исследования по изучению состава биомолекул *Brassica oleracea* var. *Sabellica* в разных условиях выращивания. Капуста кейл относится к морозоустойчивым растениям, произрастающим в широком диапазоне климатических и географических условий, характеризуется высоким содержанием метаболитов, способствующих профилактике и лечению многих заболеваний человека. Цель работы состояла в выявлении особенностей действия природных гормонов (гиббереллиновая кислота, брассинолид) и коммерческих препаратов биостимуляторов роста (экопин, новосил) на содержание белка, сахаров, витамина С, фенольных соединений и флавоноидов в растениях капусты кейл. Посев *Brassica oleracea* var. *sabellica* в полевых условиях проводили в мае 2017 года. На стадии 3-4 листьев растения обрабатывали регуляторами роста путем опрыскивания в следующих концентрациях: гибберелловая кислота  $10^{-6}$ М, новосил 5 г/га, экопин 0,25 г/га, брассинолид  $10^{-6}$ М. Анализы проводили через 90 дней (после первых заморозков, в течение 3 дней ночные температуры были  $-5^{\circ}\text{C}$ ) после обработки. Часть растений после заморозков переносили в лабораторные условия и оставляли отрастать в течение 2 недель при температуре  $20^{\circ}\text{C}$ .

Показано, что *Brassica oleracea* var. *Sabellica*, выращенная в условиях Республики Татарстан, содержит высокое содержание белков, флавоноидов, витамина С. Растения благополучно переносили кратковременное воздействие отрицательными температурами ( $-5^{\circ}\text{C}$  в течение 12 ч 3 раза), восстанавливая метаболизм в короткие сроки (2 недели). Отрастание растений *Brassica oleracea* var. *Sabellica* после кратковременного замораживания сопровождалось увеличением содержания белков, растворимых сахаров, фенольных соединений и флавоноидов в листьях. Показана возможность улучшения вкусовых и питательных качеств *Brassica oleracea* var. *Sabellica* с помощью регуляторов роста. Регуляторы роста по-разному влияли на содержание исследуемых веществ. Брассинолид в большей степени стимулировал образование вторичных метаболитов (фенольных соединений и флавоноидов), а гибберелловая кислота – первичных (растворимые сахара и белки).

Ключевые слова: *Brassica oleracea* var. *Sabellica*, флавоноиды, фенольные соединения, витамин С, растворимые сахара, отрицательные температуры, регуляторы роста.

**Введение.**

В последнее время наблюдается новый интерес к использованию видов семейства *Brassica* в качестве продуктов питания из-за высокого содержания в них таких биологически активных веществ, как глюкозинолаты, фенольные соединения, антоцианы, аминокислоты, витамины и минеральные элементы. Кроме того, растения

этого семейства содержат свободные сахара, органические кислоты, аминокислоты (свободные и в составе белков) и липиды, которые играют важную роль в рационе человека. Исследования показали, что высокое потребление растительных продуктов приводит к уменьшению риска хронических заболеваний, таких как атеросклероз и рак [1].

АЛМУГРАБИ Есраа, Казанский федеральный университет, e-mail: esraaalmgrabe@gmail.com

КАЛИМУЛЛИН Марат Ильдусович – к.э.н., Казанский федеральный университет,

e-mail: sd@leszdrav.ru

ТИМОФЕЕВА Ольга Арнольдовна – д.б.н., Казанский федеральный университет,

e-mail: otimofeeva2008@mail.ru

Одним из перспективных растений семейства *Brassica* является *Brassica oleracea* var. *Sabellica*, или капуста Кейл, которая широко культивируется в Центральной и Северной Европе и Северной Америке. Содержание флавоноидов, витаминов А, С, К, Е, В1, В2, В6, фолиевой кислоты, кальция, магния, железа, меди и цинка в ней выше, чем в других видах овощей, в т.ч. и из семейства *Brassica*, но уровень этих соединений во многом зависит от факторов окружающей среды и условий роста. Так, показано, что в зимних условиях содержание микро- и макроэлементов в капусте кейл выше, чем летом. Исследование состава *Brassica oleracea* var. *Sabellica* на разных стадиях развития показало, что в ходе онтогенеза увеличивается содержание витамина С, содержание минеральных элементов не изменяется, а содержание белков выше в молодых растениях [2]. Однако не смотря на все положительные характеристики, на территории нашей страны в промышленных масштабах кейл не культивируется.

Климатические условия Республики Татарстан характеризуются довольно низкими отрицательными температурами в течение зимнего периода, которые периодические могут сменяться оттепелями. Эти факторы затрудняют выживание растений в зимних условиях.

В практике растениеводства и садоводства широко используются обработки регуляторами роста с целью повышения урожайности и устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Очевидно, что они влияют и на состав биомолекул этих растений. В связи с этим представляет интерес выяснить, как регуляторы роста могут изменить питательную ценность *Brassica oleracea* var. *Sabellica*.

Цель работы состояла в выявлении особенностей действия природных гормонов (гиббереллиновая кислота, брассинолид) и коммерческих препаратов - биостимуляторов роста (экопин, новосил) на содержание белка, сахаров, витамина С, фенольных соединений и флавоноидов в растениях капусты кале в разных условиях выращивания.

#### **Материалы и методы исследований.**

Посев капусты *Brassica oleracea* var. *sabellica* проводили в мае 2017 года. На стадии

3-4 листьев растения обрабатывали регуляторами роста путем опрыскивания в следующих концентрациях: гибберелловая кислота  $10^{-6}$ М, новосил 5 г/га, экопин 0,25 г/га, брассинолид  $10^{-6}$ М. Пробы для анализа (листья) отбирали через 90 дней (после первых заморозков, в течение 3 дней ночные температуры были  $-5^{\circ}\text{C}$ ) после обработки. Часть растений после заморозков переносили в лабораторные условия и оставляли отрастать в течение 2 недель при температуре  $20^{\circ}\text{C}$ .

Фенольные соединения (ФС) определяли по модифицированному методу Фолина-Чокальта [3]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при 725 нм. Содержание фенольных соединений определяли в пересчете на галловую кислоту. Флавоноиды (ФЛ) определяли по реакции с  $\text{AlCl}_3$  колориметрическим методом [4] при длине волны 420 нм. Содержание сахаров определяли антроновым методом. Содержание витамина С определяли как сумму аскорбиновой кислоты (АА) и дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА) с использованием спектрофотометрического метода [5]. Содержание белка определяли по методу Lowry

Эксперименты проводились в трех биологических репликах. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью Microsoft Excel. Надежность разницы определялась t-критерием Стьюдента при  $P \leq 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** *Brassica oleracea* является важным источником вторичных метаболитов растений, особенно фенольных соединений (флавоноиды и другие полифенолы). Фенольные соединения оказывают профилактическое действие на здоровье человека, вызывая ингибирование окисления липопротеинов низкой плотности, протеазы вируса иммунодефицита типа 1, а также обладают антимикробными и антиканцерогенными свойствами [6].

В наших экспериментах регуляторы роста повышали содержание фенольных соединений. Следует отметить, что их действие усиливалось в условиях последствия отрицательных температур, особенно под влиянием экопина и брассинолида (рис.1).

Флавоноиды являются одним из самых больших классов фенольных соединений. Одна из важнейших их функций – участие в окисли-

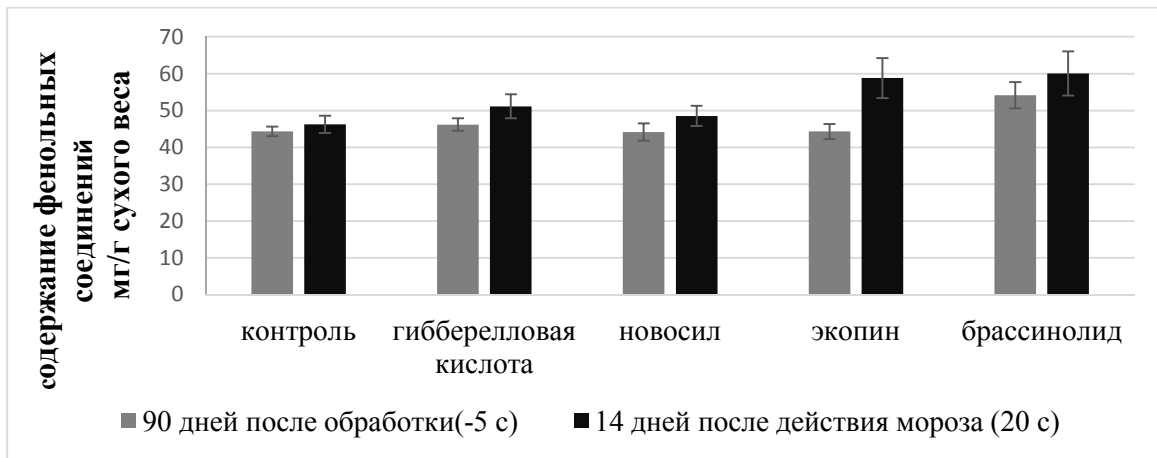


Рис. 1. Влияние биологических регуляторов роста на содержание фенольных соединений в растениях *Brassica oleracea* var. *Sabellica*

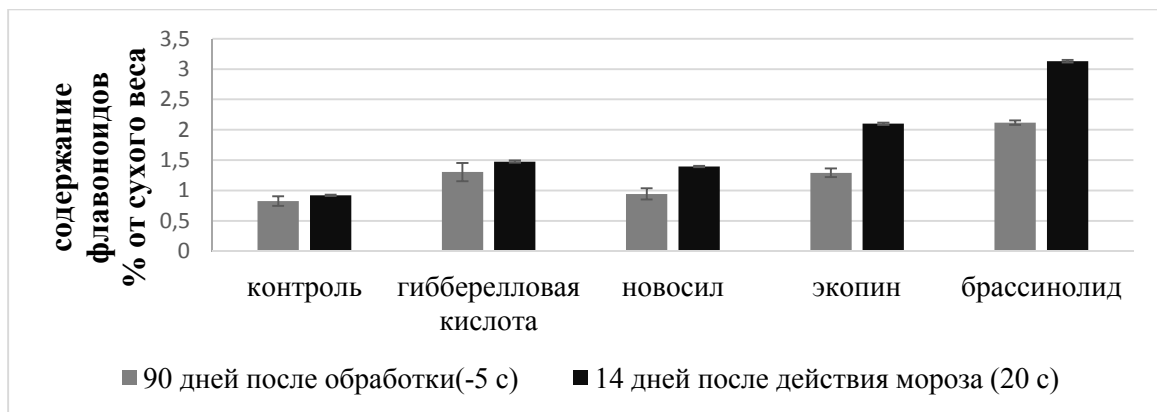


Рис. 2. Влияние биологических регуляторов роста на содержание флавоноидов в растениях *Brassica oleracea* var. *Sabellica*

тельно-восстановительных процессах. На сегодня определен спектр действия этих соединений в организме человека: капилляроукрепляющее, спазмолитическое, антистрессовое, противовоспалительное, антигрибковое, антибактериальное, антиатеросклеротическое, иммуномодулирующее, антиканцерогенное, эстрогенподобное, гепатопротекторное и др. [7].

Как видно из рисунка 2, регуляторы роста повышали содержание флавоноидов. Наибольший эффект на содержание флавоноидов оказал брасинолид. Причем также, как и в случае фенольных соединений, действие регуляторов роста усиливалось в условиях последствия мороза. Известно, что основным флавоноидом *Brassica oleracea* var. *Sabellica* является кемпферол. Кроме него, в довольно больших количествах встречаются кверцетин и изорамнетин.

Низкие температуры могут стимулировать образование флавоноидов за счет усиления образования активных форм кислорода. Показано, что у одних сортов кейл содержание флавоноидов может не изменяться в ответ на понижение температуры, а в других их количество увеличивается в этих условиях. При этом соотношение трех флавоноидов варьирует в зависимости от климатических условий. При снижении температуры с 9,7 до 3,8<sup>0</sup>C возрастала концентрация кверцетина и снижалась кемпферол, а при дальнейшем снижении температуры до 0,4<sup>0</sup>C уменьшалась концентрация кемпферол не изменялось количество кверцетина и увеличивалось – изорамнетина [8].

Витамин С является важным первичным метаболитом растений, который функционирует как антиоксидант, защищая клетку от активных

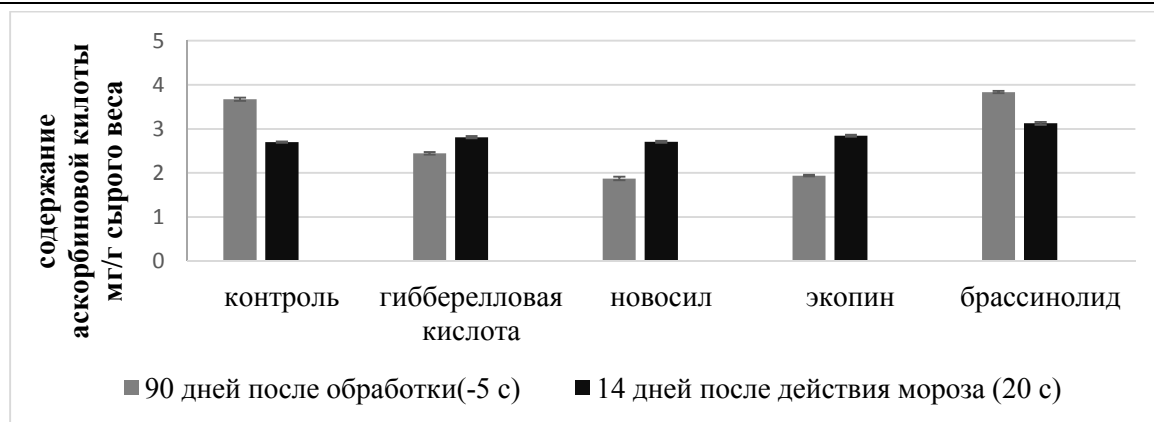


Рис. 3. Влияние биологических регуляторов роста на содержание аскорбиновой кислоты в растениях *Brassica oleracea* var. *Sabellica*

форм кислорода, прежде всего, свободных радикалов кислорода, препятствуя перекисному окислению липидов [9]. Капуста кейл - отличный источник витамина С, 100 г которой обеспечивает до 89% от суточной нормы витамина С [2]. Употребление овощей, богатых витамином С, помогает организму в защите от раковых и глазных заболеваний.

Наши результаты продемонстрировали, что капуста кейл, выращенная в условиях Республики Татарстан, также является богатым источником витамина С. Однако после мороза содержание аскорбиновой кислоты уменьшалось. Исследуемые регуляторы роста также снижали количество данного соединения, за исключением брассинолида, который практически не изменял его содержание. Другие регуляторы роста в условиях последействия отрицательных температур увеличивали количество аскорбиновой кислоты, поднимая его до уровня контрольного варианта (14 дней после действия мороза). В этих условиях наибольшее содержание аскорбиновой кислоты наблюдали в варианте с брассинолидом. (рис. 3).

Капуста кейл является морозоустойчивой культурой. Низкая температура активирует в растениях кейл адаптационные процессы, приводящие к повышению ее морозоустойчивости. Известно, что в период адаптации растений к морозу в разных органах увеличивается содержание сахаров и белков. Изменения уровня растворимых сахаров часто коррелируют с морозостойкостью у различных растений. В период адаптации клетки располагают большим количеством продуктов фотосинтеза, поскольку у

морозостойких растений интенсивность фотосинтеза при около нулевых температурах значительно превышает активность дыхания, что приводит к накоплению большого количества сахаров, выполняющих полифункциональную роль при низкотемпературной адаптации растения. Кроме того, накопление растворимых сахаров может влиять на вкус капусты путем повышения сладости и нежности листьев [10].

В наших экспериментах наибольшую интенсификацию образования сахаров вызывала гибберелловая кислота. Интересно, что содержание сахаров даже несколько увеличивалось в условиях последействия мороза в контрольном варианте, что может быть связано с деградацией полисахаридов, вызванной отрицательными температурами. Регуляторы роста не оказывали существенного влияния на этот процесс. По-видимому, данные регуляторы, выполняя протекторную функцию, защищают от распада полимеры клетки (рис.4). Повышение содержания растворимых сахаров в капусте кейл при воздействии отрицательных температур было обнаружено ранее и сопровождалось увеличением ее морозоустойчивости [10].

Белки являются важнейшими химическими соединениями, без которых жизнедеятельность организма была бы невозможной. Капуста кейл, в отличие от других представителей семейства *Brassica*, богата белком [2], содержащим в своем составе высокое количество неизменяемых аминокислот, что делает полезным данный овощ для людей, не употребляющих животные белки. Наши исследования показали, что в капусте



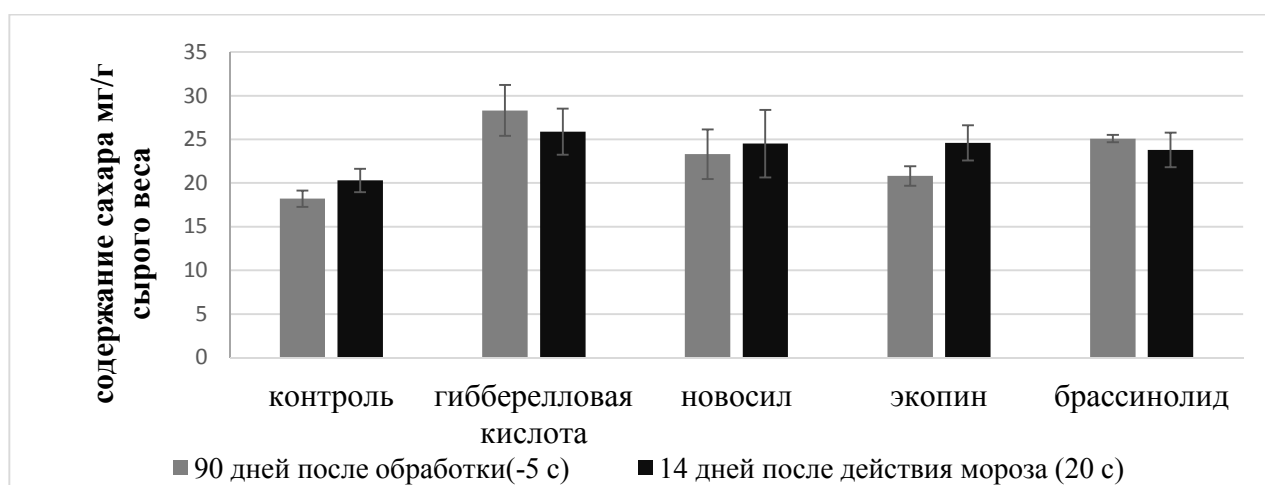


Рис. 4. Влияние биологических регуляторов роста на содержание сахара в растениях *Brassica oleracea* var. *Sabellica*

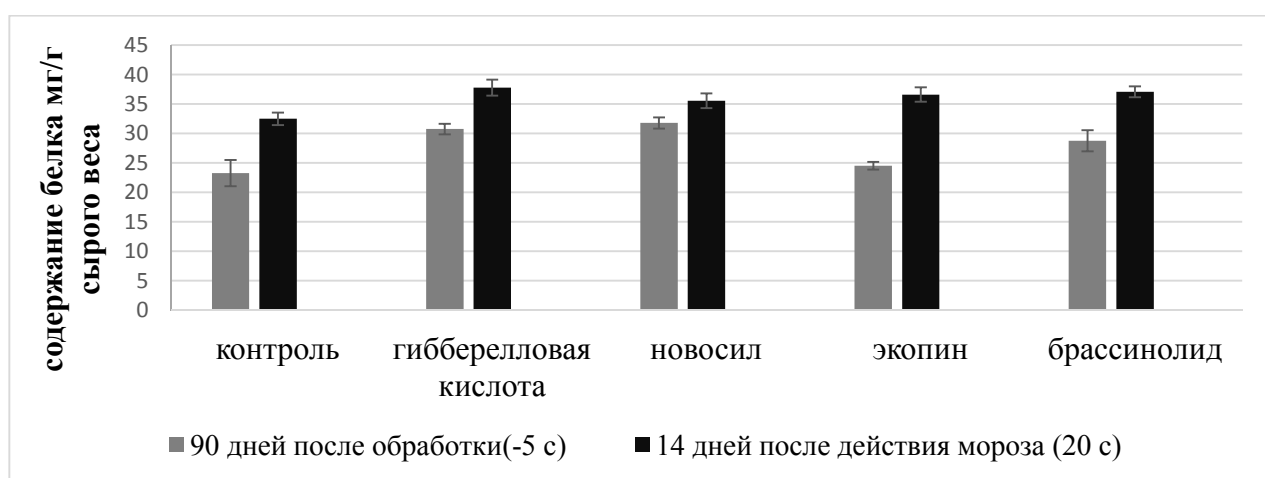


Рис. 5. Влияние биологических регуляторов роста на содержание белка в растениях *Brassica oleracea* var. *Sabellica*

кейл, выращенной в условиях республики Татарстан, также содержится довольно много белков. Как и в случае с растворимыми сахарами, гибберелловая кислота в большей степени увеличивала количество белка. При отрастании растений после замораживания и в контрольном варианте, и в вариантах с регуляторами роста, увеличивалось содержание белка (рис. 5).

Таким образом, проведенные исследования показали, что *Brassica oleracea* var. *Sabellica*, выращенная в условиях Республики Татарстан, характеризуется высоким содержанием флавоноидов, витамина С и белков. Полученные результаты сопоставимы с таковым для растений, выращенных в Северной Америке и Центральной Европе [2]. Капуста кейл благополучно переносит кратковременное воздействие отрицательными температурами, восстанавливая метабо-

лизм в короткие сроки (2 недели). Показана возможность улучшения вкусовых и питательных качеств *Brassica oleracea* var. *Sabellica* с помощью регуляторов роста. Брасинолид в большей степени стимулировал образование вторичных метаболитов (фенольных соединений и флавоноидов), а гибберелловая кислота – первичных (растворимые сахара и белки).

*Работа была выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Jahangir M.H.K., Kim Y.H. Choi C., Verpoorte R. Health- affecting compounds in Brassicaceae// Comprehensive Reviews in Food Science and Food

Safety. 2009. № 8. P. 31–43.

2. Šamec D., Urlić B., Salopek-Sondi B. Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: review of the scientific evidence behind the statement// *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018. [https://DOI: 10.1080/10408398.2018.1454400](https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1454400)

3. Velioglu Y. S., Mazza G., Gao L., Oomah B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products// *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999. № 46. P. 4113–4117.

4. Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals// *Food Chem*. 1999. № 64. P. 555–559.

5. Соколовский В.В., Лебедева Л.В., Лиэлуп Т.Б. О методе раздельного определения АК, ДАК, и дикетогулоновой кислот (ДКГК) в биологических тканях // *Лабораторное дело*. 1974. №3. С. 57–63.

6. Chun O. K., Kim D. O., Smith N., Schroeder D., Han J. T., Lee C. Y. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the

American diet// *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005. № 85. P. 1715–1724.

7. Макаренко, О.А. Левицкий, А.П.. Физиологические функции флавоноидов в растениях// *Физиология и биохимия культурных растений*. 2013. № 2. С. 100–112.

8. Schmidt S., Zietz M., Schreiner M., Rohn S., Kroh, L. W., Krumbein A. Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*)// *Food Chem*. 2010. № 119. P.1293– 1299.

9. Gayosso-García S. L. E., Yahia E. M., González-Aguilar G. A. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI // *Food Research International*. 2011. № 44(5). P 1284-1291.

10. Steindal H., A.L., Rodven,R., Hansen,E., Molmann,J. Effects of photoperiod, growth temperature and cold acclimatization on glucosinolates, sugars and fatty acids in kale// *Food Chemistry*. 2015. № 174. P.44–51.

---

## PHYTOCHEMICAL COMPOSITION OF *BRASSICA OLERACEA* VAR. *SABELLICA* IN DIFFERENT GROWING CONDITIONS

© Almughraby Esraa, M.I. Kalimullin, O.A. Timofeeva

Kazan Federal University,  
18, ulitsa Kremlevskaya, 420008, Kazan, Russian Federation

For the first time in the conditions of the Republic Tatarstan, studies were carried out to study the composition of the biomolecules *Brassica oleracea* var. *Sabellica* in different growing conditions. Cabbage kale belongs to frost-resistant plants, growing in a wide range of climatic and geographical conditions, is characterized by a high content of metabolites, which contribute to the prevention and treatment of many human diseases. The aim of the work was to identify the features of the action of natural hormones (gibberellic acid, brassinolide) and commercial preparations of growth biostimulants (ecopin, novosil) on content protein, sugars, vitamin C, phenolic compounds and flavonoids in cabbage kale plants. Sowing *cabbage Brassica oleracea* var. *sabellica* held in May 2017. At the stage of 3-4 leaves, the plants were treated with growth regulators by spraying in the following concentrations: gibberellic acid  $10^{-6}$ M, novosil 5 g / ha, ecopin 0.25 g / ha, brassinolide  $10^{-6}$ M. Analyzes were performed after 90 days (after the first frost, during 3 days the night temperatures were  $-5^{\circ}\text{C}$ ) after treatment. Some of the plants after frost were transferred to laboratory conditions and allowed to grow for 2 weeks at a temperature of  $20^{\circ}\text{C}$ .

It was shown that *Brassica oleracea* var. *Sabellica*, grown in conditions of the Republic of Tatarstan, contains a high content of proteins, flavonoids, vitamin C. Plants successfully transferred short-term exposure to negative temperatures ( $-5^{\circ}\text{C}$  for 12 hours 3 times), restoring metabolism in a short time (2 weeks). Regrowth Plant *Brassica oleracea* var. *Sabellica* after a short-term freezing was accompanied by an increase in the content of proteins, soluble sugars, phenolic compounds and flavonoids in the leaves. Showed the possibility of improving the taste and nutritional qualities of *Brassica oleracea* var. *Sabellica* with the help of growth regulators. Growth regulators differently influenced on the content of the studied substances. Brasinolide in a greater degree stimulated the formation of secondary metabolites (phenolic compounds and flavonoids), and gibberellic acid - primary (soluble sugars and proteins).

Key words: *Brassica oleracea* var. *Sabellica*, flavonoids, phenolic compounds, vitamin C, soluble sugars, negative temperatures, growth regulators.

УДК 577.13

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-22-28

**ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ  
*WITHANIA SOMNIFERA L. IN VITRO***

© А.А. Алрашиди, Е.А. Калашникова, Р.Н. Киракосян

*Withania somnifera* L. – ашваганда (зимняя вишня, индийский женьшень или физалис солнечнолистный) – лекарственное растение из семейства Solanaceae, которое уже более 3000 лет применяют в народной медицине при лечении физиологических заболеваний, а также для поддержания молодости, выносливости, силы и здоровья человека. Это обусловлено тем, что во всех частях растения (листьях, коре, плодах, семенах, и в большей степени в корне) синтезируются такие вещества как сапонины, гликозиды, стероидные лактоны, олигосахариды, витанолид, а также свободный витаферин А (агликон), обладающий цитотоксическим (противоопухолевыми) действием. В работе изучена биологическая активность растительных экстрактов *Withania somnifera* L. in vitro. Экстракты получали из растений-регенерантов и каллусной ткани *W. somnifera*, выращенных на питательных средах разного гормонального состава. В качестве экстрагента использовали 96% этанол. Сухой остаток растворяли в DMSO. Экстракты добавляли в состав питательной среды в концентрациях 30, 60, 100 мг/л. Контролем служила среда без экстракта, а так же чистый растворитель (DMSO). Показано, что вторичные метаболиты дифференцированных и дедифференцированных клеток *W. somnifera*, культивируемых в условиях in vitro, оказали различное токсическое действие на рост мицелия гриба *Fusarium culmorum* и *Fusarium sporotrichioides* Sherb. Причем это действие явно проявлялось на грибах *F. sporotrichioides* и практически отсутствовало на грибах *F. culmorum*. Для определения цитотоксического эффекта растительных экстрактов использовали МТТ-тест. В качестве объекта исследования была взята линия клеток М-HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, сублиния HeLa, клон М-HeLa). Установлено, что ярко выраженный цитотоксический эффект, при котором погибало примерно 95% раковых клеток, был характерен для растительных экстрактов, полученных из растений-регенерантов *W. somnifera*, в то время как для каллусной ткани это действие проявлялось только при высоких концентрациях.

Ключевые слова: культура тканей, *Withania somnifera*, растительный экстракт, in vitro, фитопатогены, раковые клетки.

**Введение.** В последнее время все больший интерес исследователей привлекают работы с лекарственными растениями как источниками веществ вторичного синтеза, которые широко применяются в фармакологии, медицине, ветеринарии, пищевой и других отраслях промышленности. Препараты, полученные из растений способен вызвать положительный эффект в том

направлении, где другие отдельные соединения, также выделенные из этого же растения, оказались малоэффективными. Это обуславливается наличием комплексов в растениях и в растительных экстрактах, которые могут состоять из десятков и более отдельных химических соединений [1]. Наличие определенных химических веществ приводит к тому, что растительный экс-

АЛРАШИДИ Ашраф Айял, Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева, e-mail: ahmad.aa.2013@mail.ru

КАЛАШНИКОВА Елена Анатольевна – д.б.н., Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева, e-mail: kalash0407@mail.ru

КИРАКОСЯН Рима Нориковна – к.б.н., Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева, e-mail: mia41291@mail.ru

тракт может проявлять разную биологическую активность [2].

Одной из перспективных и малоизученных культур является ашваганда (*Withania somnifera* L.) (синонимы зимняя вишня, индийский женьшень или физалис солнечнолистный) – лекарственное растений из семейства Solanaceae, которое уже более 3000 лет применяют в народной медицине при лечении физиологических заболеваний, а также для поддержания молодости, выносливости, силы и здоровья человека. Это обусловлено тем, что во всех частях растения (листьях, коре, плодах, семенах, и в большей степени в корне) синтезируются такие вещества как сапонины, гликозиды, стероидные лактоны, олигосахариды, витанолид, а также свободный витаферин А (агликон), обладающий цитотоксическим (противоопухолевыми) действием [3, 4]. Все эти свойства делают данную культуру привлекательной для исследований как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*.

Исследования по изучению растительных экстрактов *W. somnifera* широко проводятся в научно-исследовательских учреждениях Индии, Турции и ряда других стран. Как правило, эти работы направлены на определение антибактериальной и антимикробной активности экстрактов ашваганды. Исследования были проведены на *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum* и *Trichoderma viridae* [5, 6]. Однако, следует отметить, что исследования по определению фунгицидной активности экстрактов *W. somnifera*, в доступной для нас литературе, не были обнаружены. Поэтому работа в данном направлении исследований актуальна и имеет, как практическое, так и теоретическое значение.

Цель исследования - изучить биологическую активность растительных экстрактов *Withania somnifera* L., полученных из растений-регенерантов и каллусной ткани на раковых клетках человека и на грибах рода *Fusarium* L.

**Материалы и методы.** Для получения растительных экстрактов использовали растения-регенеранты и каллусную ткань ашваганды, по-

лученных на питательных средах разного гормонального состава. Для этого, сухую биомассу тщательно растирали в ступке, после чего гомогенизированную массу экстрагировали 98%-ным спиртом в течение 1 часа. Полученный экстракт затем дважды пропускали через фильтровальную бумагу, с целью разделения ее на жидкую и твердую фракции. Полученную жидкую фракцию высушивали и определяли вес сухого вещества, который в дальнейшем использовали в работах на раковых клетках человека и на чистой культуре грибов рода *Fusarium* L. Сухой остаток растворяли в DMSO.

Для определения цитотоксического эффекта растительных экстрактов использовали МТТ-тест. Работу проводили в 96-луночном плейте. В каждую лунку вносили раковые клетки в количестве  $2 \cdot 10^4$  кл/лунку и добавляли 100 мкл питательной среды. Клетки инкубировали в таких условиях в течение 1 часа. После этого к клеткам добавляли необходимые (различные, изучаемые) концентрации экстрактов, полученных из растений-регенерантов и каллусной ткани ашваганды, и вновь инкубировали в течение 1 часа. В контрольном варианте экстракты не вносили. Затем к содержимому каждой лунки добавляли по 25 мкл МТТ (4 мг/мл в PBS), который первоначально был профильтрован, после чего проводили инкубацию в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 4 часов. После этого в каждую лунку добавляли по 50 мкл SDS (20% SDS на воде с 0,02 N HCl или H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) и инкубировали в течении ночи. Затем измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 570 и 650 нм. В качестве объекта исследования была взята линия клеток М-HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, сублиния HeLa, клон М-HeLa).

Определение фунгицидной активности растительных экстрактов проводили на чистой культуре грибов рода *Fusarium*, в частности *Fusarium culmorum* (штамм М-10-1, выделенный из растений пшеницы, 2009, Московская область) и *Fusarium sporotrichioides* Sherb. (штамм ОР-14-1, выделенный из растений, пшеницы, 2014, Орловская область). Данные штаммы были выделены и идентифицированы сотрудни-

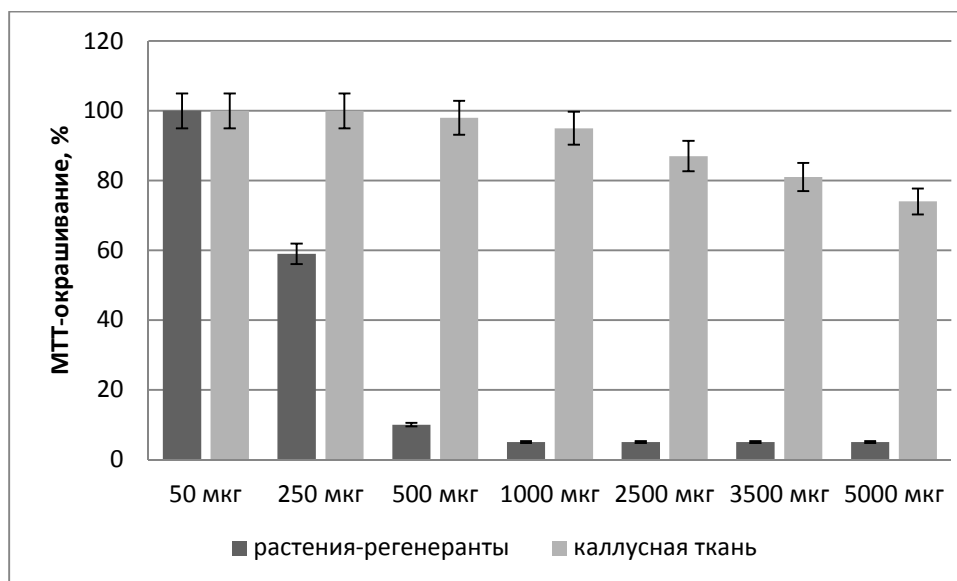


Рис. 1. Влияние различных концентраций растительных экстрактов ашваганды на жизнеспособность раковых клеток человека

ками лаборатории микологии Института фитопатологии РАН. Растворенный в DMSO сухой растительный остаток, полученный из экстрактов, добавляли в состав питательной среды после ее автоклавирования. Концентрация экстракта составила 30, 60, 100 мг/л. Контролем служила среда без экстракта, а так же чистый растворитель (DMSO). Фунгицидную активность растительных экстрактов определяли по росту мицелий гриба. Для этого на 7-е сутки культивирования проводили измерение диаметра гриба в двух плоскостях.

**Результаты и обсуждение.** Как следует из анализа литературных источников, растения *W. somnifera* в своем составе вторичных метаболитов содержат витаферин, который обладает противораковой активностью [3, 4]. Поэтому изучение действия экстрактов данного растения на раковые клетки человека, всегда остается актуальным.

На первом этапе работы необходимо установить концентрации растительных экстрактов, при которых наблюдается гибель раковых клеток. Причем, данные концентрации необходимо определить непосредственно для экстрактов из растений-регенерантов, и экстрактов из каллусной ткани. Экспериментальным путем нами было определено, что после лиофильной сушки экстрактов, в пробирке осталось 31,4 мг сухого вещества от растений-регенерантов и 28,3 мг

сухого вещества от каллусной ткани. Полученные массы растворяли в DMSO до концентрации 5000 мкг/мл, после чего проводили разбавление раствора до 50 мкг/мл и полученные концентрации в дальнейшем наносили на раковые клетки человека. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

В результате проведенных исследований было установлено, что растительные экстракты, полученные из растений-регенерантов и каллусной ткани, обладают разной цитотоксичностью. Как следует из полученных результатов, малые концентрации экстрактов (50 мкг/мл) были не токсичны для исследуемых раковых клеток, о чем свидетельствует 100%-ное их выживание при использовании двух изучаемых экстрактов. Однако, по мере повышения концентрации цитотоксический эффект экстрактов начинал проявляться. Причем более ярко этот эффект был характерен для растительных экстрактов, полученных из растений-регенерантов. Для этих экстрактов, уже при концентрации 250 мкг/мл наблюдали гибель более 40% раковых клеток, а при концентрации 500 мкг/л и выше гибель раковых клеток была в пределах 90-95%. Что касается растительных экстрактов, полученных из каллусной ткани, то цитотоксический эффект был слабо выражен и максимальная гибель раковых клеток (23%) была отмечена лишь при самых высоких концентрациях экстракта (5000 мкг/мл).

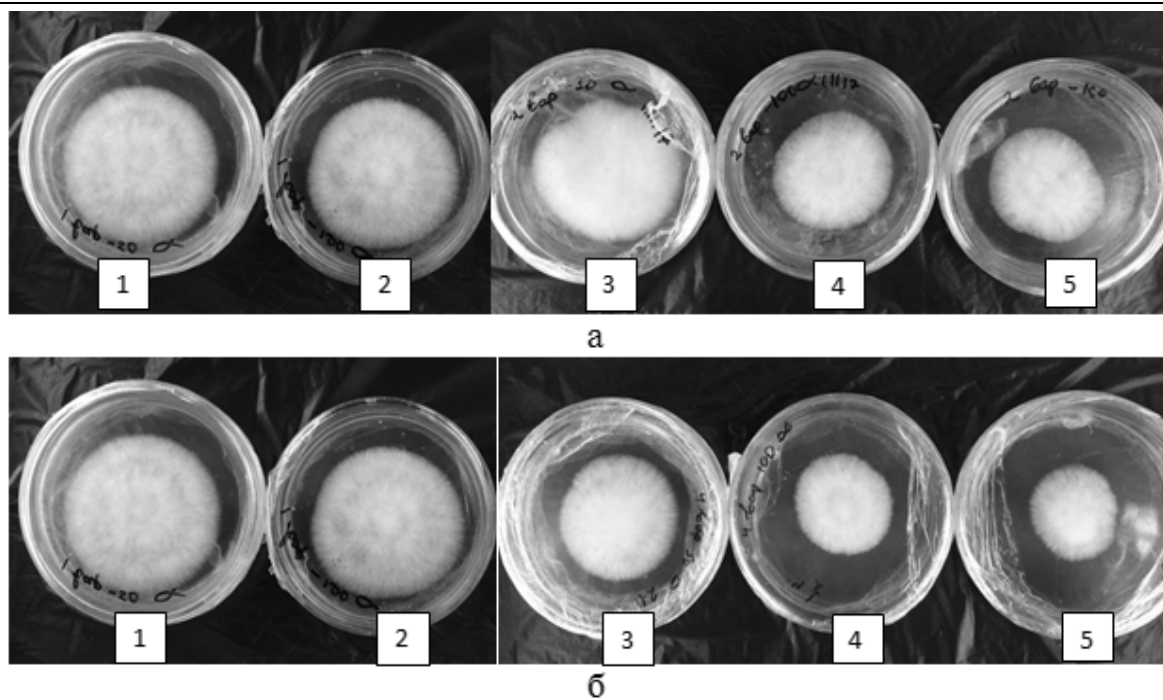


Рис. 2. Влияние различных концентраций растительных экстрактов ашваганды на рост *F. sporotrichioides*, штамм ОР -14-1: а – экстракт получен из каллусной ткани, б – экстракт получен из растений-регенерантов

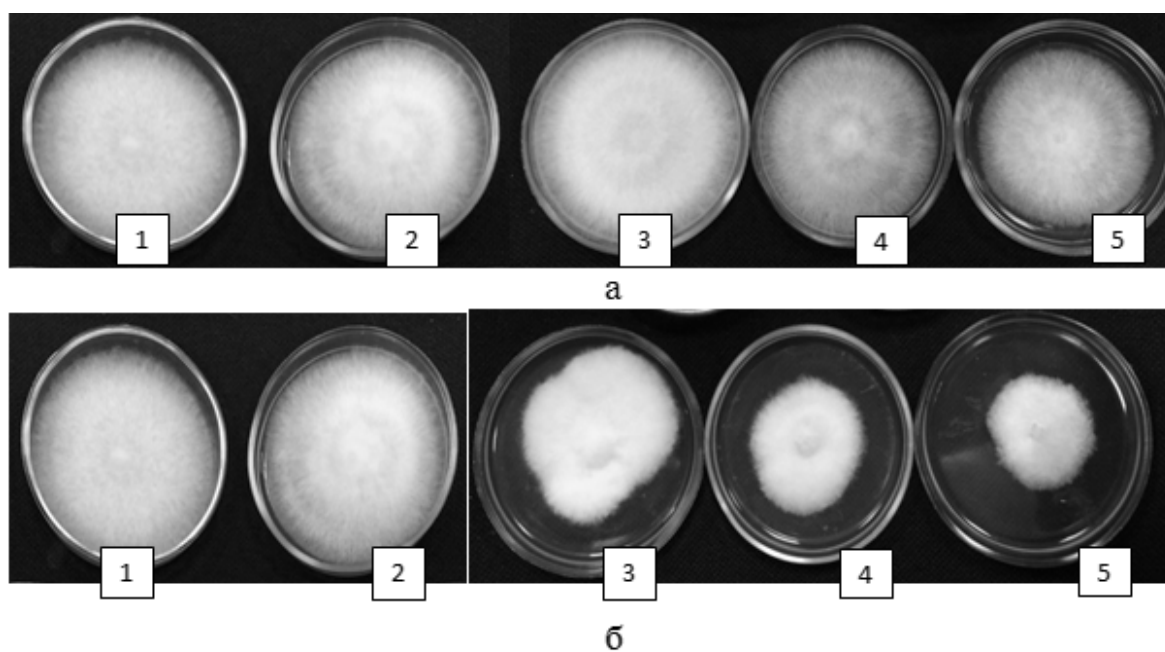


Рис. 3. Влияние различных концентраций растительных экстрактов ашваганды на рост *F. culmorum*, штамм М - 10-1: а – экстракт получен из каллусной ткани, б – экстракт получен из растений-регенерантов

*Примечание:* на рисунках 2 и 3 приведены одинаковые обозначения: 1 – контроль, 2 – среда, содержащая чистый растворитель DMSO в концентрации 1 мл/100 мл среды, 3 – среда, содержащая растительный экстракт в концентрации 30 мг/л, 4 - среда, содержащая растительный экстракт в концентрации 60 мг/л, 5 - среда, содержащая растительный экстракт в концентрации 100 мг/л

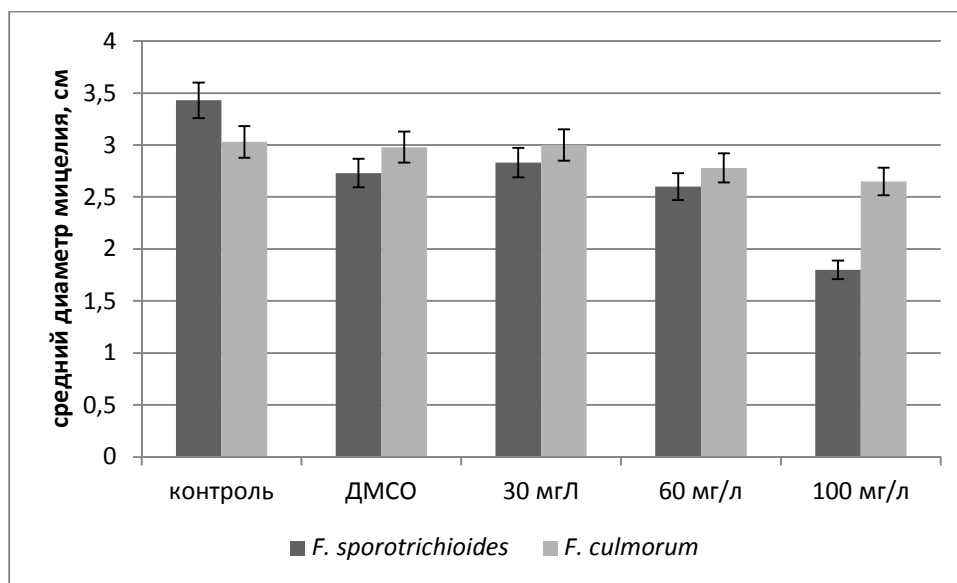


Рис. 4. Влияние растительных экстрактов на рост мицелия грибов рода *Fusarium* L.

В следующей серии экспериментов изучали фунгицидную активность растительных экстрактов ашваганды на грибы рода *Fusarium*. Исследования показали, что изучаемые экстракты обладают в той или иной степени фунгицидной активностью, которая зависела от источника получения экстракта, его концентрации, а также от исследуемого штамма фитопатогена. Так, было установлено, что исследуемые экстракты оказали различное токсическое действие на рост мицелия гриба *F. culmorum* и *F. sporotrichioides*. Причем это действие явно проявлялось на грибах *F. sporotrichioides* и практически отсутствовало на грибах *F. culmorum* (рис. 2, 3).

Следует отметить, что экстракты, полученные из каллусной ткани, обладали меньшей фунгицидной активностью, по сравнению с экстрактами, полученными из растений-регенерантов. Причем данная ответная реакция изучаемых фитопатогенов (*F. sporotrichioides*, *F. culmorum*) на действие двух различных экстрактов была одинаковой (рис. 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в растениях-регенерантах биосинтез вторичных метаболитов происходит более интенсивно, по сравнению с культурой каллусных клеток. Такие закономерности были отмечены рядом исследователей, как в России, так и за рубежом [7, 8]. Авторы утверждают, что такие особенности клеток к синтезу вторичных метаболитов

обусловлены тем, что в клетках целого растения вторичные метаболиты образуются в строго дифференцированных клетках и этот процесс находится под контролем регуляторных систем самого растения. Иное дело обстоит с дедифференцированными клетками (каллусная ткань), которые постоянно делятся и не переходят в дифференцированное состояние. Поэтому в каллусной ткани биосинтез вторичных метаболитов может быть маловероятен. Однако этим процессом можно управлять, изменяя условия культивирования, например, химические факторы питательной среды (минеральные соли, гормоны), физические внешние факторы (спектральный состав света и его интенсивность, pH питательной среды, температурный режим выращивания) или создавать стрессовые условия (присутствие факторов абиотической и биотической природы).

Таким образом, использование растений-регенерантов, как источник вторичных метаболитов имеет, несомненно, прикладное значение, для создания новых биологических препаратов в борьбе с опасными фитопатогенами. Все это позволит в дальнейшем снизить пестицидную нагрузку на растения, почву и окружающую среду. Однако для промышленного использования необходимо разрабатывать технологии, направленные на культивирование дедифференцированных клеток, обладающих высоким

биосинтетическим потенциалом синтеза вторичных метаболитов. Кроме того, проанализированные полученные результаты позволяют нам говорить об эффективности применения экстрактов *W. somnifera* в качестве фунгицидных компонентов биопрепаратов в различных биотехнологических производствах. Однако исследования в этом направлении необходимо продолжать для оптимизации технологического процесса с целью получения экстрактов с высокой фунгицидной активностью.

**Заключение.** Таким образом, в результате проведенных исследований нами было показано, что вторичные метаболиты, полученные из дифференцированных клеток ашваганды, культивируемых в условиях *in vitro*, оказывают ингибирующее действие на рост раковых клеток человека и мицелий грибов рода *Fusarium* L., в то время как экстракты из дедифференцированных клеток такой способностью не обладают.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та. 2004. 205 с.
2. Астафьева О.В. Исследование возможности применения биологически активных компонентов растительных экстрактов в производстве препаратов для нужд косметологии и фармакологии // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 6. С. 106-108.
3. Sahana R., Teesta V.K., Avnish B., Krithika K., Savithri B. In vitro propagation of *Withania somnifera* and estimation of withanolides for neurological disorders // Journal of Pharmacognosy. 2012. V. 3. № 2. P. 85-87.
4. Sathees K. T. M., Sownthariya S. In vitro mass propagation of *Withania somnifera* Dunal using seaweed extract // Anbazhakan international letters of natural sciences. 2014. V. 24. P. 8-14.
5. Rizwana H., Al Hazzani A.A., Al Shehata, N.M.S. Moubayed Antibacterial potential of *Withania somnifera* L. against human pathogenic bacteria // Afr J of Microbiol Res. 2012. 6(22). P. 4810-4815.
6. Dharajiya D., Patel P., Patel M., Moitra N. In

vitro Antimicrobial Activity and Qualitative Phytochemical Analysis of *Withania somnifera* (L.) Dunal Extracts // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2014. 7(2). №. 60. P. 349-354.

7. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология. 2010. № 5. С. 8–28.

8. Ханды М.Т. Особенности образования стероидных гликозидов в культурах клеток *Dioscorea deltoidea*, *Tribulus terrestris* и *Trigonella foenum-graecum* // Автореф. ...канд. биол. наук. Москва. 2016. 23 с.

#### References

1. Vechernina N.A. Metody biotekhnologii v selekcii, razmnzhenii i sohraneni genofonda rastenij. Barnaul: Izd-vo Alt. un-ta. 2004. 205 s.
2. Astafeva O.V. Issledovanie vozmozhnosti primeneniya biologicheski aktivnykh komponentov rastitel'nykh ehkstraktov v proizvodstve preparatov dlya nuzhd kosmetologii i farmakologii // Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2012. № 6. S. 106-108.
3. Sahana R., Teesta V.K., Avnish B., Krithika K., Savithri B. In vitro propagation of *Withania somnifera* and estimation of withanolides for neurological disorders // Journal of Pharmacognosy. 2012. V. 3. № 2. P. 85-87.
4. Sathees K. T. M., Sownthariya S. In vitro mass propagation of *Withania somnifera* Dunal using seaweed extract // Anbazhakan international letters of natural sciences. 2014. V. 24. P. 8-14.
5. Rizwana H., Al Hazzani A.A., Al Shehata, N.M.S. Moubayed Antibacterial potential of *Withania somnifera* L. against human pathogenic bacteria // Afr J of Microbiol Res. 2012. 6(22). P. 4810-4815.
6. Dharajiya D., Patel P., Patel M., Moitra N. In vitro Antimicrobial Activity and Qualitative Phytochemical Analysis of *Withania somnifera* (L.) Dunal Extracts // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2014. 7(2). №. 60. P. 349-354.
7. Nosov A.M. Ispol'zovanie kletochnykh tekhnologij dlya promyshlennogo polucheniya biologicheski aktivnykh veshchestv rastitel'nogo proiskhozhdeniya // Biotekhnologiya. 2010. № 5. S. 8–28.
8. Handy M.T. Osobennosti obrazovaniya steroidnykh glikozidov v kul'turakh kletok *Dioscorea deltoidea*, *Tribulus terrestris* i *Trigonella foenum-graecum* // Avtoref. ...kand. biol. nauk. Moskva. 2016. 23 s.





**STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS  
OF *WITHANIA SOMNIFERA* L. *IN VITRO***

© A.A. Alrashidi, E.A. Kalashnikova, R.N. Kirakosyan

RSAU-MTAA named after K. A. Timiryazev,  
49, ulitsa Timiryazevskaya, 127550, Moscow, Russian Federation

*Withania somnifera* L.- ashwagandha (winter cherry, Indian ginseng or sun-leaf physalis) is a medicinal plant from the family Solanaceae, which has been used for more than 3000 years in traditional medicine in the treatment of physiological diseases, as well as to maintain youth, endurance, strength and human health. This is because all parts of the plant (leaves, bark, fruits, seeds, and more radically) are synthesized substances such as saponins, glycosides, steroidal lactones, oligosaccharides, withanolide and free withaferin a (aglycone), with cytotoxic (antineoplastic) effect. The authors studied the biological activity of plant extracts of *W. somnifera in vitro*. Extracts were obtained from regenerated plants and callus tissue *W. somnifera* grown on nutrient media of different hormonal composition. 96% ethanol was used as an extractant. The dry residue was dissolved in DMSO. The extracts were added to the nutrient medium at concentrations of 30, 60, 100 mg/l were used as the control medium without extract and pure solvent (DMSO). It is shown that exometabolites of differentiated and dedifferentiated cells *W. somnifera*, cultivated *in vitro*, had a different toxic effect on the growth of mycelium of *Fusarium culmorum* and *Fusarium sporotrichioides* Sherb. fungus. Moreover, this effect is clearly manifested in the fungi *F. sporotrichioides* and virtually absent in the fungi *F.culmorum*. MTT-test was used to determine cytotoxic effect of plant extracts. The line of cells M-Hela (epithelial carcinoma of the human cervix, sublinia Hela, clone M-Hela) was taken as the object of study. It was found that a pronounced cytotoxic effect, in which approximately 95% of cancer cells died, was characteristic of plant extracts obtained from regenerated plants *W. somnifera*, while for callus tissue, this action was manifested only at high concentrations.

Keywords: tissue culture, *Withania somnifera*, plant extract, *in vitro*, phytopathogens, cancer cells.

УДК 581.1

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-29-35

## ВЛИЯНИЕ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ НА СОДЕРЖАНИЕ АУКСИНОВ И РОСТ БОКОВЫХ КОРНЕЙ У РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ

© Г.Р. Ахиярова, Р.С. Иванов, Д.С. Веселов, С.Ю. Веселов, Г.Р. Кудоярова

Ветвление корней – важная адаптивная реакция растений, обеспечивающая их приспособление к изменению доступности воды и элементов минерального питания. Подавление образования боковых корней освобождает ресурсы для активации удлинения, обеспечивая поглощение воды из глубины почвы, где сохраняется влага в отсутствие дождей. Гормоны играют важную роль в регуляции ростовых адаптивных реакций. Зависимость ветвления от уровня ауксинов хорошо известна. Участию абсцизовой кислоты (АБК) в этом процессе также уделяют внимание, хотя механизм ее действия на ветвление до конца не раскрыт. Роль этого гормона возрастает в стрессовых условиях, для которых характерно накопление АБК. С помощью метода иммуногистохимической локализации выявлено присутствие АБК в примордиях боковых корней растений ячменя сорта Steptoe и его мутанта по содержанию АБК AZ34. Добавление нейтрального осмотически активного вещества полиэтиленгликоля (ПЭГ) в питательную среду приводило к накоплению АБК в корневых зачатках (примордиях) боковых корней исходного сорта Steptoe, но не влияло на уровень гормона у его дефицитного по АБК мутанта. При этом содержание ауксина в примордиях и количество боковых корней было выше у растений AZ34. Соотношение корневых зачатков и видимых боковых корней возрастало у обработанных ПЭГ растений Steptoe, что указывало на подавление формирования развитых боковых корней из их зачатков под влиянием дефицита воды. Для того чтобы проверить возможную причинно-следственную связь между повышением содержания АБК и понижением уровня ИУК, в питательную среду мутанта добавляли АБК. Обработка экзогенным гормоном снижала уровень ауксинов и количество боковых корней, что подтверждает предположение о том, что повышенный уровень ауксинов и большее количество боковых корней у мутанта на фоне дефицита воды по сравнению с растениями исходного генотипа было связано с пониженной способностью AZ34 к накоплению АБК. Соотношение примордий и видимых боковых корней возрастало под влиянием экзогенной АБК, что указывает на роль повышенного уровня этого гормона в подавлении развития боковых корней из их зачатков.

Ключевые слова: ячмень, ауксины, абсцизовая кислота, ветвление корней, дефицит воды, примордии.

Изменение архитектуры корней (длины первичных корней и их ветвления) – важная адаптивная реакция, обеспечивающая приспособление растений к условиям обитания. Вода и

ионы неравномерно распределены в почве, а их доступность для растения зависит от интенсивности осадков. Усиление ветвления, выявленное в очагах с повышенной концентрацией элемен-

АХИЯРОВА Гузель Рифовна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: akhiyarova@rambler.ru

ИВАНОВ Руслан Сергеевич – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: ivanovirs@mail.ru

ВЕСЕЛОВ Дмитрий Станиславович – д.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: veselov@anrb.ru

ВЕСЕЛОВ Станислав Юрьевич – д.б.н., Башкирский государственный университет,  
e-mail: respectableman@yandex.ru

КУДОЯРОВА Гюзель Радомесовна – д.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: guzel@anrb.ru

тов минерального питания, обеспечивает их эффективное поглощение растением [1], а подавление образования боковых корней позволяет растению мобилизовать ресурсы для ускоренного удлинения первичных корней. Последняя из указанных реакций позволяет корням извлекать воду из нижних слоев почвы, где она сохраняется в условиях засухи, тем самым повышая засухоустойчивость растений. Активный рост корней в глубину также способствует эффективному поглощению нитратов, которые вымываются дождями, благодаря их высокой растворимости в воде. Адекватная ростовая реакция корней определяется их способностью воспринимать изменения условий их обитания. Важную роль в восприятии внешних воздействий и регуляции роста и развития растений играет их гормональная система. Концентрация гормонов изменяется в ответ на дефицит воды, дефицит и повышение концентрации элементов минерального питания в почве [2], что должно сказываться на росте растений. Участие ауксинов в регуляции ветвления корней хорошо известно [3]. Роль АБК возрастает при стрессовых воздействиях, для которых характерно накопление этого гормона [2]. Предполагается, что именно повышение уровня этого гормона при засухе приводит к подавлению образования боковых корней, способствуя тем самым ускоренному удлинению первичных корней [4]. Вместе с тем, механизм действия этого гормона на образование боковых корней не до конца понятен. Изменение ветвления корней под влиянием АБК может быть связано с действием этого гормона на содержание ИУК. Показано, что АБК активирует конъюгирование ауксинов с аминокислотами, что должно способствовать снижению их концентрации в растениях [5]. Вместе с тем, недавние исследования выявили способность экзогенной АБК повышать экспрессию генов, контролирующих синтез ауксинов [6]. Поскольку содержание гормона определяется балансом между его синтезом и инактивацией, важно было оценить влияние АБК на уровень ауксинов. Для решения этой задачи в данной работе использовали дефицитный по АБК мутант ячменя AZ34 и растения его исходного сорта Steptoe. С помощью метода иммуногистохимической локализации было изучено влияние дефи-

цита воды, создаваемого добавлением в питательную среду нейтрального осмотически активного вещества полиэтиленгликоля (ПЭГ), на уровень АБК и ауксина - индолилуксусной кислоты (ИУК) в примордиях боковых корней. Параллельно оценивалось влияние ПЭГ на количество боковых корней и их примордий. Для того, чтобы подтвердить причинно-следственную связь между изменением уровня АБК и ИУК, в питательную среду растения мутанта дефицитного по АБК добавляли экзогенную АБК.

**Материал и методы исследования.** Растения ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Steptoe и его дефицитного по АБК мутанта AZ34 выращивали в гидропонной культуре на среде Хогланда-Арнона при освещении 400 мкмоль/ м<sup>2</sup> с<sup>-1</sup> ZN (спектральная лампа) и ДНаТ-400 (лампы натриевые высокого давления), 14-часовом фотопериоде, температуре воздуха 24°C и относительной влажности воздуха 40%. Перед проращиванием семян их стратифицировали, выдерживая при температуре 4°C в течение трех суток. На седьмые сутки выращивания растений половину из них переносили на среду с 6 % ПЭГ 6000 или с экзогенной АБК (0,1 мг/л). В качестве контроля служили растения, которые росли на среде без ПЭГ или АБК. На второй и четвертый день после начала воздействия АБК у растений, корни которых фиксировали смесью спирта и уксусной кислоты, после окрашивания ацетокармином подсчитывали количество боковых корней и примордиев.

Для иммуногистохимической локализации ИУК и АБК отрезки первичных корней длиной по 5 мм из зоны образования боковых корней (10-30 мм от кончика) фиксировали в 4 % растворе карбодиимида (Sigma, Япония). Дегидратацию образцов проводили в серии разведений этанола (30, 50, 70, 80, 96 %). Затем их заключали в гидрофильную метакрилатную смолу JB-4 (Electron Microscopy Sciences, США). С помощью ультрамикротомы (НМ 325, "MICROM Laborgerate", Германия) готовили гистологические срезы толщиной 1,5 микрон. Иммунолокализацию осуществляли, как описано ранее [8]. Срезы обрабатывали в течение 30 минут 0.1 М фосфатным буфером (рН 7,3), содержавшим 0,2% желатина и 0,05% Tween-20 (ФЖТ). Далее

на срезы наносили по 20 мкл сыворотки кролика, содержащей антитела против АБК или ИУК, разведенные в ФЖТ в соотношении 1:100. Срезы прикрывали полосками парафильма и инкубировали во влажной камере при комнатной температуре в течение 2 ч. После инкубации срезы промывали трижды по 10 минут 0.1 М фосфатным буфером, содержащим Tween-20 в конечной концентрации 0,05% (ФТ). Затем на каждый срез помещали 20 мкл меченных коллоидным золотом иммуноглобулинов козы против антител кролика ("Augion", США), разведенных в ФЖТ в соотношении 1:30. Срезы покрывали кусочками парафильма и инкубировали в течение 1 часа во влажной камере при комнатной температуре. Затем их промывали три раза по 10 минут в ФТ и ополаскивали дистиллированной водой. После высушивания срезы в течение 20 минут обрабатывали препаратом серебра для усиления окрашивания в соответствии с рекомендацией производителя ("Augion", Голландия). В качестве контроля служили образцы тканей, обработанные неиммунной сывороткой кролика (не содержащей антител к исследуемым гормонам). Препараты анализировали с помощью светового микроскопа Axio Imager.A1 ("Carl Zeiss Jena", Германия), оборудованного цифровой камерой AxioCam MRc5 ("Carl Zeiss Jena").

Фитогормоны экстрагировали из корней растений с помощью 70 % этилового спирта на вторые сутки после начала воздействия АБК. Экстракцию АБК и ИУК проводили по модифицированной схеме [7]. Из подкисленной до pH 2-3 аликвоты водного остатка гормоны дважды экстрагировали диэтиловым эфиром в соотношении один к пяти, затем возвращали их в водную фазу (1 % раствор гидрокарбоната натрия, соотношение водной и органической фазы – один к трем), снова подкисляли до pH 2-3 и после двукратной реэкстракции диэтиловым эфиром метилировали. Для иммуноанализа ИУК и АБК использовали микропланшеты (Costar). Сенсибилизацию твердой фазы осуществляли путем инкубации в лунках планшета конъюгатов ИУК или АБК в течение двух часов при 37°С. Избыток антигена, который не связался с твердой фазой, удаляли, трижды промывая

лунки физиологическим раствором с 0,05 % Tween-20, pH 6,8-7,0. Затем в лунки вносили или стандарт гормона, или экстракт из растений, к которым добавляли полученную при иммунизации кроликов специфическую сыворотку против ИУК или АБК (в зависимости от того, чем сенсибилизировали лунки, и от образца гормона который определялся) разведенную в физиологическом растворе с 0,5% БСА и 0,05% Tween-20. Инкубировали планшеты в течение часа при 37°С и промывали его физиологическим раствором с Твином. Для выявления антител против гормонов использовали вторые антитела против иммуноглобулинов кролика, меченные пероксидазой, которые инкубировали в лунках один час при 37°С, а затем лунки промывали физиологическим раствором с Твином. Ферментативную активность конъюгированной с антителами пероксидазы, связавшейся с твердой фазой, определяли по окрашиванию в присутствии перекиси продукта окисления ортофенилендиамина в фосфатном буфере при pH 5,0. Реакцию останавливали через 15-30 минут с помощью серной кислоты. Оптическую плотность измеряли на микрофотометре при длине волны 492 нм. Для определения гормонов брали по 10 растений в каждом из трех биологических повторов.

**Результаты и обсуждение.** Окрашивание срезов корней с помощью сыворотки к АБК выявило присутствие этого гормона в клетках примордиев боковых корней (рис. 1). Насколько нам известно, это первый случай обнаружения АБК в примордиях, хотя данных по содержанию в них ауксинов немало [8]. Снижение водного потенциала питательной среды при добавлении в нее ПЭГ приводило к усилению окрашивания клеток примордиев на АБК (рис. 1в), что соответствует данным литературы о стимуляции накопления этого гормона при стрессовых воздействиях. У дефицитного по АБК мутанта AZ34 не было выявлено заметных изменений в окрашивании на АБК под влиянием ПЭГ (рис. 1). На фоне обработки ПЭГ уровень окрашивания примордий на АБК был выше у растений Steptoe (рис. 1) по сравнению с растениями AZ34, а на ИУК – у растений AZ34 (рис. 2). Таким образом, накопление АБК, выявленное под

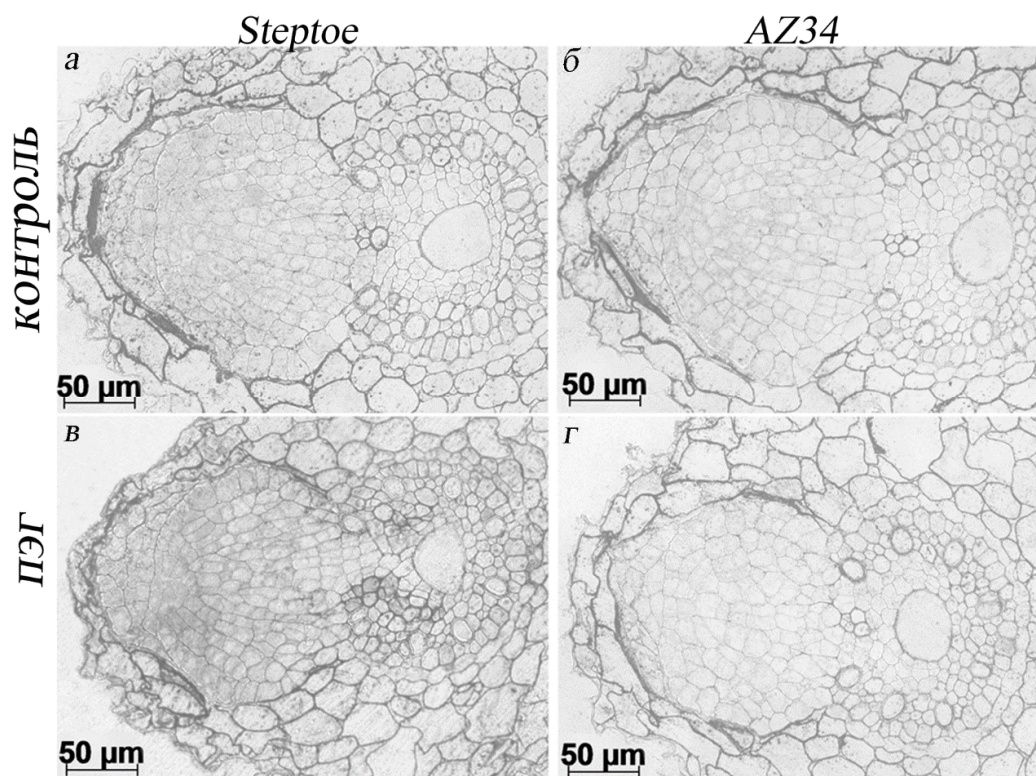


Рис. 1. Иммуногистохимическое окрашивание АБК на поперечных срезах корней растений *Stephoe* (а, в) и *AZ34* (б, г), выращенных без (а, б) и в присутствии 6 % ПЭГ (в, г)

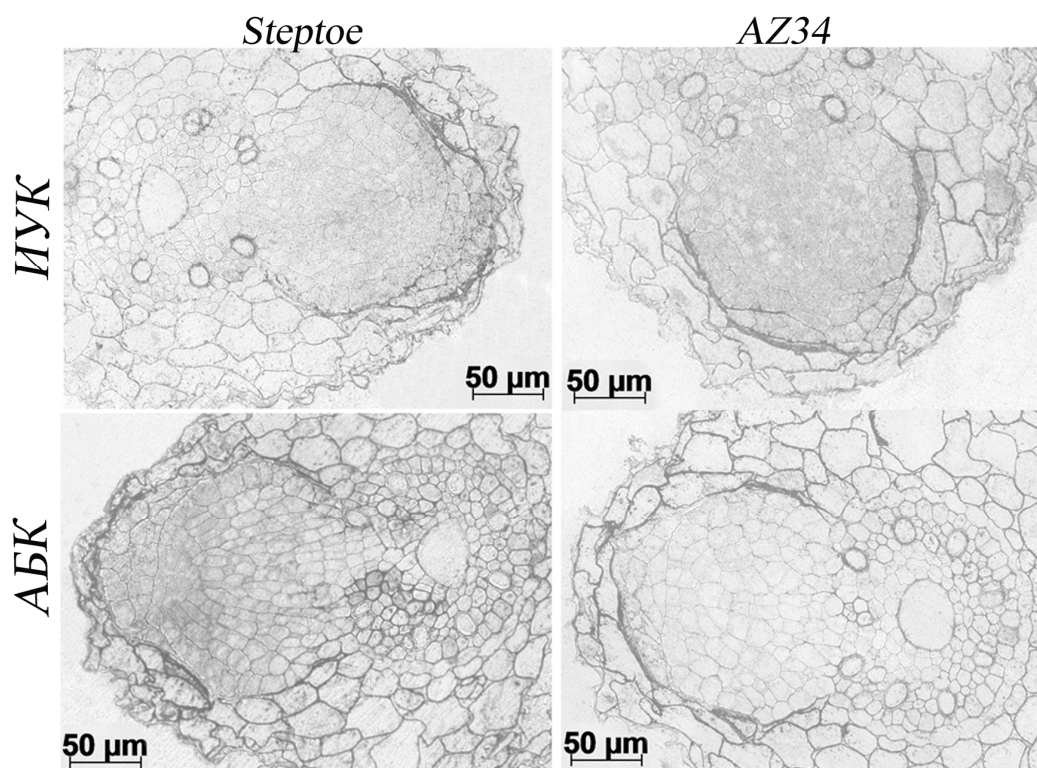


Рис. 2. Иммуногистохимическое окрашивание ИУК (а, б) и АБК (в, г) на поперечных срезах корней растений *Stephoe* (а, в) и *AZ34* (б, г), выращенных в присутствии 6 % ПЭГ



влиянием ПЭГ у растений *Stephoe*, сопровождалось пониженным содержанием ИУК, в то время как для растений AZ34, у которых не было повышения содержания АБК на фоне ПЭГ, окрашивание на ИУК поддерживалось на более высоком уровне по сравнению с растениями *Stephoe*.

Подсчет количества боковых корней показал снижение ветвления под влиянием ПЭГ у растений *Stephoe* (с четырех до двух боковых корней в расчете на один первичный корень) и отсутствие изменений уровня ветвления корней у AZ34, у которого количество боковых корней (5 на один первичный корень) достоверно не отличалось от значений у контрольных растений *Stephoe*. Снижение количества боковых корней под влиянием ПЭГ у растений *Stephoe* происходило на фоне повышения количества примордий боковых корней, что свидетельствует о подавлении удлинения зачатков боковых корней и их превращения в сформированные корни под влиянием ПЭГ. Уменьшение ветвления корней под влиянием ПЭГ у растений *Stephoe* соответствовало пониженному уровню ауксинов в примордиях, а отсутствие этой реакции у дефицитного

по АБК мутанта – более интенсивному окрашиванию на ауксины примордий. Поскольку хорошо известно, что ауксины необходимы для ветвления корней, снижение ветвления под влиянием ПЭГ, зарегистрированное у *Stephoe*, можно объяснить пониженным уровнем ауксинов в примордиях. Отсутствие этой реакции у AZ34 также можно связать с ауксинами, уровень которых был выше, чем у *Stephoe* на фоне ПЭГ. Кроме того, особенность реагирования, которую мы обнаружили у дефицитного по АБК мутанта, указывает на значение способности растений к накоплению АБК для понижения уровня ауксинов и подавления ветвления под влиянием ПЭГ.

Для того чтобы проверить возможность причинно-следственной связи между накоплением АБК, с одной стороны, и уменьшением уровня ауксинов и подавлением ветвления - с другой, мы изучили влияние на растения AZ34 экзогенной АБК.

Как видно из рисунка 3, инкубация на растворе с экзогенной АБК увеличивала содержание АБК (рис. 3а) в корнях и одновременно приводило к снижению уровня в них ауксинов

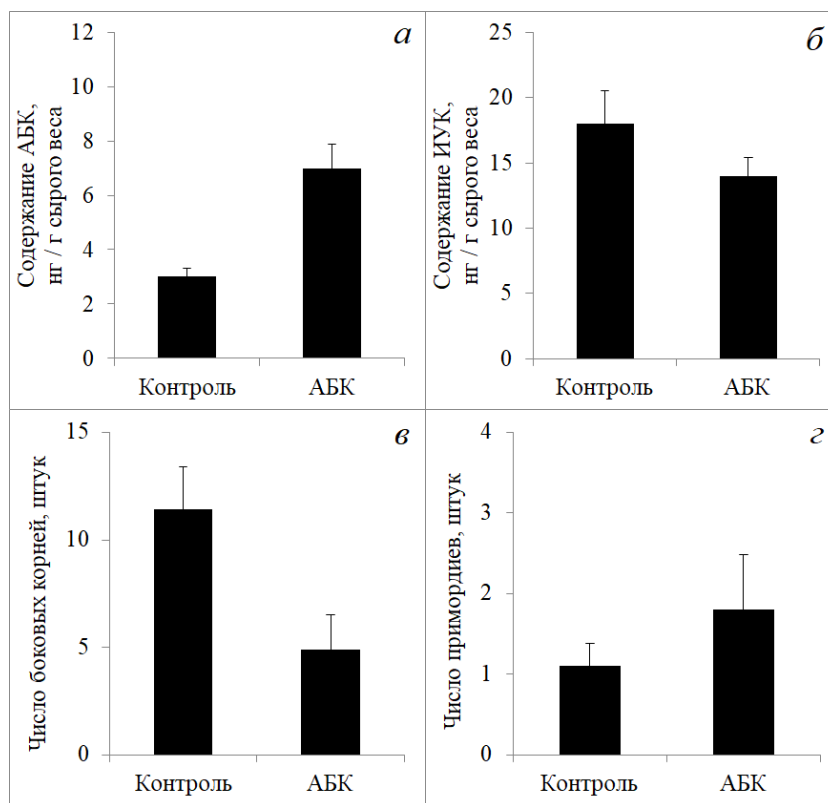


Рис. 3. Влияние добавления АБК в питательный раствор растений AZ34 на содержание в корнях АБК (а), ИУК (б) (через 2 дня после начала воздействия) и количество боковых корней (в) и их примордиев (г) (через 4 дня после начала воздействия). Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки (n=5)

(рис. 3б) и количества боковых корней (рис. 3в). Количество примордиев, наоборот увеличивалось под влиянием обработки экзогенным гормоном (рис. 3г), что указывает на подавление удлинения зачатков корней и нормального развития боковых корней. Реакция дефицитного по АБК мутанта на введение АБК извне в точности повторяла реакцию на дефицит воды, вызванный ПЭГ, у растений *Stephoe*. В обоих случаях было зарегистрировано накопление АБК и снижение уровня ауксинов (в первом случае во всей корневой системе, во втором – в примордиях боковых корней), что сопровождалось снижением количества боковых корней и увеличением количества их зачатков.

Таким образом, сравнение реакции на ПЭГ у растений дефицитного по АБК мутанта и его исходного сорта, а также изменения уровня гормонов и ветвления при введении экзогенной АБК в растения мутанта свидетельствует о важной роли накопления АБК в корнях в подавлении их ветвления и о связи этой реакции со снижением уровня ауксинов в корнях под влиянием АБК.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов И.И. Эндогенные ауксины и ветвление корней при изолированном питании растений пшеницы // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 2. С. 241 – 246. doi: 10.1134/S1021443709020101.
2. Kudoyarova G.R., Dodd I.C., Veselov D.S., Rothwell S.A., Veselov S.Y. Common and specific responses to availability of mineral nutrients and water // Journal of Experimental Botany. 2015. V. 66. № 8. P. 2133 – 2144. doi: 10.1093/jxb/erv017.
3. Lavenus J, Goh T, Roberts I, Guyomarc'h S, Lucas M, De Smet I, Fukaki H, Beeckman T, Bennett M, Laplaze L. Lateral root development in Arabidopsis: fifty shades of auxin // Trends Plant Sci. 2013. V.18. № 8. P. 450 – 458. doi: 10.1016/j.tplants.2013.04.006.
4. Xiong L, Wang RG, Mao G, Koczan JM. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid // Plant Physiology. 2006. V. 142. P. 1065–1074. doi: 10.1104/pp.106.084632.
5. Du H, Wu N, Fu J, Wang S, Li X, Xiao J, Xiong L. A GH3 family member, OsGH3-2, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice // Journal of

Experimental Botany. 2012. V.63. P. 6467 – 6480. doi: 10.1093/jxb/ers300.

6. Wang T, Li C, Wu Z, Jia Y, Wang H, Sun S, Mao C, Wang X. Abscisic acid regulates auxin homeostasis in rice root tips to promote root hair elongation // Front Plant Sci. 2017. V.28. №8. P. 1121. doi: 10.3389/fpls.2017.01121.

7. Veselov D.S., Mustafina A.R., Sabirjanova I.B., Akhiyarova G.R., Dedov A.V., Kudoyarova G.R., Veselov S.U. Effect of PEG-treatment on the leaf growth response and auxin content in shoots of wheat seedlings // Plant Growth Regulation. 2002. V. 38. № 2. P. 191 – 194. doi: 10.1023/A:1021254702134.

8. 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. № 6. С. 926 – 931. doi: 10.1134/S1021443707060167.

#### References

1. Ivanov I.I. Endogenous auxins and branching of wheat roots gaining nutrients from isolated compartments // Russian Journal of Plant Physiology. 2009. V. 56. № 2. P. 219 – 223. doi: 10.1134/S1021443709020101.
2. Kudoyarova G.R., Dodd I.C., Veselov D.S., Rothwell S.A., Veselov S.Y. Common and specific responses to availability of mineral nutrients and water // Journal of Experimental Botany. 2015. V. 66. № 8. P. 2133 – 2144. doi: 10.1093/jxb/erv017.
3. Lavenus J, Goh T, Roberts I, Guyomarc'h S, Lucas M, De Smet I, Fukaki H, Beeckman T, Bennett M, Laplaze L. Lateral root development in Arabidopsis: fifty shades of auxin // Trends Plant Sci. 2013. V.18. № 8. P. 450 – 458. doi: 10.1016/j.tplants.2013.04.006.
4. Xiong L, Wang RG, Mao G, Koczan JM. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid // Plant Physiology. 2006. V. 142. P. 1065 – 1074. doi: 10.1104/pp.106.084632.
5. Du H, Wu N, Fu J, Wang S, Li X, Xiao J, Xiong L. A GH3 family member, OsGH3-2, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice // Journal of Experimental Botany. 2012. V. 63. P. 6467 – 6480. doi: 10.1093/jxb/ers300.
6. Wang T, Li C, Wu Z, Jia Y, Wang H, Sun S, Mao C, Wang X. Abscisic Acid Regulates Auxin Homeostasis in Rice Root Tips to Promote Root Hair Elongation // Front Plant Sci. 2017. V.8. P.1121. doi: 10.3389/fpls.2017.01121.

7. Veselov D.S., Mustafina A.R., Sabirjanova I.B., Akhiyarova G.R., Dedov A.V., Kudoyarova G.R., Veselov S.U. Effect of peg-treatment on the leaf growth response and auxin content in shoots of wheat seedlings // *Plant Growth Regulation*. 2002. V. 38. № 2. P. 191 – 194. doi: 10.1023/A:1021254702134.

8. Vysotskaya L.B., Veselov D.S., Filippenko V.N., Ivanov E.A., Ivanov I.I., Kudoyarova G.R., Veselov S.Yu. Immunohistological localization and quantification of IAA in studies of root growth regulation // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2007. V. 54. № 6. P. 827 – 832. doi: 10.1134/S1021443707060167.



## ABSCISIC ACID INFLUENCE ON THE CONTENT OF AUXIN AND GROWTH OF LATERAL ROOTS OF BARLEY PLANTS

© G.R. Akhiyarova<sup>1</sup>, R.S. Ivanov<sup>1</sup>, D.S. Veselov<sup>1</sup>, S.Yu. Veselov<sup>2</sup>, G.R. Kudoyarova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ufa Institute of Biology, Ufa Research Centre, Russian Academy of Sciences,  
69, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

<sup>2</sup> Bashkir State University,  
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

Branching of the roots is an important adaptive response of plants, ensuring their adaptation to changes in the availability of water and elements of mineral nutrition. Suppressing the formation of lateral roots liberates resources to activate elongation, ensuring the absorption of water from the depth of the soil, where moisture is retained in the absence of rain. Hormones play an important role in the regulation of growth adaptive reactions. The dependence of branching on the level of auxins is well known. Participation of abscisic acid (ABA) in the process is also paid attention to, although the mechanism of its action on the branching is not fully disclosed. The role of this hormone increases in stress conditions, which are characterized by the accumulation of ABA. Immunohistochemical localization method revealed the presence of ABA in lateral root primordia. Adding neutral osmotically active agent polyethylene glycol (PEG) to the culture medium resulted in the accumulation of ABA in root primordia of lateral roots of parental variety Steptoe, but did not affect the hormone levels in its ABA deficient mutant. Thus primordia auxin content and the number of lateral roots were higher in plants AZ34. The ratio of root primordia and visible lateral roots increased in PEG-treated Steptoe plants, which indicated the suppression of the formation of developed lateral roots from their primordia under the influence of water deficiency. In order to check the possible cause-and-effect relationship between the increase in the content of ABA and lowering IAA level, ABA was added to the nutrient medium of the mutant. Exogenous hormone treatment reduced the auxin level and the number of lateral roots, which confirms the hypothesis that a greater level of auxins and number of lateral roots the water deficient mutant than in the plants of the original genotype, was associated with a decreased ability of AZ34 to accumulate ABA. The ratio of primordia and visible lateral roots increased under the influence of exogenous ABA, which indicates the role of elevated level of this hormone in suppressing the development of lateral roots from their primordia.

Key words: auxins, abscisic acid, root branching, barley, water deficiency, primordia.



УДК 575: 57.022

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-36-40

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ИНСЕКТИЦИДАМ У КОЛОРАДСКОГО ЖУКА: АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРНЫХ И ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ

© Г.В. Беньковская, Ю.М. Никоноров

Распространение резистентных популяций вредных насекомых и выявление резистентности к новым химическим препаратам, а также формирование резистентности к инсектицидам биологического происхождения остается острой проблемой в области не только производства сельскохозяйственной продукции, но и ее хранения. Накопленные за прошедшие годы факты расширения ареала резистентных видов и популяций насекомых не согласуются с представлением о пониженной приспособленности устойчивых особей. Очевидна необходимость исследований неспецифической устойчивости, в основе которой лежат, как предполагалось до последнего времени, конститутивные особенности, обеспечивающие определенный уровень толерантности к ксенобиотикам. Для устойчивых насекомых, относящихся к разным отрядам и к разным типам вредителей, обнаружен феномен усиления экспрессии большого числа кодирующих белки генов под действием инсектицидов. Целью работы было установление различий в транскрипционной активности генов, ассоциированных с диапаузным состоянием у особей колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say, не подвергавшихся в летний период воздействию инсектицидов и устойчивых особей, переживших обработки разными химическими соединениями: фосфорорганическим соединением пиримифос-метилом, либо неоникотиноидом тиаметоксамом или фенилпиразолом фипронилом. Имаго из выборки летней генерации проходили зимнюю диапаузу в лабораторных условиях. В период завершения диапаузы был проведен анализ транскрипционной активности ряда генов с помощью метода qPCR в режиме реального времени. В статье представлены данные о повышении транскрипционной активности генов нескольких рецепторных и запасных белков под действием инсектицидов у имаго колорадского жука из локальной популяции с выявленной множественной резистентностью. Обсуждается гипотеза об участии белковых продуктов генов экдизонового рецептора *ecr*, субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты *rdd*, гена запасного диапаузного белка *dp-1*, генов транспортных белков *fer* и *jhbP* в иммобилизации и депонировании молекул инсектицидов в период зимней диапаузы, что может представлять один из молекулярных механизмов неспецифической устойчивости к инсектицидам.

Ключевые слова: колорадский жук, резистентность к инсектицидам, диапауза, транскрипционная активность генов.

**Введение.** Постоянный рост затрат на расширение спектра инсектицидов, без использования которых известные агротехнические приемы и ротация препаратов не обеспечивают высокой эффективности защиты урожая и хранящейся продукции, обусловлен быстрым формированием резистентности у насекомых. Развитие резистентности, или специфической устойчивости,

связывают с распространением в природных популяциях насекомых-вредителей мутаций генов, кодирующих мишенные белки либо ферменты, деградирующие химические токсиканты [1]. Известно, что особи, приобретающие устойчивость к одному или нескольким ядам, чаще всего становятся менее приспособленными к неблагоприятным воздействиям как абиотического, так и

БЕНЬКОВСКАЯ Галина Васильевна – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: bengal2@yandex.ru

НИКОНОРОВ Юрий Михайлович – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: nikonorov@anrb.ru

биотического характера. Тем не менее, распространение резистентных популяций и выявление резистентности к новым химическим препаратам, а также формирование резистентности к инсектицидам биологического происхождения остается острой проблемой в области не только производства сельскохозяйственной продукции, но и ее хранения. Эти факты не согласуются с представлением о пониженной приспособленности устойчивых особей. Приходится признать, что необходимо исследовать и учитывать неспецифическую устойчивость, в основе которой лежат, как предполагалось до последнего времени, конститутивные особенности, обеспечивающие определенный уровень толерантности к ксенобиотикам. К этим особенностям относят строение покровов тела и состав кутикулы и покрывающих ее восков и липидов, повышенную активность ферментативных систем, способных снижать токсичность попавших в организм насекомого соединений, усиленную экскрецию и поведенческие реакции, направленные на избегание контакта с ядом [2]. Вопрос о конкретных молекулярно-биологических механизмах неспецифической устойчивости требует отдельного рассмотрения, и количество работ, посвященных этому, постоянно растет. Относительно недавно внимание исследователей привлекли результаты анализа экспрессии генов, на первый взгляд не имеющих прямого отношения к формированию устойчивости, поскольку продукты этих генов – белки, не являющиеся ферментами, участвующими в деградации инсектицидов. Для разных видов насекомых, относящихся к разным отрядам и типам вредителей, исследователи отмечают сходную картину – усиление экспрессии большого числа кодирующих различные белки генов [3].

Для такого вида, как колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* (Say), в популяциях на территории Республики Башкортостан регистрируется множественная устойчивость к инсектицидам из нескольких химических классов: фосфорорганическим (ФОС) и пиретроидным соединениям, неоникотиноидам и нерестиоксинам, отмечен рост устойчивости и к наиболее эффективному соединению из класса фенилпирозолов – фипронилю [4]. В работах последних

10 лет показано, что специфическая устойчивость и соответствующие мутации выявлены для ФОС и пиретроидов. Мутаций гена рецептора гамма-аминомасляной кислоты (GABA-A), обычно находящихся в локусе *rdl* и обеспечивающих резистентность к фипронилю не обнаружено, но при пониженной способности перенесших обработку этим веществом имаго колорадского жука к переживанию зимней диапаузы [5] доля устойчивых к фипронилю особей постоянно увеличивается. Целью нашей работы было установление различий в транскрипционной активности генов, ассоциированных с диапаузным состоянием у особей, не подвергавшихся в летний период воздействию инсектицидов и устойчивых особей, переживших обработки разными химическими соединениями.

**Методы и объекты исследования.** Эксперимент был заложен в сентябре 2016 года на выборке имаго (N = 240) летнего поколения из Бирского района РБ. За 1.5 месяца до постановки эксперимента половина выборки перенесла топикальные или кишечно-контактные обработки химическими инсектицидами в концентрациях, смертельных для чувствительных особей (инсектициды фипронил, тиаметоксам, пиримифос-метил). Все обработки проводили на имаго в возрасте 2х-3х недель методом топикального нанесения спиртовых растворов инсектицидов в дозе 1 мкл/особь.

**Регистрация состояния имаго.** Спустя 5 суток имаго в чашках Петри с гигроскопичной бумагой и поилками с чистой водой были помещены в темный шкаф. Начиная с середины марта, регулярно через каждые 2-3 недели определяли соотношение активных и диапаузирующих (неактивных) особей. В середине апреля опытные чашки Петри с имаго были перемещены на открытое место при естественном рассеянном освещении, начато кормление свежими листьями тепличного картофеля.

Для оценки изменений транскрипционной активности ряда генов, участвующих в поддержании и завершении диапаузы, выделяли РНК из тканей имаго колорадского жука. Для выделения РНК колорадского жука из каждой группы отбирали по 3 самки и 3 самца. Образцы тканей мышц торакса и гонад для выделения РНК брали

Транскрипционная активность генов рецепторных белков у имаго колорадского жука в период зимней диапаузы

Пол	Ткани	Содержание мРНК, относительно референсного гена <i>rp18</i> (среднее значение и ошибка среднего)			
		<i>ecr</i>		<i>rdl</i>	
		Контроль	Обработанные	Контроль	Обработанные
Самки	мышцы	0.00049 ± 0.00005	0.00144 ± 0.00034**	0.000024 ± 0.000002	0.000039 ± 0.000004*
	гонады	0.00046 ± 0.00005	0.00255 ± 0.00044**	0.000009 ± 0.000001	0.000012 ± 0.000001*
Самцы	мышцы	0.00023 ± 0.00002	0.00046 ± 0.00006**	0.000019 ± 0.000004	0.000018 ± 0.000008
	гонады	0.00069 ± 0.00008	0.00081 ± 0.00009	0.000065 ± 0.000003	0.000004 ± 0.0000003**

Примечание: \* - статистически значимое отличие от контроля,  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$ .

индивидуально. РНК выделяли с использованием набора РНК-Экстран (Синтол) в соответствии с протоколом производителя. Оценку транскрипционной активности генов с использованием в качестве референсного гена *rp18* рибосомного белка проводили по опубликованным ранее методам [6]. Определение содержания мРНК проводили для гена рецептора экдизона (*ecr*), гена запасного белка, ассоциированного с диапаузным состоянием колорадского жука (*dp-1*), гена транспортного белка, связывающего ювенильный гормон (*jhbp*), гена субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты (*rdl*), и гена запасного транспортного белка ферритина (*fer*). Реакцию амплификации в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2-3 нг рестрицированной ДНК и интеркалирующий краситель SYBR Green I в составе ПЦР Микса (Синтол, Россия) в пробирках объемом 0,2 мл на термоциклере RotorGene6000 фирмы Corbett (Australia). Статистическая обработка результатов проведена при помощи программ Excel 2003.

**Результаты и обсуждение.** Данные сопоставления транскрипционной активности генов рецепторных белков *ecr* и *rdl* представлены в табл. 1.

Сопоставление полученных данных показало, что для диапаузирующих самок характерно повышение содержания мРНК обоих генов, как в

мышцах, так и в гонадах. Для самцов такое изменение уровня транскрипционной активности отмечено только для гена *ecr*, причем достоверное повышение зарегистрировано в мышечных тканях. Изменение уровня содержания мРНК этого гена у самок (в 3-5 раз) вряд ли можно объяснить результатом стресс-реакции. Возможно, что различия между генами рецепторных белков связаны с тем, что один из них (рецептор GABA-A) является трансмембранным, находящимся на внешней мембране клетки [7], а другой является внутриклеточным, причем функции рецептора он способен выполнять только после димеризации с другим белком [8]. Мономер Ecr определенное время находится в несвязанном виде в цитоплазме клетки, так же, как еще не подвергшийся inserции в клеточную мембрану белок Rdl. Мы предполагаем, что эти мономеры, а также конформационно измененные протеиновые компоненты рецепторных комплексов у устойчивых к инсектицидам особей обладают повышенной аффинностью к молекулам органических инсектицидов, что позволяет им осуществлять своеобразную иммобилизацию токсичных веществ.

Еще более выраженной способностью к связыванию с органическими токсикантами могут обладать молекулы белков, в организме насекомых реализующими транспорт и депонирование запасных веществ, в том числе липидов как стероидной, так и изопреноидной структуры.

Транскрипционная активность генов запасных транспортных белков у имаго колорадского жука в период зимней диапаузы (содержание мРНК, относительно референсного гена *gp18*; среднее значение с ошибкой)

Ген	Пол	контроль		обработанные	
		мышцы	гонады	мышцы	гонады
<i>dp-1</i>	Самки	0.0229 ± 0.0071	0.0169 ± 0.0034	0.4499 ± 0.0061***	0.5661 ± 0.055***
	Самцы	0.00495 ± 0.00051	0.00682 ± 0.0009	0.03522 ± 0.0071***	0.09282 ± 0.007***
<i>fer</i>	Самки	0.3215 ± 0.051	0.5369 ± 0.081	0.5290 ± 0.042*	0.8608 ± 0.025**
	Самцы	0.4109 ± 0.069	0.2122 ± 0.045	0.6437 ± 0.072*	13.591 ± 1.65***
<i>jhbp</i>	Самки	0.1783 ± 0.018	1.093 ± 0.113	0.3453 ± 0.042**	0.9642 ± 0.052
	Самцы	0.1628 ± 0.011	0.0025 ± 0.0005	0.3625 ± 0.037**	0.0035 ± 0.0001*

Примечание: \* - статистически значимое отличие от контроля,  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$ .

В таблице 2 приведены результаты оценки транскрипционной активности у имаго колорадского жука генов белков, выполняющих запасные и транспортные функции.

Транспортный белок ферритин, кодируемый геном *fer*, известен как переносчик стероидов. Наши данные свидетельствуют о существенном повышении транскрипционной активности этого гена у обработанных инсектицидами устойчивых особей обоих полов. Для транспортного белка ЛНВР, связывающегося с ювенильным гормоном и переносящим его, мы также обнаружили повышение содержания соответствующей мРНК. Отсутствие такого повышения в гонадах самок может объясняться постоянным высоким содержанием мРНК этого гена (*jhbp*) в тканях гонад, что является необходимым условием поддержания их нормального состояния даже в период репродуктивной диапаузы. Вероятно, что эти транспортные белки у устойчивых к определенным (или сразу нескольким) инсектицидам особей могут связываться с молекулами токсикантов и таким образом до некоторой степени снижать их токсическое действие, причем вполне возможно, что такое связывание способствует и усиленной экскреции инсектицидов [9].

Наибольшее повышение содержания мРНК под действием инсектицидов отмечено нами у устойчивых особей для гена запасного белка *dp-1*. Этот белок, в период зимней диапаузы являющийся одним из основных поставщиков свободных аминокислот, локализуется преимущественно в жировом теле имаго, хотя обнаруживается и в других тканях. Жировое тело считается основным депонирующим органом, и в то же время, здесь осуществляется огромное количество биосинтетических и катаболических процессов [10]. Связанные с белком DP-1 молекулы токсикантов успешно выводятся из активного метаболизма, и опасность их для насекомого существенно снижается.

Мы представляем в нашей статье гипотезу о способности к повышению транскрипционной активности генов белков, являющихся потенциальными агентами связывания молекул токсикантов, как об одном из основных механизмов неспецифической устойчивости к токсичным соединениям.

**Благодарности:** Работа выполнена в рамках государственного задания Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН (тема № АААА-А16-11602035003), а также при частичной поддержке РФФИ (грант №17-44-020347р\_а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Casida J.E., Durkin K.A. Pesticide Chemical Research in Toxicology: Lessons from Nature // Chem. Res. Toxicol. 2017. V. 30. No.1. P.94-104.
2. Wing K.D. It takes a team: reflections on insecticide discoveries, toxicological problems and enjoying the unexpected // Pest Manag. Sci. 2017. V.73. No.4. P.666-671.
3. Erban T., Harant K., Chalupnikova J., et al. Beyond the survival and death of the deltamethrin-threatened pollen beetle *Meligethes aeneus*: An in-depth proteomic study employing a transcriptome database // J. Proteomics. 2017. V.150. P.281-289.
4. Беньковская Г.В., Никоноров Ю.М. Роль диапаузы в формировании и распространении резистентных популяций *Leptinotarsa decemlineata* // Проблемы популяционной биологии: материалы XII Всероссийского популяционного семинара памяти Николая Васильевича Глотова (1939–2016), Йошкар-Ола, 11–14 апреля 2017 г. Йошкар-Ола: ООО ИПФ «Стринг», 2017. С. 43-45.
5. Никоноров Ю.М., Сыртланова Л.А., Китаев К.А., Беньковская Г.В. Транскрипционная активность генов, участвующих в регуляции диапаузы Colorado potato beetle, и ее изменения под влиянием инсектицида фипронила // Экологическая генетика. 2016. Т. 14, №3. С. 56-63.
6. Никоноров Ю.М., Беньковская Г.В.. Механизмы поддержания полиморфизма по продолжительности жизни в лабораторных линиях комнатной мухи // Успехи геронтологии. 2013. Т.26. №4. С. 594-600.
7. Buckingham S.D., Ihara M., Sattelle D.B., Matsuda K. Mechanisms of Action, Resistance and Toxicity of Insecticides Targeting GABA Receptors // Curr. Med. Chem. 2017. V.24. No.27. P.2935-2945.
8. Hu X., Xie J., Hu S. et al. Exploration of the binding affinities between ecdysone agonists and EcR/USP by docking and MM-PB/GBSA approaches // J. Mol. Model. 2017. V.23. No.5. P.166.
9. Sun H., Buchon N., Scott J.G. Mdr65 decreases toxicity of multiple insecticides in *Drosophila melanogaster* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2017. V.89. P.11-16.
10. Van Hoof D., Rodenburg K.W., Van der Horst D. Lipophorin receptor-mediated lipoprotein endocytosis in insect fat body cells // Journal of Lipid Research. 2003. V. 44. P. 1431 – 1440.



**MOLECULAR MECHANISMS OF NON-SPECIFIC TOLERANCE TO INSECTICIDES IN COLORADO POTATO BEETLE: ACTIVATION OF GENES TRANSCRIPTION OF RECEPTOR AND STORE PROTEINS**

© G.V. Benkovskaya, Yu.M. Nikonorov

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of RAS,  
71, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

Summary Spreading of resistant populations of insect pests and detection of resistance toward a new chemical preparations as well as development of resistance to insecticides of biological origins are considering the critical problem in the field of crop protection but also of crop storage. Facts of extension of resistant species and populations area which has been accumulated during past years are not in accordance with conception of reduced fitness in resistant individuals. The necessity is obvious to investigate the non-specific tolerance which is based, as was supposed until recently, on the constitutive peculiarities providing the certain level of xenobiotic resistance. The phenomenon has been revealed of expression enhancement for a number of genes coding proteins under insecticide impact in different orders of insect pests. The aim of our investigation was determination of distinctions in transcriptional activity of genes associated with diapause in Colorado potato beetles *Leptinotarsa decemlineata* Say not exposed to insecticides in summer and resistant ones survived after treatments by different chemical compounds: organophosphate pirimifos-methyl, neonicotinoid tiamethoxam, or phenylpyrazole fipronil. Adults from the excerpt of Colorado potato beetle summer generation in Bashkortostan Republic entered the winter diapause under laboratory conditions. At the phase of diapause termination the analysis of transcriptional activity performed for a set of genes using real-time qPCR method. In the article data presented of enhancing of transcriptional activity of some receptor and store proteins genes under insecticide influence in Colorado potato beetle adults from local population with detected multiple resistances. The hypothesis has been discussed concerning the participation of proteins coding by gene of ecdysone receptor *ecr*, gene of subunit of gamma-aminobutyric acid receptor GABA-A *rdl*, gene of store diapause protein *dp-1*, genes of transport proteins *fer* and *jhbP* in immobilization and deposition of insecticide molecules during winter diapause which may present one of molecular mechanisms of non-specific tolerance to insecticides.

Key words: Colorado potato beetle, insecticide resistance, diapause, transcriptional activity of genes.

УДК 58.085

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-41-47

## ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ПРЕГЕНЕРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ ЛИМОНОВ И ЦИТРОНОВ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

© Э.Г. Билалова, М.М. Ишмуратова, Ф.В. Садыкова

Самой северной точкой выращивания лимонов в России является учебно-опытное хозяйство ГБПОУ «Уфимский лесотехнический техникум» (Уфимский лимонарий), где на протяжении почти 30 лет ведется работа по выращиванию и изучению тропических и субтропических культур. К сегодняшнему дню коллекция цитрусовых насчитывает 27 видов и сортов рода *Citrus*. Выведены новые сорта лимона и цитрона.

Перед лимонководством в настоящее время стоят следующие задачи: формирование и поддержание генетического банка в коллекциях открытого и закрытого грунта, а также в коллекциях культуры *in vitro*, являющегося основой для селекции; создание новых сортов; размножение перспективных сортов. В статье с целью подготовки подвоя для микропрививок в условиях *in vitro* представлена сравнительная характеристика жизнеспособности семян цитрусовых башкирской и узбекской селекции: *Citrus limon* (L.) Burm. (лимон) сортов «Урман», «Салават», «Лейсан», «Ташкентский» и «Юбилейный» и *Citrus medica* L. (цитрон) сортов «Зиля», «Уралтау» при различных сроках введения их в культуру *in vitro*. Установлено, что жизнеспособность семян из зрелых плодов выше при введении их в культуру *in vitro* в осенний период. Для перечисленных сортов рекомендовано использовать для введения семян *in vitro* зрелые плоды. Показано, что гормональные факторы питательной среды *in vitro* стимулируют прорастание семян, сокращают длительность онтогенеза и убыстряют темпы развития растений, что способствует ускоренному размножению селекционного материала, особенно у малосемянных сортов. Установлено, что относительно быстрыми темпами развития характеризуются растения лимона сорта «Салават», относительно медленными темпами развития характеризуются сорта лимона «Ташкентский» и «Урман». Описаны особенности роста и развития прегенеративных растений сортов лимона и цитрона в культуре *in vitro* и *in vivo*. В условиях культуры *in vitro* начало прорастания семян наблюдали на 8 день культивирования, а в почвенном субстрате - на 24 день эксперимента. Метод культуры *in vitro* значительно сокращает сроки подготовки подвоев для выполнения микропрививок *in vitro*. При этом сортовые особенности в темпах развития растений сохраняются.

Ключевые слова: *Citrus*, коллекция, сорт, темпы развития, прорастание семян, культура *in vitro*.

**Введение.** Лимон – теплолюбивая культура и в силу этого отрасль лимонководства в России, к сожалению, не развита. В тоже время есть организации, в которых собраны и поддерживаются крупные коллекции цитрусовых, в т.ч. ли-

монов (ВНИИЦиСК г. Сочи, Саратовский лимонарий, питомник «Павловский лимон»), где разработаны агротехника выращивания цитрусовых в условиях открытого и закрытого грунта, ведется селекция некоторых культур.

БИЛАЛОВА Эльвира Гизаровна, Уфимский лесотехнический техникум, Башкирский государственный университет, e-mail: bilalova77@mail.ru

ИШМУРАТОВА Майя Мунировна – д.б.н., Башкирский государственный университет, Магнитогорский государственный технический университет им. Г.И. Носова, e-mail: ishmuratova@mail.ru

САДЫКОВА Фарида Валиевна – к.б.н., Уфимский лесотехнический техникум, e-mail: lemonarium@mail.ru

Перед лимонководством в настоящее время стоят следующие задачи: формирование и поддержание генетического банка в коллекциях открытого и закрытого грунта, а также в коллекциях культуры *in vitro*, являющегося основой для селекции; создание новых сортов; размножение перспективных сортов, возможность импортозамещения.

Самой северной точкой выращивания лимонов в России является учебно-опытное хозяйство ГБПОУ «Уфимский лесотехнический техникум» (Уфимский лимонарий), где на протяжении почти 30 лет ведется работа по выращиванию и изучению тропических и субтропических культур. Коллекция лимонария представлена 27 видами и сортами рода *Citrus* разного происхождения: *C. medica* L. – сорта «Павловский», «Рука Будды», «Уралтау», «Зиля», *C. maxima* (Burm.) Merr., *C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle, *C. paradise* Macfad., *C. sinensis* (L.) Osb., *C. reticulate* Blanco var. *unshiu* Tan., *C. limon* (L.) Burm. – сорта «Мейер», «Лисбон», «Пандероза», «Иркутский», «Кабо», «Павловский», «Дженоа», «Первенец», «Лейсан», «Салават», «Урман», «Эврика», «Юбилейный», «Ташкентский», *Citrofortunella micro-carpa* cv. Var. Среди них есть сорта лимона и цитрона башкирской селекции - «Урман», «Салават», «Лейсан», «Уралтау» и «Зиля», внесенные Госсортомиссией Российской Федерации в Госреестр. Собран большой фактический материал по особенностям выращивания в условиях закрытого грунта перечисленных сортов [1, 2].

Метод культуры *in vitro* к настоящему времени широко используется для сохранения и размножения лимонов [3], для клонального микроразмножения перспективных и высокоурожайных сортов с использованием широкого спектра приемов культивирования [4-8], в том числе и при помощи микропрививок [3]. Метод также можно использовать в селекции лимонов, поскольку есть возможность эффективно и без потерь проращивать семена в культуре *in vitro*, полученные в процессе гибридизации, и использовать эмбриониды как основу для вовлечения в селекционный процесс.

К настоящему времени нами начаты исследования по клональному микроразмножению *in vitro* сортов лимона и цитрона башкирской и

узбекской селекции [9 и др.]. Разработаны схемы стерилизации эксплантов, изучаются особенности биологии разных сортов в культуре *in vitro*.

Проведение микропрививок связано с подготовкой подвоя и привоя в условиях *invitro*. В качестве подвоя, как правило, используют прегенеративные растения, выращенные из семян в культуре тканей. Важным в этих работах является выбор оптимального возрастного состояния растения-подвоя для эффективного выполнения микропрививок, а также выбор оптимальных сроков введения в культуру тканей семян у ремонтантных сортов. У малосемянных сортов культура *in vitro* позволяет максимально, без потерь использовать семенной материал.

Ранее нами проведены исследования по изучению эффективности проращивания *in vitro* семян, изолированных из незрелых (полужелтых) и зрелых плодов на примере сортов «Ташкентский» и «Юбилейный». Показано, что семена из полужелтых плодов обоих сорта характеризуются относительно низкой всхожестью (33 – 67 %), чем семена, изолированные из зрелых плодов. В целом, сорт «Юбилейный» характеризующийся многосемянностью, обладает относительно высокой всхожестью семян, чем сорт «Ташкентский».

В литературе описано использование в условиях *in vitro* подсушенных семян для повышения их всхожести [4]. В наших исследованиях установлено эффективное использование неподсушенных семян для культивирования *in vitro*.

Цель работы – сравнительная характеристика роста и развития прегенеративных растений различных сортов лимона и цитрона в условиях *in vitro* и *in vivo*.

**Материалы и методы исследования.** Объектами исследования являлись 27-ие летние растения лимона сортов «Лейсан», «Салават», «Урман», «Ташкентский» и цитрона «Уралтау», «Зиля». В качестве эксплантов использовали семена из зрелых плодов и узлы из однолетних вегетативных побегов. Стерилизацию растительного материала проводили по разработанной нами схеме, последовательно в растворах «Бриллиант» и 70 % раствор этилового спирта.

В качестве питательной среды использовали модифицированную питательную среду

Мурасиге-Скуга [10] с гормональными добавками цитокининовой и ауксиновой природы, рН 5,5-5,8 с добавлением 10 г/л агара, 25 г/л сахарозы.

Семена, изъятые из каждого плода, делили на две группы, одну группу помещали на питательную среду культивирования в условиях *in vitro*, а другую - одновременно высевали в почвенный субстрат. Ввели наблюдения за темпами развития растений в условиях *in vitro* и *in vivo*, измеряли морфометрические характеристики морфологических признаков.

Т а б л и ц а 1

Эффективность стерилизации эксплантов лимона и цитрона в условиях культуры *in vitro* в осенний период (2017 г.)

Объект	Эффективность стерилизации, %	
	доля стерильных эксплантов	доля жизнеспособных эксплантов
Узлы		
Лимон сорт «Лейсан»	25,0	65,0
Лимон сорт «Салават»	25,0	60,0
Семена		
Лимон сорт «Лейсан»	85,0	85,0
Лимон сорт «Салават»	80,0	75,0
Цитрон сорт «Уралтау»	85,0	70,0

**Результаты и обсуждение.** Результаты стерилизации эксплантов на примере некоторых сортов лимонов и цитрона башкирской селекции представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что при подобранной оптимальной схеме стерильность узлов вегетативных побегов составила 25 %, семян – 80-85 % независимо от сорта. Доля стерильности эксплантов в виде узлов вегетативных побегов в наших экспериментах стабильно низкая, что, по видимому, в целом связано с высокой зараженностью многолетних оранжерейных растений бактериальной и грибковой инфекцией, а также клещами. Доля жизнеспособных эксплантов из них составила 60-65 %. При использовании семян доля жизнеспособных эксплантов составила 40-95 % в зависимости от сорта и времени введения в культуру *in vitro* (табл. 1, 2). Например, семена лимона сорта «Лейсан» в зависимости от сроков введения их в культуру *in vitro* (осень, весна) характеризовались широким диапазоном жизнеспособности – 40-85 %. Осенью созревают плоды лимонов, фаза цветения которых приходилась на весенний период, жизнеспособность семян из осенних плодов высокая (табл. 1). Весной созревают плоды лимонов, цветение которых приходилось на осенний период, жизнеспособность семян из этих плодов лимона сорта «Лейсан» в два раза ниже (табл. 2).

Вели наблюдения за темпами развития растений, выросших из семян в культуре *in vitro*

Т а б л и ц а 2

Доля жизнеспособных семян и темпы развития растений лимонов и цитронов при весеннем введении их в культуру *in vitro* (2017 г.)

Сорт	Доля семян, %			Возрастные состояния, % (доля жизнеспособных эксплантов)		
	зараженных	непроросших	жизнеспособных	проростки	ювенильные	имматурные
Лимон						
Лейсан	8,0	60,0	40,0	23,0	17,0	0
Салават	33,0	34,0	66,0	6,0	53,0	7,0
Урман	0	27,3	72,7	72,7	0	0
Ташкентский	0	33,3	66,7	66,7	0	0
Цитрон						
Зиля	0	5,3	94,7	10,5	84,2	0





Рис. 1. Ювенильное растение лимона сорт «Лейсан» через 18 дней культивирования в культуре *in vitro*



Рис. 2. Растения цитрона сорт «Зиля» в культуре *in vitro* в ювенильном (а, 18 дней культивирования) и имматурном (б, 45 дней культивирования) состояниях



Рис. 3. Имматурное растение лимона сорт «Салават» через 18 дней культивирования в культуре *in vitro*



Рис. 4. Ювенильные растения лимона сортов «Ташкентский» (а) и «Урман» (б) через 45 дней культивирования в условиях культуры *in vitro*

(табл. 2). При эксплантировании семян в весенний период доля проросших составила 40-95 % в зависимости от сорта. На 18 день культивирования лимон сорта «Лейсан» (рис. 1) и лимон сорта «Зиля» (рис. 2) находились в состояниях проростка и ювенильном. Относительно быстрыми темпами развития характеризовался лимон сорта «Салават», через три недели культивирования растения находились в имматурном (рис. 3), большинство в ювенильном состоянии, незначительная доля в состоянии проростка. Относительно медленными темпами развития характеризовались сорта лимона «Ташкентский» и «Урман», все растения находились в состоянии проростка. Ювенильные

растения лимона сортов «Ташкентский» и «Урман» через 45 дней культивирования представлены на рис. 4.

Одновозрастные растения сортов лимона и цитрона при культивировании в условиях *in vitro* различаются по морфологическим характеристикам и сохраняют сортоспецифические признаки. В табл. 3 показаны морфометрические характеристики морфологических признаков одновозрастных ювенильных растений лимона сорта «Лейсан» и цитрона сорта «Уралтау».

Для одновозрастных растений (относительный возраст) лимона сорта «Лейсан» характерно меньшее число побегов, чем для цитрона сорта

Сравнительная характеристика морфологических признаков лимона сорт «Лейсан» и цитрона сорт «Уралтау» в условиях культуры *in vitro*

Сорт	Число побегов, шт.	Длина побега, см	Длина корневой, см	Число листьев на побеге, шт.	Размеры листьев, см	
					Ширина	Длина
Лейсан	1,0±0,5	3,0±0,8	3,3±1,7	3,0±1,0	0,6±0,1	1,0±0,2
Уралтау	2,0±0,9	1,6±0,3	2,2±1,3	5,0±1,0	0,8±0,1	1,2±0,2

«Уралтау» (табл. 3). Побеги цитрона характеризуются большим числом относительно крупных листьев.

Одновременно семена лимона и цитрона проращивали на питательной среде в условиях *in vitro* и высевали в почвенный субстрат. Условия выращивания влияли на темпы развития растений. В условиях культуры *in vitro* растения отличались быстрыми темпами развития, начало прорастания наблюдали на 8 день культивирования. К 18 дню культивирования растения в зависимости от сорта находились в состоянии проростка, ювенильном и имматурном (табл. 2), что связано с воздействием гормональных факторов питательной среды. В условиях *in vivo* в почвенном субстрате начало прорастания семян наблюдали лишь на 24 день эксперимента. Растения в почвенных условиях через 4-5 месяцев выращивания находились в ювенильном состоянии и имели плохо развитую корневую систему, растения в условиях *in vitro* находились в имматурном возрастном состоянии, имели облиственные побеги и хорошо развитую корневую систему.

Таким образом, метод культуры *in vitro* позволяет эффективно и без потерь проращивать семена лимона и цитрона башкирской и узбекской селекции, полученные в процессе гибридизации, особенно у малосемянных сортов; значительно ускорять темпы развития растений и сокращать длительность пребывания растений в отдельных возрастных состояниях; значительно сокращать сроки подготовки подвоев для выполнения микропрививок *in vitro*, при этом сохраняя сортовые особенности в темпах развития растений; для введения семян *in vitro* лучше использовать зрелые плоды, созревание которых приходится на осенний период.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Садыкова Ф.В., Чурагулова З.С., Билалова Э.Г., Газиева Э.М. О технологии выращивания лимонных деревьев в теплице круглогодичного действия // Известия Уфимского научного центра РАН. 2015. №4 (1). С. 134-136.
2. Билалова Э.Г., Садыкова Ф.В., Ишмуратова М.М. Характеристика сырья цитрусовых уфимского лимонария // Устойчивое развитие территорий: теория и практика: Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции. Сибай: Сибайский информационный центр – филиал ГУП РБ Издательский дом «Республика Башкортостан», 2018. С. 147-149.
3. Самарина Л.С. Оптимизация приемов микроразмножения и сохранения лимона *in vitro*: Автореф. дис.... канд. биол. наук. М, 2013. 23 с.
4. Kasprzyk-Pawelec A., Pietrusiewicz J., Szczuka E., Curie-Skłodowska M. In vitro regeneration induced in leaf explants of Citrus limon L. Burm cv. 'Primofiore' // Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus. 14(4). 2015. P. 143-153.
5. Carimi F., De Pasquale F., Crescimanno F. Somatic embryogenesis in Citrus from style culture // Plant Science. 105(1). 1995. P 81-86.
6. Carimi F. Somatic embryogenesis and organogenesis in citrus for sanitatio and in vitro conservation. In: D'Onghia A.M. (ed.), Menini U. (ed.), Martelli G.P. (ed.). Improvement of the citrus sector by the setting up of the common conservation strategies for the free exchange of healthy citrus genetic resources. Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches; n. 33. Bari: CIHEAM, 2001. P. 115-128.
7. Kour K., Singh B. In vitro multiplication of rough lemon (Citrus jambhiri Lush.) // Journal of Agriculture and Veterinary Science. India. Vol.1. №4. 2012. P.5-9.
8. Goswami K., Sharma R., Singh P., Singh G. Micropropagation of seedless lemon (Citrus limon L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of genetic fidelity of

micropropagated plants using RAPD markers // Physiology and Molecular Biology of Plants. Vol.19. № 1. 2013. P 137–145.

9. Билалова Э.Г., Ишмуратова М.М. Размножение цитрусовых в культуре *in vitro* // Биологические аспекты распространения, адаптации и устойчивости растений: Материалы всероссийской (с международным участием) научной конференции. Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2016. С. 53-55.

10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. № 13. P. 437-497.

### References

1. Sadykova F.V., Churagulova Z.S., Bilalova E.G., Gazieva E.M. On the technology of growing lemon trees in a greenhouse of year-round action // *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN.* 2015. № 4 (1). Pp. 134-136.

2. Bilalova E.G., Sadykova F.V., Ishmuratova M.M. Characteristics of raw citrus fruits of Ufa lemonary // Proceedings of the IX All-Russian Scientific and Practical Conference "Sustainable Development of Territories: Theory and Practice". Sibai, 2018. P. 147-149.

3. Samarina L.S. Optimization of micropropagation and lemon conservation *in vitro*: Abstract. dis...cand. biol. sciences. M: 2013. 23 pp.

4. Kasprzyk-Pawelec A., Pietrusiewicz J., Szczuka E., Curie-Skłodowska M. *In vitro* regeneration induced in leaf explants of *Citrus limon* L. *Burm*

cv.'Primofiore' // *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus.* 14(4) 2015. P. 143-153.

5. Carimi F., De Pasquale F., Crescimanno F. Somatic embryogenesis in *Citrus* from style culture // *Plant Science.* 105(1). 1995. P 81-86.

6. Carimi F. Somatic embryogenesis and organogenesis in citrus for sanitatio and *in vitro* conservation. In: D'Onghia A.M. (ed.), Menini U. (ed.), Martelli G.P. (ed.). Improvement of the citrus sector by the setting up of the common conservation strategies for the free exchange of healthy citrus genetic resources. Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches; n. 33. Bari: CIHEAM, 2001. P. 115-128.

7. Kour K., Singh B. *In vitro* multiplication of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) // *Journal of Agriculture and Veterinary Science. India.* Vol.1. №4. 2012. P.5-9.

8. Goswami K., Sharma R., Singh P., Singh G. Micropropagation of seedless lemon (*Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD markers // *Physiology and Molecular Biology of Plants.* Vol.19. № 1. 2013. P 137–145.

9. Bilalova E.G., Ishmuratova M.M. Reproduction of citrus in culture *in vitro* // Materials of the all-Russian (with international participation) scientific conference. "Biological aspects of plant propagation, adaptation and stability". Saransk: Mordovian University Publishing House. 2016. С 53-55.

10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. № 13. P 437-497.

## FEATURES OF DEVELOPMENT OF PREGENERATIVE PLANTS OF LEMONS AND CITRONS IN CULTURE *IN VITRO*

© E.G. Bilalova<sup>1,2</sup>, M.M. Ishmuratova<sup>2,3</sup>, F.V. Sadykova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ufa Forestry Technical College,  
60, ulitsa Sverdlova, 450076, Ufa, Russian Federation

<sup>2</sup> Bashkir State University Russia,  
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

<sup>3</sup> Magnitogorsk State Technical University G.I. Nosov,  
38, ulitsa Lenina, 455000, Magnitogorsk, Russian Federation

The northernmost point of cultivation of lemons in Russia is the training and experimental farm of the GBPOU "Ufa Forestry Technical School" (Ufa Limonarium), where for almost 30 years the work on growing and studying tropical and subtropical crops has been conducted. To date, the citrus collection includes 27 species

and varieties of the genus *Citrus*. There are new varieties of lemon and citron.

Before lemon production, the following tasks now stand: the formation and maintenance of a genetic bank in collections of open and closed soil, as well as in collections of in vitro culture, which is the basis for breeding; creation of new varieties; reproduction of promising varieties. In the article, in order to prepare a stock for micro-vaccinations in vitro, the comparative characteristics of the viability of citrus seeds of Bashkir and Uzbek breeding are presented: *Citrus limon* (L.) Burm. (lemon) varieties "Urman", "Salavat", "Leysan", "Tashkent" and "Jubilee" and *Citrus medica* L. (citron) of the varieties "Zilya", "Uraltau" at various periods of their introduction into culture in vitro. It is established that the viability of seeds from mature fruits is higher when they are introduced into the culture in vitro in the autumn period. For the listed varieties, it is recommended to use mature fruits for the introduction of seeds in vitro. It is shown that the hormonal factors of the nutrient medium in vitro stimulate the germination of seeds, shorten the duration of ontogeny and speed up the rate of plant development, which facilitates the accelerated reproduction of the selection material, especially in small-seed varieties. It has been established that plants of lemon "Salavat" are characterized by a relatively fast growth rate, lemon varieties "Tashkent" and "Urman" are characterized by relatively slow growth rates. The features of growth and development of the regenerative plants of lemon and citron varieties in culture in vitro and in vivo are described. Under in vitro culture conditions, the onset of seed germination was observed on the 8th day of cultivation, and in the soil substrate on day 24 of the experiment. The in vitro culture method significantly shortens the time required to prepare rootstocks for microvaccination in vitro. In this case, varietal features in the rate of plant development are preserved.

Key words: *Citrus*, collection, variety, growth rates, seed germination, culture in vitro.

УДК 577.175.12

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-48-53

**ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА  
НА ОРГАНОГЕНЕЗ ОРХИДЕЙ *IN VITRO***

© Е.В. Большакова, И.С. Емельянова, А.С. Лукаткин

При культивировании орхидных *in vitro* возникает ряд трудностей, связанных с биологическими и экологическими особенностями этих видов. В статье приведены результаты двух серий опытов по культивированию орхидей ванды гибридной (*Vanda hybrida*), анектохилуса Роксбурга (*Anoectochilus roxburghii* Wall.) и липариса Лёзеля (*Liparis loesélii* L.) на различных питательных средах – Фаста, Мурасиге-Скуга (МС), Кнудсона (первая серия). В другой серии анализировали влияние регуляторов роста (РР) – различных концентраций цитокининов (6-бензиламинопурина (6-БАП), тидиазурона, кинетина) в совокупности с 0,5 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК) при выращивании орхидей на среде МС. Растения культивировали в условиях постоянного освещения белыми люминесцентными лампами при температуре 20–24 °С. Измерения проводили еженедельно, учитывали количество и длину листьев и побегов, образование и длину корней. Для ванды гибридной наиболее эффективными в плане органогенеза оказались среда Фаста, а среди РР – кинетин (2,5 мг/л), позволившие получить максимальные значения по ряду измеренных параметров. При культивировании растений-регенерантов анектохилуса Роксбурга лучшей оказалась среда МС, на которой достигнуты пиковые значения по всем показателям; для второй серии опытов максимальные длины побегов и количество корней отмечены при выращивании на среде МС с добавлением кинетина (2,0 мг/л) + 0,5 мг/л ИУК. Наилучшее побегообразование у клонально размножаемых растений липариса Лёзеля было достигнуто на среде Фаста, листовой органогенез – на среде МС, а ризогенез отмечен лишь при культивировании на среде Кнудсона. Среди РР наилучшим при культивировании липариса также оказался вариант среды МС с добавлением кинетина (2,0 мг/л) + 0,5 мг/л ИУК, где выявлены пиковые значения по длине и количеству побегов и листьев. Однако на ризогенез липариса изученные РР оказали негативное воздействие. Таким образом, вид питательной среды и внесенных РР оказывает существенное влияние на формирование и рост побегов, корней и листьев растений-регенерантов орхидей в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: орхидеи, *in vitro*, питательные среды, органогенез, регуляторы роста, цитокинины, ИУК.

**Введение.** Орхидеи – интересная с точки зрения биологии группа растений, многие из которых являются редкими и внесены в списки исчезающих видов. Одним из возможных путей сохранения орхидных является их искусственное размножение в культуре *in vitro* с последующим внедрением в практику цветоводства как высокодекоративных растений, либо возвращением их в

естественную среду обитания. Современная наука способна предложить способы массового размножения как диких, так и культурных орхидей [1]. Для решения проблемы сохранения редких и исчезающих видов, увеличения количества посадочного материала растений широко используются биотехнологические методы, в том числе клональное микроразмножение

БОЛЬШАКОВА Екатерина Викторовна, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, e-mail: fateeva.ek.v@yandex.ru

ЕМЕЛЬЯНОВА Ирина Сергеевна, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, e-mail: emelyanovairina08@rambler.ru

ЛУКАТКИН Александр Степанович, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, e-mail: aslukatkin@yandex.ru

(КМР) растений [2]. Использование методов культуры органов и тканей растений в совокупности с другими методами позволяет оздоровить растения, уменьшить количество потерь при укоренении регенерантов, тем самым ускоряя процесс селекции и создавая условия для сохранения ценных сортов и видов [3]. При культивировании орхидных *in vitro* возникает ряд трудностей, связанных с биологическими и экологическими особенностями этих видов. От эффективности каждого этапа зависит высокая результативность клонального размножения растений. Важнейшими из параметров являются грамотно подобранный состав питательной среды [4], соотношение и концентрация регуляторов роста (РР) в ней.

В связи с обилием видов орхидных и их эколого-физиологическими особенностями в литературе имеется множество данных по влиянию минеральной основы среды и различных регуляторов роста на размножение, органогенез, развитие почек в культуре *in vitro* ряда видов орхидей, но сведения об оптимальном составе питательной среды и концентрации РР трудно обобщить, т.к. они приводятся конкретно для каждого вида. Так, при культивировании орхидеи *Geodorum densiflorum* (Lam.) на питательных средах Мурасиге-Скуга (МС) и Кнудсона с различной концентрацией регуляторов роста (ИУК, НУК, 6-БАП, кинетин) и 0,1% древесного угля лучшим по формированию корней оказался вариант среды МС; НУК (2,0 мг/л) стимулировала рост корней, а в среде с использованием 6-БАП (5,0 мг/л) – образование побегов [5]. Лучшей для побегообразования *Vanda tessellata* L. оказалась среда МС с добавлением 1,5 мг/л НУК + 1,0 мг/л 6-БАП [6]. В исследованиях фигурировали и нестандартные составляющие питательных сред: при КМР растений-регенерантов *Anoectochilus formosanus* среда МС включала в себя, помимо 0,2 % активированного угля, 8 % гомогенат банана [7]. Для *Liparis loeselii* имеются данные, что образование протокормов в эксперименте происходило чаще при использовании среды Fast [8]. Таким образом, ввиду видовой специфичности орхидных нужно подбирать индивидуальные параметры

состава питательной среды, РР и других компонентов конкретно для каждого объекта.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали стерильные пробирочные растения ванды гибридной (*Vanda hybrida*), анектохилуса Роксбурга (*Anoectochilus roxburghii* Wall.) и липариса Лёзеля (*Liparis loeselii* L.), полученные из Лаборатории клеточной биотехнологии Центрального ботанического сада НАН Республики Беларусь.

Клонально размноженные экспланты высаживали на агаризованную (0,7 %) среду по прописям МС, Фаста и Кнудсона (рН 5,6 – 5,8) с добавлением активированного угля (0,15 %) – в первой серии опытов, РР цитокининовой природы (6-БАП и кинетин в концентрациях от 0,5 мг/л до 4,0 мг/л, тидиазурон – от  $10^{-4}$  моль/л до  $10^{-15}$  моль/л) вкуче с 0,5 мг/л ИУК на среде МС – во второй серии опытов. Растения культивировали в сосудах объемом 150 мл в условиях постоянного освещения белыми люминесцентными лампами и температуре 20-24°C. Измерения проводили еженедельно, учитывали количество и длину листьев и побегов, образование и длину корней.

Все опыты повторяли не менее трех раз, в каждом опыте было 10 биологических повторностей (растений *in vitro*). Результаты обрабатывали статистически по общепринятым биометрическим формулам с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Excel. В таблице представлены средние значения из всех опытов с их стандартными ошибками.

**Результаты и обсуждение.** Сравнение органогенеза у клонально размножаемых орхидей на разных средах показало, что для ванды гибридной и анектохилуса не существовало приоритетной среды для побегообразования, тогда как у липариса данный показатель (количество побегов) был максимальным на среде Фаста (табл.). Рост побегов *Vanda hybrida* и *Liparis loeselii* лучше выражен на среде Фаста, тогда как *Anoectochilus roxburghii* – на среде МС.

Максимальные значения по листовому органогенезу у ванды были отмечены на среде Фаста, где зафиксированы наибольшие количество листьев и длина листовой пластины. Следует от-

*Влияние различных питательных сред на морфогенез орхидей*

Измеряемый параметр	<i>Vanda hybrida</i>			<i>Anoectochilus roxburghii</i>			<i>Liparis loeselii</i>		
	МС	Ф.	Кн.	МС	Ф.	Кн.	МС	Ф.	Кн.
Кол-во побегов, шт.	1,1± 0,1	1,2± 0,1	1,0± 0	1,0± 0	1,0± 0	1,0± 0	1,3± 0,1	1,9± 0,2	1,4± 0,1
Длина побега, мм	16,8± 1	18,4± 1,1	12,6± 0,9	35,5± 3,2	27,5± 1,9	25,3± 2,3	1,8± 0,2	2,1± 0,2	1,7± 0,1
Кол-во листьев, шт.	3,3± 0,4	3,8± 0,3	3,1± 0,2	4,7± 0,4	3,4± 0,2	3,3± 0,3	2,1± 0,1	1,6± 0,1	1,9± 0,1
Длина листа, мм	10,4± 1,1	12,3± 0,9	8,0± 1,1	10,8± 0,4	9,6± 0,3	9,7± 0,4	4,7± 0,5	2,7± 0,3	3,8± 0,2
Кол-во корней, шт.	3,1± 0,2	3,4± 0,3	2,0± 0,2	2,2± 0,2	1,2± 0,1	1,5± 0,1	-	-	1,8± 0,1
Длина корня, мм	6,5± 0,5	11,6± 0,7	5,8± 0,4	7,9± 0,9	5,8± 0,6	4,5± 0,5	-	-	5,5± 0,8

*Примечание:* Обозначение питательных сред: МС – Мурасиге-Скуга, Ф. – Фаста, Кн. – Кнудсона

метить, что на других вариантах сред количество листьев было незначительно ниже. Для анектохилуса оптимальные данные по обоим показателям листового органогенеза выявлены на среде МС. Что касается липариса, то здесь среда Фаста показала самое слабое действие на листовую органогенез. По количеству листьев у липариса не получено достоверных различий на средах МС и Кнудсона, тогда как максимальная длина листовой пластины отмечена на среде МС.

Относительно ризогенеза выявлено, что для *Vanda hybrida* оптимальной оказалась среда Фаста, при ее использовании наблюдали максимальные значения по количеству и длине корней; несколько ниже (не всегда достоверно) были результаты по ризогенезу ванды при культивировании на среде МС. Наоборот, для *Anoectochilus roxburghii* лучшей по показателям ризогенеза оказалась среда МС, несколько ниже были значения при культивировании на среде Фаста, и минимальные показатели – на среде Кнудсона. Для липариса наличие ризогенеза было отмечено лишь на среде Кнудсона.

Во второй серии опытов определяли показатели органогенеза орхидей на среде МС с добавлением различных РР. Анализ морфометрических данных показал, что для *Vanda hybrida* на

среде МС с различными гормонами максимальный рост побегов отмечен в варианте с использованием 0,5 мг/л ИУК + 2,5 мг/л кинетина (рис., А), средний прирост составил 60,3 мм, тогда как максимумы для 6-БАП и тидиазурона были существенно ниже (47,8 и 26,7 мм, соответственно).

Для *Anoectochilus roxburghii* оптимум (43,8 мм/эксплант) был достигнут также при использовании среды с кинетином в концентрации 2,0 мг/л. Несколько ниже (31,6 мм/эксплант) данный показатель был в варианте среды МС с добавлением 0,5 мг/л ИУК + 3,5 мг/л 6-БАП. Минимальные значения длины побега данного вида были при культивировании на среде с тидиазуроном, хотя количество побегов на один эксплант здесь было несколько выше – в среднем 2,2 шт.

Наиболее подходящей питательной средой для побегообразования *Liparis loeselii* L. оказался вариант среды МС, обогащенной 0,5 мг/л ИУК и 2,0 мг/л кинетина – в среднем 6 мм/эксплант (рис., В).

При исследовании влияния РР на листовую органогенез (количество и размер листовой пластины) выяснили, что у ванды максимальное количество листьев и наибольшая их длина также были получены на среде, обогащенной кинети-

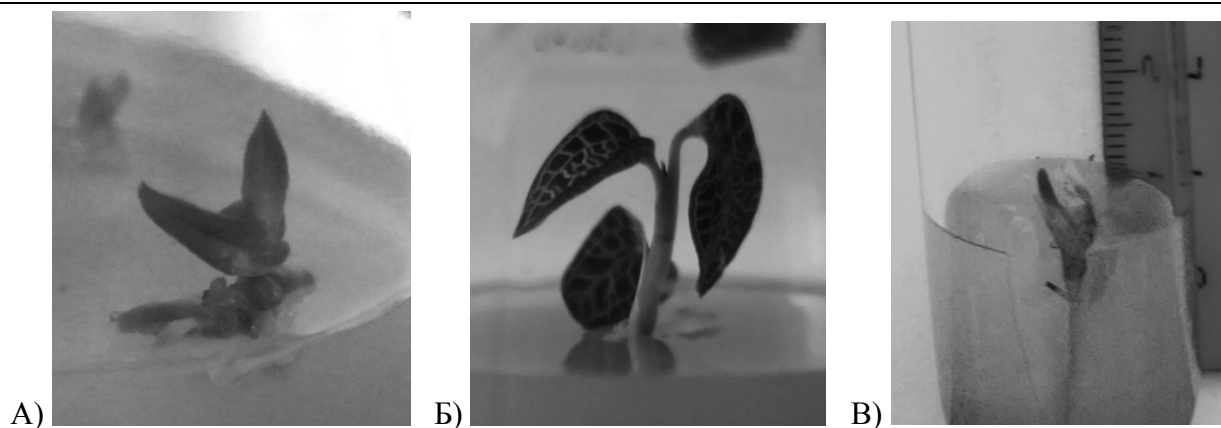


Рис. Органогенез орхидей на питательной среде: А) *Vanda hybrida* на среде МС + ИУК 0,5 мг/л + кинетин 2,5 мг/л; Б) *Anoectochilus roxburghii* Wall. на среде МС + ИУК 0,5 мг/л + 6-БАП 2,0 мг/л; В) *Liparis loeselii* L. на среде МС + ИУК 0,5 мг/л + кинетин 2,0 мг/л

ном; наибольшая длина листовой пластины составила 37,1 мм в варианте 0,5 мг/л ИУК + 2,5 мг/л кинетин. При использовании других регуляторов роста максимумы составили 17,8 мм (ИУК + 6-БАП) и 19 мм (ИУК + тидиазурон). В то же время количество листьев было практически одинаковым для всех вариантов сред и составило в среднем 2,5 – 4 шт.

Для анектохилуса наилучшей в плане листового органогенеза оказалась среда МС + ИУК + 6-БАП, так как здесь выявлено пиковое значение (7,7 шт./эксплант), которое было достигнуто при концентрации 2,0 мг/л 6-БАП (рис., Б). Средние результаты получены при совместном действии ИУК 0,5 мг/л и 2,0 мг/л кинетина (5,3 шт./эксплант). Самое слабое влияние на формирование листовых пластин оказала среда с тидиазуоном. На размер листьев лучшее действие оказали среды с внесением 6-БАП и кинетина, несколько меньшие значения были при использовании тидиазуона.

Для *Liparis loeselii* L. лучшие показатели достигнуты на среде МС с добавлением 0,5 мг/л ИУК + 2,0 мг/л кинетина, длина листовой пластины на данном варианте среды составила 2 мм, среднее количество листьев – 1,0 шт. При использовании других РР максимумы составляли в среднем 1 мм, либо наблюдалась гибель растений.

Результаты влияния РР на ризогенез *Vanda hybrida* были следующими: При использовании кинетина и 6-БАП совместно с ИУК существенных различий по количеству и длине корней не

было; максимальная длина корней на среде МС + 0,5 мг/л ИУК + 2,5 мг/л кинетин – 13 мм, при добавлении в среду 0,5 мг/л ИУК + 3,0 мг/л 6-БАП – 12,1 мм. В вариантах с внесением в среду тидиазуона значения ризогенеза были несколько ниже.

Ризогенез *Anoectochilus roxburghii* изменялся при действии РР. Пиковое значение по длине корней отмечено при совместном использовании 0,5 мг/л ИУК + 4,0 мг/л 6-БАП – в среднем 12,4 мм. В два раза меньшее значение (6,9 мм) получено на среде с ИУК + 0,5 мг/л кинетина. Близкие к пиковому значения выявлены при культивировании на среде с тидиазуоном в концентрации  $10^{-6}$  М/л, при увеличении и уменьшении концентрации длина корней снижалась. По количеству корней существенных различий между вариантами опыта для данного вида отмечено не было.

Для *Liparis loeselii* L. отмечено негативное воздействие на ризогенез при добавлении РР. Очевидно, у данного объекта проявляются индивидуальные видовые особенности, требующие дальнейшего подбора состава питательной среды и усовершенствования приемов КМР.

**Заключение.** Таким образом, питательные среды и внесение в них РР оказывает существенное влияние на формирование и рост побегов, корней и листьев растений орхидей в культуре *in vitro*. Наиболее подходящей средой для *Vanda hybrida* оказалась среда Фаста, а РР – кинетин, позволивший получить максимальные значения по ряду показателей органогенеза: на среде МС



+ 0,5 мг/л ИУК + 2,5 мг/л кинетин были зарегистрированы наибольшие длины побегов, корней и листьев. При культивировании *Anoectochilus roxburghii* Wall. приоритетной оказалась среда МС, на которой достигнуты пиковые значения по всем показателям. При выращивании на среде МС, содержащей РР, лучший органогенез отмечен на среде с 0,5 мг/л ИУК и 2,0 мг/л кинетина, где выявлены максимальные значения длины побегов и количества корней. Наилучшее побегообразование у *Liparis loeselii* L. достигнуто на среде Фаста, листовая органогенез – на среде МС, а ризогенез встречался лишь при культивировании на среде Кнудсона. Среди РР лучший эффект на органогенез липариса оказал вариант среды МС с добавлением 0,5 мг/л ИУК и 2,0 мг/л кинетина, где отмечены пиковые значения по длине и количеству побегов и листьев. Однако ризогенез липариса при действии РР не наблюдался.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность сотрудникам Лаборатории клеточной биотехнологии Центрального ботанического сада НАН Республики Беларусь за любезно предоставленные для исследования пробирочные растения орхидей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ширков А. И., Коломейцева Г.Л., Буров А.В., Каменева Е.В. Культивирование орхидей Европейской России. Н. Новгород, 2005. 64 с.
2. Решетников В. Н., Спиридович Е. В., Фоменко Т. И., Носов А. М. Растительная биотехнология – способ рационального использования биосинтетического потенциала // Инженерный журнал : наука и инновации. 2014. №5 (135). С.21 – 25.
3. Тефик А. Ш., Митрофанова И. В., Кузьмина Т. Н. Влияние регуляторов роста на регенерационную способность канны садовой (*Canna x hybrida* Hort) // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. 2014. № 3 (3). С. 124 – 127.
4. Егорова Н. А., Ставцева И. В. Микроразмножение сортов эфиромасличной розы в культуре *in vitro* // Вестник Удмуртского университета. 2016. Том 26. Вып. 2. С.45 – 52.
5. Sheelavantmath S.S., Murthy H.N., Pyati A.N., Ashok Kumar H.G., Ravishankar B.V. *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2000. V. 60, N 2. P. 151 – 154.
6. Rahman M.S., Hasan M.F., Hossain M.S., Mandal A., Rahman M. Plant regeneration of orchid (*Vanda tessellata* L.) through meristem culture // Int. J. Biores. 2008. №4 (1). P. 8 – 16.
7. Shiau Y.-J., Sagare A.P., Chen U.-C., Yang S.-R., Tsau H.-S. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *in vitro* culture of seeds // Bot. Bull. Acad. Sin. 2002. V. 43. P. 123 – 130.
8. Van Waes J.M., Deberg P.C. *In vitro* germination of some Western European orchids / J.M. Van Waes, // *Phyiol. Plant.* 1986. Vol. 67. P. 253 – 261

#### References

1. Shirkov A.I., Kolomeitseva G.L., Burov A.V., Kameneva Ye.V. Cultivation of orchids of European Russia. N. Novgorod, 2005. 64 p.
2. Reshetnikov V.N., Spirodovich E.V., Fomenko T.I., Nosov A.M. Plant biotechnology – a way of rational use of biosynthetic potential // Engineering Journal: Science and Innovations. 2014. №5 (135). P.21 – 25.
3. Tefik A.Sh., Mitrofanova I.V., Kuzmina T.N. Influence of growth regulators on the regenerative ability of garden canna (*Canna x hybrida* Hort) // Bulletin of the Nizhny Novgorod State University. 2014. No. 3 (3). P. 124–127.
4. Egorova N.A., Stavtseva I.V. Micropropagation of varieties of ether oil-bearing roses in culture *in vitro* // Bulletin of the Udmurt University. 2016. Vol. 26. Issue. 2. P.45 – 52.
5. Sheelavantmath S.S., Murthy H.N., Pyati A.N., Ashok Kumar H.G., Ravishankar B.V. *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2000. V. 60, N 2. P. 151 – 154.
6. Rahman M.S., Hasan M.F., Hossain M.S., Mandal A., Rahman M. Plant regeneration of orchid (*Vanda tessellata* L.) through meristem culture // Int. J. Biores. 2008. №4 (1). P. 8 – 16.
7. Shiau Y.-J., Sagare A.P., Chen U.-C., Yang S.-R., Tsau H.-S. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *in vitro* culture of seeds // Bot. Bull. Acad. Sin. 2002. V. 43. P. 123 – 130.
8. Van Waes J.M., Deberg P.C. *In vitro* germination of some Western European orchids / J.M. Van Waes, // *Phyiol. Plant.* 1986. Vol. 67. P. 253 – 261.

  
**THE EFFECT OF NUTRIENT MEDIA AND GROWTH REGULATORS  
ON THE ORGANOGENESIS OF ORCHIDS *IN VITRO***

© E.V. Bolshakova, I.S. Emelyanova, A.S. Lukatkin

Mordovia State University,  
68, ulitsa Bolshevistskaja, 430005, Saransk, Russian Federation

Orchids cultivation *in vitro* have a number of difficulties associated with the biological and ecological patterns of these species. Article presents the results of two experiments series on orchids cultivation (*Vanda hybrida*, *Anoectochilus roxburghii* Wall. and *Liparis loesélii* L.) in various nutrient media – Fast, Murashige and Skoog (MS), Knudson (first series); another series analyzed plant growth regulators (PGRs) effects in the cultivation of orchids on the MS medium. As PGRs, were used some cytokinins (6-benzylaminopurine (6-BAP), thidiazuron, kinetin) at different concentrations, in combination with 0.5 mg/l of indolyacetic acid (IAA). Regenerated plants were cultivated under constant lighting with white fluorescent lamps at a temperature of 20–24 °C. Measurements were carried out weekly, taking into account the number and length of leaves and shoots, the formation and length of the roots. For *Vanda hybrida*, the most effective in terms of organogenesis were Fast medium, and as PGR kinetin (2.5 mg/l), which allowed to obtain maximum values for a number of measured parameters. MS medium was the best in the cultivation of *Anoectochilus roxburghii* plants, which reached peak values on all indicators; for the second series of experiments the maximum length of shoots and number of roots observed when regenerated plants grown on MS medium supplemented with kinetin (2.0 mg/l) + 0.5 mg/l IAA. The best shoot formation in clonal propagated *Liparis loesélii* plants was reached on Fast medium, leaf organogenesis on MS medium, and rhizogenesis was observed on Knudson medium only. Among the PGRs, the best data for the length and number of shoots and leaves of *Liparis* were obtained on MS supplemented with kinetin (2.0 mg/l) + 0.5 mg/l IAA. However, the studied PGRs had a negative effect on *Liparis* rhizogenesis. Thus, the type of nutrient medium and supplemented PGRs has a significant effect on formation and growth of shoots, roots and leaves of regenerated orchids plants in *in vitro* conditions.

Key words: orchids, *in vitro*, nutrient media, organogenesis, growth regulators, cytokinins, IAA.

УДК: 577.215.3

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-54-58

## АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ CDKN1A И RIPK1 ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ У КРЫС

© Я.В. Валова, Т.Г. Кутлина, Д.О. Каримов, Г.Ф. Мухаммадиева, Н.Ю. Хуснутдинова, Д.А. Смолянкин, Э.Ф. Репина, А.Б. Бакиров

В исследовании проведен анализ изменения экспрессии генов регуляторов клеточного цикла и клеточной гибели при ТХМ-индуцированном токсическом гепатите спустя 24 и 72 часа после затравки ТХМ. Моделирование токсического гепатита проводили на белых беспородных крысах мужского пола, разделенных на 7 групп в зависимости от дозы введенного гепатотоксина. Установлено время- и дозозависимое изменение экспрессии гена RIPK1, а также дозозависимое изменение экспрессии генов Cdkn1a и Gclc на 3 сутки после введения ТХМ, что может свидетельствовать об участии исследуемых генов на различных стадиях метаболизма ТХМ в клетках печени.

Ключевые слова: экспрессия генов, СС14-индуцированный токсический гепатит, дозозависимое изменение экспрессии, апоптоз.

**Введение.** Токсические поражения печени (ТПП), на сегодняшний день, представляют собой одну из наиболее серьезных медико-социальных проблем в мире. По данным мировой статистики ТПП характеризуется широкой распространенностью, высоким уровнем летальности и существенными экономическими затратами, связанными с диагностикой и лечением этого заболевания [4].

ТПП- это большая группа заболеваний, связанных с гепатотоксическим действием веществ

различного происхождения, вызывающих в той или иной степени выраженности морфологические изменения ткани печени и связанные с ними обменные нарушения. В зависимости от вида гепатотоксина различают алкогольный, лекарственный и профессиональный и другие ТПП [1].

В настоящее время доказано, что токсическое повреждение клеток печени первоначально связано с превращением оксидантной системой эндоплазматического ретикулаума гепатоцитов

ВАЛОВА Яна Валерьевна, Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека, Башкирский государственный университет, e-mail: q.juk@yandex.ru

КУТЛИНА Татьяна Георгиевна, Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека, e-mail: tanya.kutlina.92@mail.ru

КАРИМОВ Денис Олегович – к.м.н., Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека, e-mail: karimovdo@gmail.com

МУХАММАДИЕВА Гузель Фанисовна – к.б.н., Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека, e-mail: ufniimt@mail.ru

ХУСНУТДИНОВА Надежда Юрьевна, Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека, e-mail: hnyu@yandex.ru

СМОЛЯНКИН Денис Анатольевич, Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека, e-mail: Smolyankin.denis@yandex.ru

РЕПИНА Эльвира Фаридовна – к.м.н., Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека, e-mail: e.f.repina@bk.ru

БАКИРОВ Ахат Бариевич – д.м.н., Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека, e-mail: fbun@uniimtech.ru

метаболизируемого вещества в свободные радикалы [2]. Образовавшиеся свободные радикалы и реактивные метаболиты способны вызывать перекисное окисление важнейших компонентов клетки, тем самым вызывая функциональные и структурные изменения в гепатоцитах или приводя к их гибели [4].

Токсические поражения печени часто сопровождается серьезным повреждением ДНК гепатоцитов, что приводит к активации путей восстановления ДНК либо, если повреждения нерепарируемые, к запуску апоптоза и некроптоза.

Ген Cdkn1a кодирует ингибитор циклинзависимой киназы. Этот белок также известный как p21 (WAF1 / Cip1) является одним из этих факторов, способствующих остановке клеточного цикла в переходах G1 / S и G2 / M в ответ на различные внутренние сигналы, а также в ответ на повреждения ДНК [7]. Другой важной функцией, связанной с p21 является модуляция или ингибирование апоптоза. p21 является одним из основных эффекторов p53, транскрипционного фактора, способного запускать апоптоз в случае значительных повреждений ДНК. Кроме того, регуляция апоптоза может происходить с участием CDK. Проводимые экспериментальные исследования показали, что p21 может защитить клетки против индуцированного инфракрасного апоптоза путем ингибирования CDK, которые необходимы для активации каспазного каскада [6].

Клеточная гибель гепатоцитов является характерной чертой патогенеза заболевания печени. Апоптоз и некроптоз представляют собой два различных пути гибели клетки, которые контролируются рецептор- взаимодействующей протоинкиназой 1 (RIPK1), кодирующейся геном RIPK. Известно, что дефицит RIPK1 вызывает перинатальную летальность, которая полностью предотвращается комбинированным отсутствием каспазы-8 и RIPK3 [8].

В работах Filliol A., посвященных оценке роли RIPK 1 при различных повреждениях печени, показано, что RIPK 1 может функционировать как ингибитор каспазы-8 –зависимого TNFR-индуцированного апоптоза, тем самым защищая печень от чрезмерной гибели клеток

[8]. Однако защитная роль, которую RIPK1 оказывает для предотвращения смертности гепатоцитов, индуцированной TNF $\alpha$ , противоположна той, которую она играет в некроптотическом пути, где он опосредует регулируемый некроз вместе с RIPK3 [3,10].

Основываясь на своем центральном положении в Регулировании смертности клеток, RIPK1 в настоящее время является одним из наиболее интенсивно изучаемых, но и одним из наиболее спорных вопросов в исследованиях печени.

Исследование функционирования (активности) генов системы антиоксидантной защиты и генов, принимающих участие в запуске программируемой клеточной гибели при индуцированном окислительном стрессе способствует выяснению молекулярных основ патогенеза заболеваний, связанных с ГПП, а также разработке новых эффективных средств лечения.

**Цель.** Целью данного исследования являлось изучение экспрессии генов, участвующих в регуляции клеточного цикла при токсическом повреждении печени у крыс.

#### **Материал и методы исследования.**

Моделирование острого токсического гепатита проводили на белых беспородных крысах мужского пола массой 170–190 г путем подкожного введения 50%-ного масляного раствора CCl<sub>4</sub> (четырёххлористый углерод, тетрахлорметан) в дозе 0,125–4 г/кг массы тела, однократно. Печень декапитированных крыс подвергали исследованию спустя 24 и 72 часа после затравки. Животным контрольной группы подкожно вводили масло. Условия содержания и кормления были одинаковы для всех групп животных. При уходе за животными, питании и проведении экспериментов руководствовались базисными нормативными документами: Рекомендациями комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Минздраве России, рекомендациями ВОЗ, рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей.

Кусочки печени сразу после декапитации и вскрытия замораживали жидким азотом и заливали

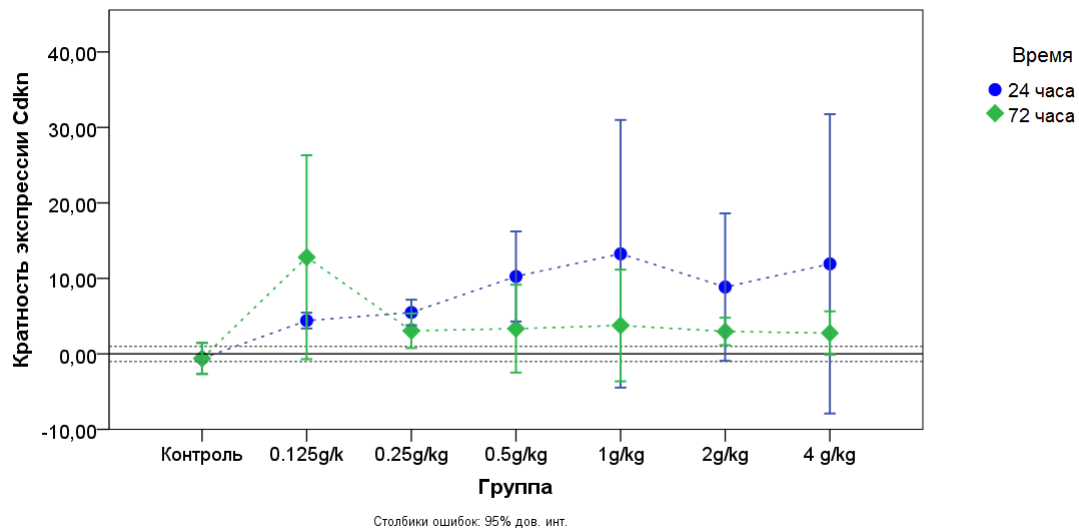


Рис. 1. Кратность экспрессии гена Cdkn1a при 24- и 72-часовых воздействиях с увеличением дозы ТХМ от 0 до 4 г/кг

ExtractRNA (ЗАО Евроген). Для определения функционального состояния печени использовались следующие методы: экстракция тотальной РНК тризолом, обратная транскрипция и ПЦР-амплификация в режиме реального времени на приборе RotorGene (QIAGEN). Анализ экспрессии генов в печени крыс в норме и при ХТГ проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидных специфичных праймеров фирмы «Евроген», содержащего интеркалирующий краситель SYBRGreen. Нормирование уровня экспрессии проводили по гену GAPDH. Количественные данные обрабатывали по критерию (t) Стьюдента и с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Нами было проанализировано изменение экспрессии генов, регулирующих клеточный цикл, а также гена, регулирующего синтез глутатиона, в ответ на ТХМ-индуцированный окислительный стресс (Рис.1). Через 24 часа после введения ТХМ в дозе 0,125 г/кг отмечалось повышение экспрессии гена Cdkn1a в 4,4 по сравнению с контрольной группой. При дальнейшем увеличении дозы экспрессия также продолжала расти. Максимально высокая транскрипционная активность, превышающая исходную в 13,25 раз была зарегистрирована при дозе 1 г/кг ( $F=3,521, p=0,001$ ).

При повышении дозы до 2 г/кг и 4 г/кг была отмечена тенденция к небольшому снижению уровня экспрессии, однако он по-прежнему превышал исходные значения более чем в 8 раз ( $F=14,147, p=0,055$ ).

Иная картина наблюдается спустя 72 часа после затравки тетрахлорметаном (Рис.2). После введения минимальной дозы ТХМ экспрессия гена Cdkn1a возросла практически в 13 раз по сравнению с контрольной группой ( $F=2,71, p=0,029$ ). При введении более высоких доз уровень экспрессии в разных группах был практически одинаковым и превышал исходный уровень в 3-4 раза.

Экспрессия гена Ripk через сутки после введения ТХМ характеризуется незначительным повышением при увеличении дозы от 0,125 г/кг до 0,5 г/кг. Однако введение СС14 в дозе 2 г/кг способствовало существенному снижению экспрессии почти в 5 раз ( $F=6,001, p=0,001$ ).

Интересно, что результаты, полученные при анализе экспрессии этого же гена спустя 3 суток после введения ТХМ, кардинально отличаются от результатов, полученных в первом эксперименте. При измерении транскрипционной активности гена Ripk через 72 часа после введения СС14 в дозе 0,125 г/кг и 0,25 г/кг было выявлено снижение уровня экспрессии примерно в 3 раза ( $F=7,34, p=0,001$ ). При более высоких дозах активность гена незначительно усиливалась по сравнению с контрольной группой,

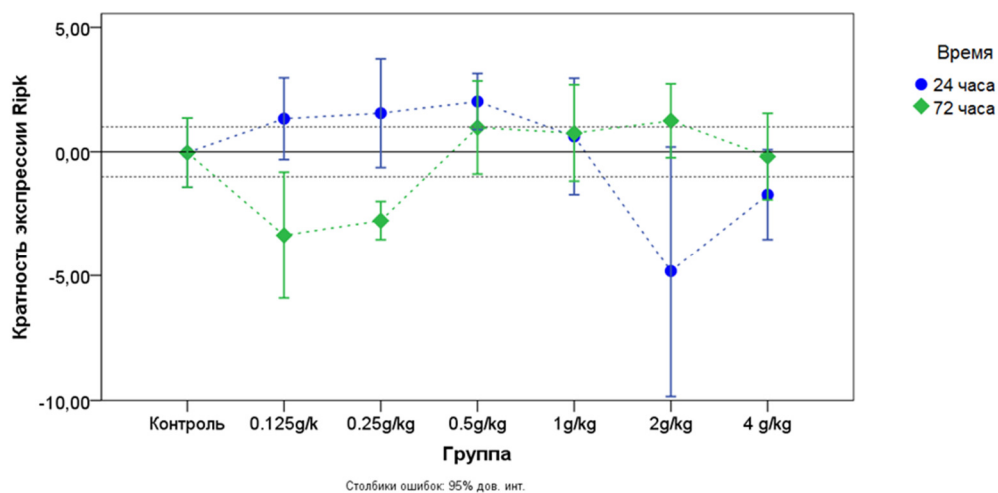


Рис. 2. Кратность экспрессии гена Ripk1 при 24- и 72-часовых воздействиях с увеличением дозы ТХМ от 0 до 4 г/кг

а при максимальной дозе практически вернулась к исходному уровню.

При анализе изменения экспрессии гена Cdkn1 через сутки после введения ТХМ, нами была отмечена тенденция к закономерному повышению содержания транскриптов в зависимости от дозы. Такие изменения экспрессии могут быть вызваны повреждениями клеточных структур и ДНК реактивными метаболитами ТХМ. Как уже было упомянуто, ген Cdkn1 способен активироваться в ответ на повреждения ДНК, когда возникает необходимость в остановке клеточного цикла и запуске репаративных процессов [2]. При анализе изменения уровня мРНК гена p21 у мышей после затравки парацетамолом FanX, с соавторами обнаружили значительное повышение экспрессии гена p21 и понижение экспрессии генов циклинов в группе мышей с индуцированным острым гепатитом относительно контроля, что свидетельствует об остановке клеточного цикла [9]. Однако спустя 3 суток мы наблюдали резкое увеличение кратности экспрессии в группе с минимальной дозой и небольшие повышения в остальных, что может указывать на то что, при небольшой дозе спустя 72 часа еще возможна репарации поврежденных компонентов клетки, а при более высоких дозах на данной стадии повреждения оказываются нерепарируемыми, и в клетке запускаются процессы апоптоза.

Наиболее интересные результаты были получены при анализе экспрессии гена Ripk1. В первой части эксперимента, длившемся 24 часа,

при небольших дозах мы наблюдали незначительное усиление экспрессии, а при повышении дозы до 2 и 4 г/кг следовал резкий спад активности гена. Однако во второй части эксперимента, длившемся 72 часа, при тех же дозах эффект был обратный. Основываясь на полученных результатах, мы предполагаем, что основным путем клеточной гибели при данном токсическом поражении печени является некроптоз, главным активатором которого является белок Ripk1, а апоптоз, о чем может свидетельствовать то, что даже на довольно поздней стадии отравления гепатотоксином, экспрессия Ripk1 в подопытных группах лишь незначительно превышала таковую в контрольной группе. При этом спад активности гена Ripk1 можно объяснить тем что, белки участвующие в запуске апоптоза способны ингибировать некроптоз. Эти данные подтверждаются тем, что запуск некроптоза происходит только в случае инактивации каспазы-8 [5,10].

**Заключение.** В представленной работе были выявлены достоверные дозозависимые изменения кратности экспрессии у всех трех генов через 72 часа, а у гена RIPK1 также через 24 часа после введения ТХМ. Анализ экспрессии генов, регулирующих клеточный цикл и гибель клетки и генов АОС выявил наличие статистически значимых связей между их транскрипционной активностью и дозой введенного гепатотоксина, а также временем его действия.

Однако обнаруженные нами различия в уровне транскрипционной активности генов

требуют дальнейшего исследования, так как вероятно, существуют различия в уровне экспрессии генов на более ранних и более поздних сроках действия гепатотоксина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антоненко О. М. Токсические поражения печени: пути фармакологической коррекции // Медицинский совет. – 2013. – №. 6. – С. 45-51.
2. Karimian A., Ahmadi Y., Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage // DNA repair. – 2016. – Т. 42. – С. 63-71.
3. P. Hydbring, M. Malumbres, P. Sicinski, Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (April) (2016), <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2016.27>
4. Голиков С. Н., Саноцкий И. В., Тиунов Л. А. Общие механизмы токсического действия // АМН СССР. – Л.: Медицина, 1986. – 280 с., ил.
5. Кравченко Л. В., Трусов Н. В., Ускова М. А., Аксенов И. В., Авреньева Л. И., Гусева Г. В., Васильева М. А., Селифанов А. В., Тутельян В. А. Характеристика острого токсического действия четырёххлористого углерода как модели окислительного стресса. // Токсикологический вестник. – 2009. – № 1. – С. 12-18.
6. Ehedeo H., Trautwein C. p21 in chronic and acute liver injury // Oncoscience. – 2016. – Т. 3. – №. 2. – С. 56.
7. Buitrago-Molina L. E. et al. The degree of liver injury determines the role of p21 in liver regeneration and hepatocarcinogenesis in mice // Hepatology. – 2013. – Т. 58. – №. 3. – С. 1143-1152.
8. Filliol A. et al. RIPK1 protects from TNF- $\alpha$ -mediated liver damage during hepatitis // Cell death & disease. – 2016. – Т. 7. – №. 11. – С. e2462
9. Pasparakis M, Vandenberghe P. Necroptosis and its role in inflammation. Nature 2015;517:311–320.
10. Altomare E., Vendemiale G., Albano O. Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and non alcoholic liver diseases // Life sciences. – 1988. – Т. 43. – №. 12. – С. 991-998.



#### ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF CDKN1A AND RIPK1 GENES IN INDUCED OXIDATIVE STRESS IN RATS

© Ya.V. Valova<sup>1,2</sup>, T.G. Kutlina<sup>1</sup>, D.O. Karimov<sup>1</sup>, G.F. Mukhammadiyeva<sup>1</sup>, N.Yu. Khusnutdinova<sup>1</sup>, D.A. Smolyankin<sup>1</sup>, E.F. Repina<sup>1</sup>, A.B. Bakirov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology,  
94, ulitsa Stepana Kuvykina, 450106, Ufa, Russian Federation

<sup>2</sup> Bashkir State University,  
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

The study analyzes the changes in expression of the gene of the cell cycle regulators and cell death in CCl<sub>4</sub>-induced toxic hepatitis 24 and 72 hours after CCl<sub>4</sub> priming. Modeling of toxic hepatitis was carried out on white mongrel male rats divided into 7 groups depending on the dose of hepatotoxin administered. The time- and dose-dependent changes in the expression of the RIPK1 gene were established, as well as the dose-dependent change in the expression of Cdkn1a and Gclc genes on day 3 after CCl<sub>4</sub> administration, which may indicate the involvement of the genes under investigation at various stages of CCl<sub>4</sub> metabolism in the liver cells.

Key words: gene expression, CCl<sub>4</sub>-induced toxic hepatitis, dose-dependent change in expression, apoptosis.

УДК 576.315: 577.112:633.11

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-59-65

**АНАЛИЗ АРГ-Х ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В ТРИПСИНОПОДОБНЫХ КОМПЛЕКСАХ СУПРАСТРУКТУР КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ БУТИРАТА НАТРИЯ ПРИ ПРОРАСТАНИИ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ**

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

Белки являются жизненно важным компонентом ядер эукариотических клеток, однако, в то время как геном растения хорошо изучен на уровне ДНК, информации о ядерных белках растений крайне недостаточно. Ядерные белки мало представлены в исследованиях протеома из-за своего низкого содержания, часто информация, полученная с помощью высоконадежных методов, не показывает функционального назначения ядерных белков. Как известно, бутират натрия, как ингибитор деацетилирования белков, приводит к ацетилированию гистонов и активирует транскрипционную функцию хроматина. Предполагается, что восприимчивость гистонов к протеолизу в хроматине может регулироваться присоединением или удалением ацетильных или метильных групп на лизиновые остатки вблизи мест расщепления. Целью работы был поиск локализации активности Арг-Х протеолиза в негистоновых и гистоновых блоках как возможного механизма, влияющего на реорганизацию хроматина, при прорастании зародышей пшеницы в нормальных условиях и условиях ингибирования деацетилирования белков клеточных ядер. В ходе проведенной работы показано, что выделенные с помощью аффинной хроматографии из гистоновых (Н1; Н2А+Н2В; Н3+Н4) и негистоновых блоков 24-часовых зародышей трипсиноподобные протеиназы обладают Арг-Х протеолитической активностью, которая проявляется уникально для каждого отдельно взятого сорта. В экспериментах с использованием бутирата натрия наблюдалась дополнительная активность Арг-протеолиза практически во всех супраструктурах клеточных ядер на уровне гистоновых белков по сравнению с контролем. Возможно, что появление дополнительной активности Арг-Х протеолиза в негистоновых и гистоновых фракциях, связано с увеличением ацетилирования гистонов в присутствии бутирата натрия. Мы предполагаем, что обнаруженные изменения в локализации Арг-Х протеолиза могут быть связаны со структурными перестройками хроматина в процессе прорастания зародышей пшеницы.

Ключевые слова: трипсиноподобные комплексы, бутират натрия, гистоны, клеточное ядро, пшеница *Triticum aestivum* L.

Известно, что процессы сборки и разборки хроматина при участии ядерного протеома являются важнейшим условием регуляторной сети, контролирующей движение клеток по клеточному циклу. Поскольку гистоны являются неотъемлемой частью хроматина и их синтез координирован с синтезом ДНК, любые изменения в их последовательности или структуре могут

привести к воздействию на клеточный метаболизм [1]. Гидролиз гистонов в результате протеолитического процессинга является необратимой посттрансляционной модификацией, благодаря обилию лизиновых и аргининовых остатков, составляющих более 1/5 аминокислот основных гистонов. Известно, что электростатические взаимодействия фосфодиэфирной цепи

ВАФИНА Гюльнар Хамидовна – к.б.н., Уфимский институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: vafinagh@mail.ru

ИВАНОВ Руслан Сергеевич – к.б.н., Уфимский институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: ivanovirs@mail.ru

ИВАНОВА Эвилина Алексеевна – д.б.н., Уфимский институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: evilina@anrb.ru



ДНК с остатками аргинина, присутствующими в гистоновых складчатых доменах октамера, являются наиболее важными для организации ДНК в нуклеосоме, достаточно всего 14 остатков аргинина для поддержания закручивания ДНК в нуклеосоме [2].

Было доказано, что нуклеосомный контроль играет важную роль в регуляции экспрессии [3]. Гистоновые протеиназы, отщепляя гистоновые хвосты, создают новую нуклеосому [4], кроме того гистоновый субстрат обладает способностью самостоятельно регулировать и модулировать активность протеаз, действующих на него [4].

Как известно регулирование транскрипции осуществляется различными молекулярными факторами, включая систему ацетилирования и деацетилирования гистонов. В свою очередь, ингибиторы деацетилазы могут модулировать широкий спектр белков, активность которых зависит от ацетилирования (например, факторов транскрипции, шаперонов, медиаторов сигнальной трансдукции, структурных белков). Кроме того, изменение статуса ацетилирования влияет на стабильность белков, белок-белковые взаимодействия и взаимодействия белок-ДНК.

Целью работы был поиск локализации активности *Арг-Х* протеолиза в негистоновых и гистоновых блоках как возможного механизма, влияющего на реорганизацию хроматина, при прорастании зародышей пшеницы в нормальных условиях и условиях ингибирования деацетилирования белков клеточных ядер с помощью бутирата натрия.

**Материалы и методы исследования.** Для исследования были выбраны элитные семена пшеницы (*Triticum aestivum L.*) сортов Артемовка (яровая), Мироновская 808 (озимая) и Мироновская яровая (коллекция семян Всероссийского института растениеводства им. Н.И.Вавилова). Для эксперимента использовались только морфологически близкие проростки. Для замачивания семян и индукции прорастания в качестве контроля использовали дистиллированную воду, а в качестве эксперимента - 0,004 мМ бутират натрия. Проростки отделяли от эндосперма через 24 часа после замачивания семян. Ядра клеток были выделены из целых пророст-

ков, по методу [5]. Супрамолекулярные структуры были выделены из очищенных ядер клеток путем увеличения ионной силы раствора. Фракцию нуклеоплазмы (Нп) выделяли с помощью 0,14 М NaCl. Фракцию хроматина непрочно связанного (Хр I), выделяли с помощью 0,35 М NaCl. Фракцию хроматина, прочно связанного (Хр II), выделяли с помощью 2 М NaCl. Ядерный матрикс (ЯМ) получали в результате экстракции 6 М гуанидин гидрохлоридом (GuHCl) и 0,004% β-меркаптоэтанолом [6]. Количество белка в ядрах и ядерных супрамолекулярных структурах определяли с использованием метода Брэдфорда с модификациями [6]. Фракции белков гистонов и негистонов получали хроматографическим фракционированием супрамолекулярных структур (нуклеоплазма, хроматин I, хроматин II, ядерный матрикс) на колонках Amberlite IRC-50 (Serva, Heidelberg). Белки элюировали в ступенчатом градиенте (6,0, 8,9, 10,6, 13 и 40%) GuHCl. Трипсин-подобные комплексы из негистоновых и гистоновых фракций выделяли аффинной хроматографией через колонку с Sepharose 4B, которая была иммобилизована ингибитором трипсина из сои («Reanal», Венгрия) [7]. Активность протеолиза *Арг-Х* оценивали расщеплением связей *Арг-Х* в обогащенном аргинином белком протамином salmine A1 («Merck», Германия), молекуле, которая состоит из 33 аминокислот (22 молекулы Арг, 4 Сер, 3 Про, 2 Глу и 1 Вал) во всех фракциях ядер [6]. Активность *Арг-Х* протеолиза была рассчитана в наномолях аргинина в секунду на микрограмм белка (нмоль аргинина / (с · мкг белка). Все эксперименты проводили в трех повторностях по три биологических повтора в каждом. На графиках представлены средние значения со стандартными ошибками (SE). Для расчетов использовались стандартные пакеты программы Excel. Исследования были выполнены на оборудовании ЦКП «Агидель».

**Результаты и обсуждение.** Интерес к протеолизу гистонов возник еще в 70-80х годах прошлого века, когда исследователи столкнулись с тем, что протеолитическую активность просто невозможно отделить от хроматина [8] и что трипсин может отщеплять N-концы коровых гистонов. Кроме того удаленные с помощью

трипсиноподобного протеолиза N-концы гистонов H3 и H4 имели высокую степень консервативности и были подвержены постсинтетическому ацетилированию [9]. Стоит отметить, что удаление N-концевых хвостов гистонов влияет на структуру и динамику хроматина, что может способствовать или препятствовать активности транскрипции, хотя физиологическое значение протеолитического процессинга гистоновых хвостов до конца еще не ясно. Было высказано предположение, что восприимчивость гистонов к протеолизу в хроматине может регулироваться добавлением или удалением ацетильных или метильных групп на лизиновых остатках вблизи мест расщепления. Предполагается, что посттрансляционные модификации могут регулировать скорость протеолиза [10]. На сегодняшний день наиболее известным эффектом бутирата натрия является его способность индуцировать ацетилирование гистонов и активировать транскрипционную функцию хроматина. Кроме того бутират натрия эффективно ингибирует клеточную пролиферацию при низких концентрациях [11], хотя точный механизм его действия до сих пор неизвестен.

В ходе проведенной работы показано, что выделенные с помощью аффинной хроматографии из гистоновых (H1; H2A+H2B; H3+H4) и негистоновых (НГБ) блоков 24-часовых зародышей трипсиноподобные протеиназы обладают Арг-Х протеолитической активностью, которая проявляется уникально для каждого отдельно взятого сорта. Так же было показано, что в экспериментах с использованием ингибитора деацетилирования белков – бутирата натрия наблюдается активность Арг-протеолиза практически во всех супраструктурах клеточных ядер на уровне гистоновых белков по сравнению с контролем.

На рисунках демонстрируются изменения в распределении протеолитической активности Арг-Х в нуклеоплазме, хроматине непрочно и прочно связанном и в ядерном матриксе в контрольном варианте эксперимента (рис. 1) и в условиях ингибирования деацетилирования белков клеточных ядер (рис. 2).

Анализ рисунка 1 показывает, что протеолитическая активность Арг-Х трипсиноподобных комплексов в основном определялась во

фракциях хроматина Хр I и Хр II в нормальных условиях у всех трех взятых в эксперимент сортов пшеницы. У Артемовки активность Арг-Х протеолиза обнаруживалась на уровне Хр II (линкерного гистона H1) и Хр I (коровых гистонов H3 + H4). У озимой пшеницы Мироновская 808 протеолитическая активность Арг-Х трипсиноподобных комплексов проявлялась главным образом на уровне негистоновых белков и коровых гистонов H2A + H2B Хр II (рис. 1). Что касается сорта пшеницы Мироновская яровая, то при сохранении Арг-Х протеолитической активности в хроматиновых структурах, она ярко проявлялась на уровне ядерного матрикса во фракциях коровых гистонов (H2A+H2B и H3+H4). Характерно, что протеолитическая Арг-Х активность в трипсиноподобных комплексах линкерного гистона (H1) определялась у всех трех сортов (рис. 1). Интересно, что наблюдаемая активность проявлялась в основном на уровне структур хроматина, которые могут быть связаны с процессами его реорганизации [4]. Возможно, что протеолитическая Арг-Х активность участвует в сложной регуляции морфогенетических механизмов, возникающих во время прорастания семян озимых и яровых сортов. Яровая и озимая пшеница имеют сходные черты в формировании модульной структуры в процессе индивидуального развития. Известно, что материнское растение закладывает 3 модуля в эмбрионе, у 24-часовых зародышей на основном побеге уже наблюдается 4 модуля, именно в этот период начинается митотическая активность в клетках. Впоследствии модульная структура растений становится более сложной, и начинают проявляться различия между озимыми и яровыми формами.

В условиях ингибирования деацетилирования белков клеточных ядер (рис.2) было показано, что появляется дополнительная Арг-Х протеолитическая активность у Артемовки на уровне ядерного матрикса в коровых гистонах, при этом сохраняется активность Арг-Х протеолиза на уровне линкерного гистона (H1) Хр II и основных гистонов H3 + H4 Хр I и Хр II (рис. 1-2). У озимого сорта в условиях опыта также наблюдается дополнительная активность Арг-Х протеолиза. Выраженная активность в Хр II

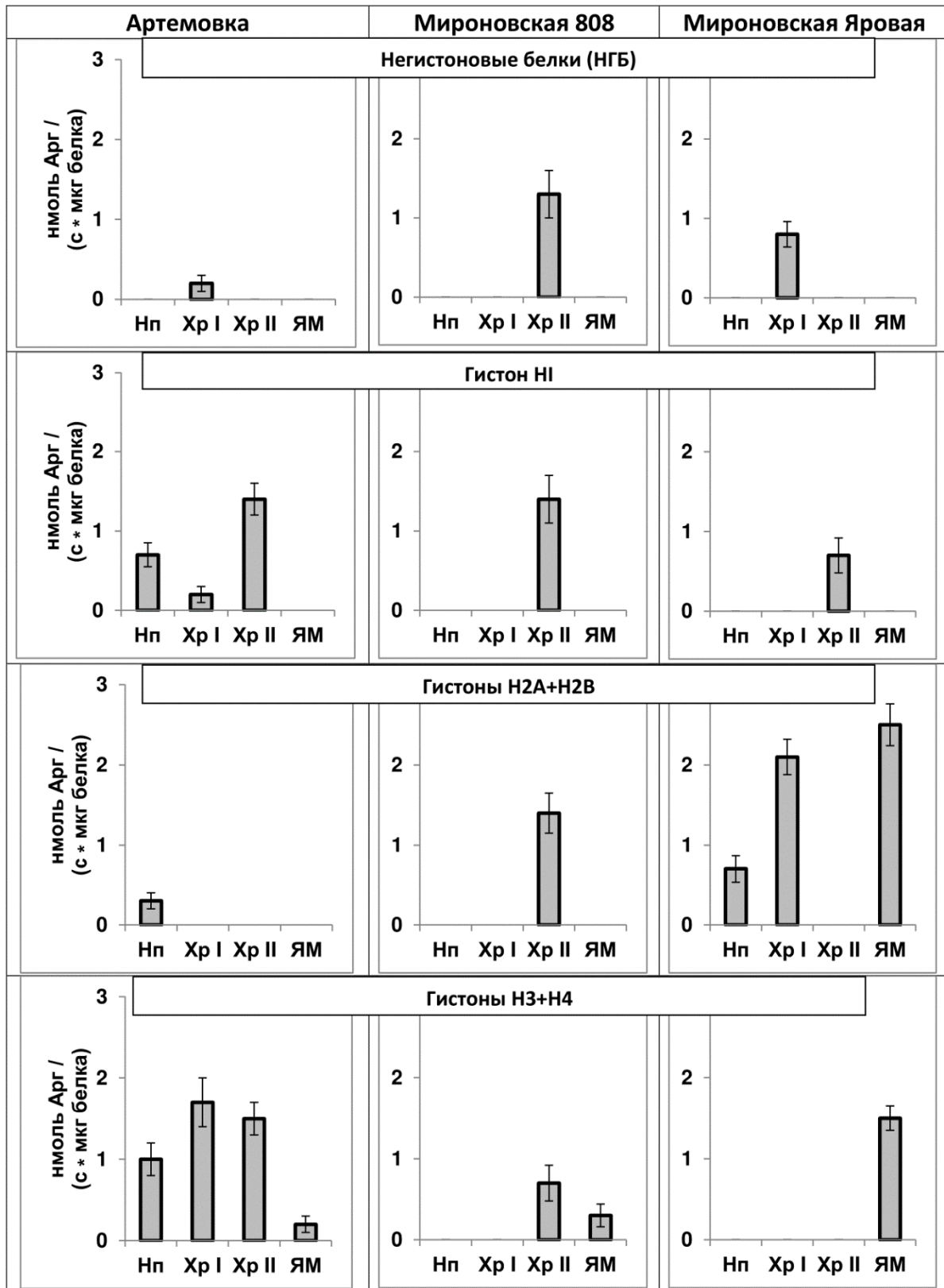


Рис. 1. Активность *Arg*-X протеолиза в трипсиноподобных комплексах негистоновых (НГБ), линкерных (H1) и коровых гистоновых (H2A+H2B; H3+H4) белках супраструктур клеточных ядер зародышей пшеницы (контроль).

Обозначения: Нуклеоплазма – Нп; хроматин непрочносвязанный с ЯМ (Хр-I); хроматин прочносвязанный с ЯМ (Хр-II); ядерный матрикс (ЯМ)

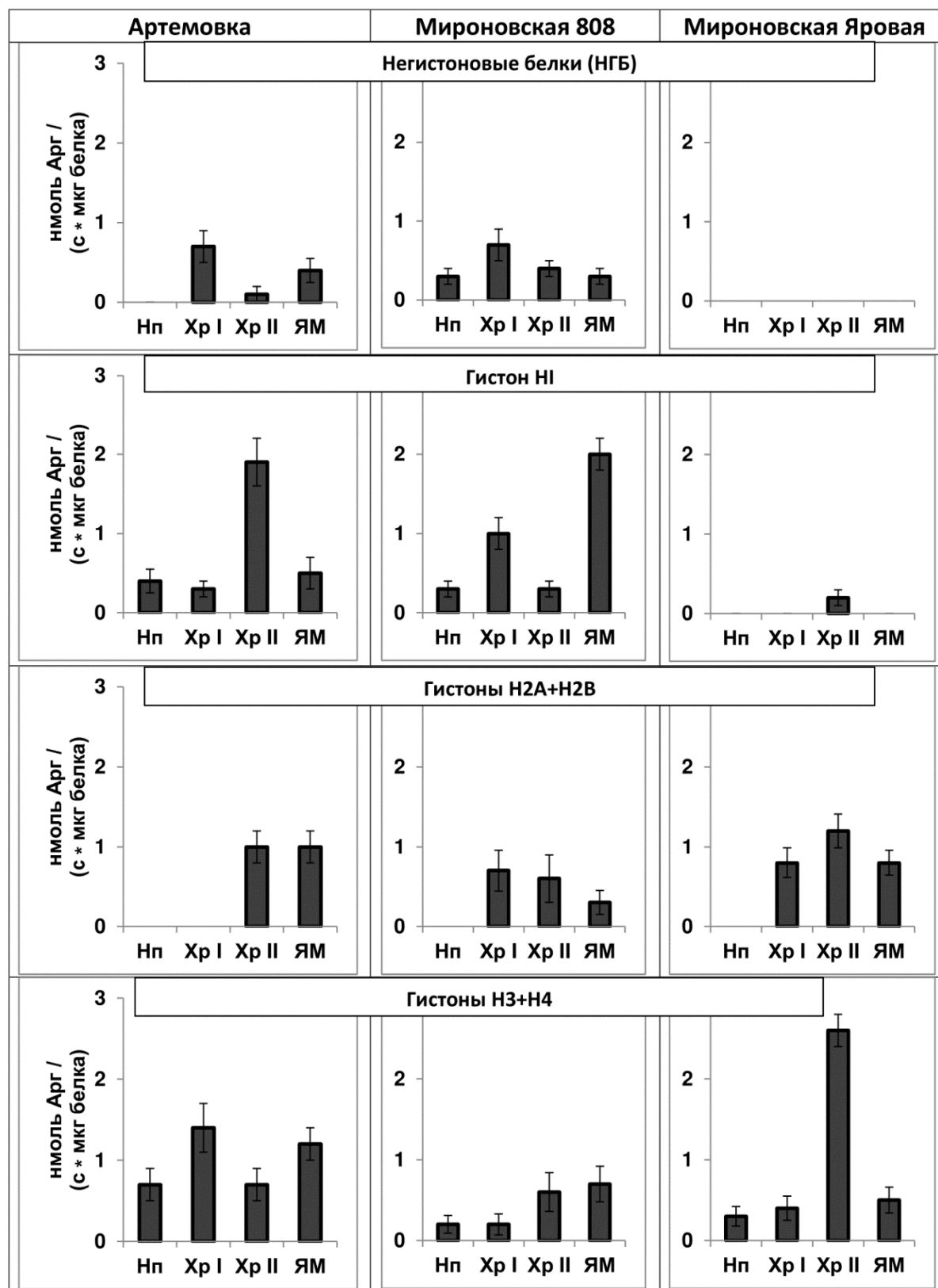


Рис. 2. Активность *Arg*-Х протеолиза в трипсиноподобных комплексах негистоновых (НГБ), линкерных (H1) и коровых гистоновых (H2A+H2B; H3+H4) белках супраструктур клеточных ядер зародышей пшеницы в присутствии бутирата натрия.

Обозначения: Нуклеоплазма – Нп; хроматин непрочносвязанный с ЯМ (Хр-I); хроматин прочносвязанный с ЯМ (Хр-II); ядерный матрикс (ЯМ)

озимой пшеницы в контроле (рис. 1) переходит на фракции линкерного гистона (Н1) ЯМ и Хр I в условиях опыта (рис. 2). Что касается Мирановской яровой, то также наблюдается появление дополнительных активностей на уровне коровых гистонов, при сохранении незначительной протеолитической *Арг-Х* активности во фракции линкерного гистона Н1. Возможно, что появление дополнительных активностей *Арг-Х* протеолиза в негистоновых и гистоновых фракциях, выделенных главным образом из фракции хроматина непрочно связанного с ядерным матриксом и ядерного матрикса, сопряжено с увеличением ацетилирования гистонов в условиях ингибирования ацетилирования ядерных белков.

В данной работе мы попытались показать локализацию трипсиноподобных комплексов в надмолекулярных структурах клеточных ядер на уровне НГБ, линкерных и коровых гистонов и предположить, что *Арг-Х* протеолиз может быть связан со сборкой нуклеосом и структурными перестройками хроматина в процессе прорастания зародышей пшеницы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Duronio R.J., Marzluff W.F. Coordinating cell cycle-regulated histone gene expression through assembly and function of the histone locus body // *RNA Biology*. 2017. № 6. P. 1–13. doi: 10.1080/15476286.2016.1265198.
2. Wolffe A. *Chromatin: Structure and Function*. Third Edition. Academic Press. 1998. P.37-39.
3. Меркулова Т.И., Ананько Е.А., Игнатъева Е.В., Колчанов Н.А. Регуляторные коды транскрипции генов эукариот // *Генетика*. 2013. Т. 49. № 1. С. 37-54.
4. Azad G.K., Tomar R.S. Proteolytic clipping of histone tails: the emerging role of histone proteases in regulation of various biological processes // *Mol. Biol. Rep.* 2014. Vol. 41. № 5. P. 2717–2730. doi: 10.1007/s11033-014-3181-y.
5. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Метод выделения клеточных ядер растений. 1991 Патент № 1701747.
6. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Метод получения ядерных фракций обладающих протеиназной и ингибиторной активностью. 1992. Патент № 1733471.
7. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Метод получения ядерных протеаз из негистоновых и гистоновых белков растений. 2012. Патент № 2518115.
8. Dhaenens M., Glibert P., Meert P., Vossaert L., Deforce D. Histone proteolysis: a proposal for categorization into 'clipping' and 'degradation' // *Bioessays*. 2015. Vol. 37. № 1. P. 70-79. doi: 10.1002/bies.201400118.
9. Böhm L., Crane-Robinson C., Sautière P. Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of a limit peptide of histone H2A // *Eur J Biochem*.1980. Vol. 106. № 2. P.525-530.
10. Mandal P., Verma N., Azad G.K., Singh V., Golla U., Tomar R.S. Epigenetics: role of histone proteases in cellular functions and diseases // In: *Molecular mechanisms and physiology of disease: implications for epigenetics and health*. N. Maulik and T. Karagiannis (eds.), Springer Science+Business Media, New York. 2014. P. 113-125. doi: 10.1007/978-1-4939-0706-9\_4.
11. Mohana Kumar B., Song H.J., Cho S.K., Balasubramanian S., Choe S.Y., Rho G.J. Effect of histone acetylation modification with sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, on cell cycle, apoptosis, ploidy and gene expression in porcine fetal fibroblasts // *J. Reprod Dev.* 2007. Vol. 53. № 4. P. 903-913.

#### References

1. Duronio R.J., Marzluff W.F. Coordinating cell cycle-regulated histone gene expression through assembly and function of the histone locus body // *RNA Biology*. 2017. №6. P. 1–13. doi: 10.1080/15476286.2016.1265198.
2. Wolffe A. *Chromatin: Structure and Function*. Third Edition. Academic Press. 1998. P.37-39.
3. Merkulova T.I., Ananko E.A., Ignateva E.V., Kolchanov N.A. Regulatory transcription codes in eukaryotic genomes. *Genetika*. 2013. Vol. 49. № 1. P. 37–54.
4. Azad G.K., Tomar R.S. Proteolytic clipping of histone tails: the emerging role of histone proteases in regulation of various biological processes // *Mol. Biol. Rep.* 2014. Vol. 41. № 5. P. 2717–2730. doi: 10.1007/s11033-014-3181-y.
5. Ivanova E.A., Vafina G.H. Method of isolation of plant cell nucleus. 1991. RF Patent № 1701747.
6. Ivanova E.A., Vafina G.H. Method of obtaining of nuclear fractions possessing proteinase and inhibition activity. 1992. RF Patent № 1733471.
7. Ivanova E.A., Vafina G.H. Method of obtaining nuclear proteases from non-histone and histone proteins of plants. 2012. RF Patent № 2518115.
8. Dhaenens M., Glibert P., Meert P., Vossaert L., Deforce D. Histone proteolysis: a proposal for categorization into 'clipping' and 'degradation'//

Bioessays. 2015. Vol. 37. № 1. P. 70-79. doi: 10.1002/bies.201400118.

9. Böhm L., Crane-Robinson C., Sautière P. Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of a limit peptide of histone H2A// Eur. J Biochem.1980. Vol. 106. № 2. P.525-530.

10. Mandal P., Verma N., Azad G.K., Singh V., Golla U., Tomar R.S. Epigenetics: role of histone proteases in cellular functions and diseases// In: Molecular mechanisms and physiology of disease:

implications for epigenetics and health. N. Maulik and T. Karagiannis (eds.), Springer Science+Business Media, New York. 2014. P. 113-125. doi: 10.1007/978-1-4939-0706-9\_4.

11. Mohana Kumar B., Song H.J., Cho S.K., Balasubramanian S., Choe S.Y., Rho G.J. Effect of histone acetylation modification with sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, on cell cycle, apoptosis, ploidy and gene expression in porcine fetal fibroblasts// J. Reprod Dev. 2007. Vol. 53. № 4. P. 903-913.



## ANALYSIS OF ARG-X PROTEOLYTIC ACTIVITY OF TRYPSIN-LIKE COMPLEXES OF NUCLEAR SUPRASTRUCTURES UNDER THE INFLUENCE OF SODIUM BUTYRATE DURING THE GERMINATION OF WHEAT GERMS

© G.H. Vafina, R.S. Ivanov, E.A. Ivanova

Ufa Institute of Biology, Ufa Research Centre, Russian Academy of Sciences,  
69, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

Proteins are a vital component of the nuclei of eukaryotic cells however, the plant genome is well understood at the DNA level, information on nuclear plant proteins is extremely insufficiently. Nuclear proteins are poorly represented in proteomic studies because of their low content, often information obtained by the means of highly reliable methods does not illustrate the functional purpose of nuclear proteins. Acetylation of histones regulates gene transcription and plays a crucial role in plant development and plant responses to environmental cues. It is known that the loss of amino termini by proteolysis should cause unfolding of the chromatin and subsequent transcriptional activation. It is suggested that the susceptibility of histones to proteolysis in chromatin can be regulated by the addition or removal of acetyl or methyl groups to lysine residues near the cleavage sites. The aim of the work was to search for the localization of *Arg-X* proteolysis activity in non-histone and histone blocks as a possible mechanism affecting chromatin reorganization during germination of wheat germs under normal conditions and inhibiting the deacetylation of nuclear proteins. It was shown that the trypsin-like proteinases isolated with affinity chromatography from histone and non-histone blocks have *Arg-X* proteolytic activity, which is unique for each individual variety. Under the influence of sodium butyrate, additional *Arg-X*-proteolytic activities of trypsin-like complexes of nuclear suprastructures appeared in all studied wheat varieties. It is possible that the observed changes in the localization of *Arg-X* proteolysis may be associated with structural rearrangements of chromatin in the process of germination of embryos.

Key words: trypsin-like complexes, sodium butyrate, histones, cell nuclei, *Triticum aestivum* L.

УДК 581.2

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-66-74

**РОЛЬ НАДФН-ОКСИДАЗНОГО СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА В РАЗВИТИИ  
УСТОЙЧИВОСТИ МЯГКОЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ К ВОЗБУДИТЕЛЮ  
СЕПТОРИОЗА *STAGONOSPORA NODORUM* BERK**

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

Изучена роль компонентов НАДФН-оксидантной сигнальной системы в генерации активных форм кислорода (АФК) в инфицированных возбудителем септориоза (*Stagonospora nodorum* Berk.) листьях контрастных по устойчивости к патогену сортов мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). У растений устойчивого сорта при инфицировании было обнаружено два пика генерации  $H_2O_2$  – через 6 и 24 ч после инфицирования, которые отсутствовали у восприимчивого сорта. Второй пик генерации АФК у инфицированных растений устойчивого сорта совпадал с накоплением транскриптов генов *TaRboh*, *TaSod*, *TaPrx*, кодирующих ферменты, НАДФН-оксидазу, супероксид дисмутазу и пероксидазу, соответственно. Ингибиторный анализ подтвердил значительный вклад НАДФН-оксидазы и частичный вклад пероксидазы в генерацию АФК в растениях пшеницы на биотрофной стадии развития патогена. Кроме того, анализ активности пероксидазы у контрастных по устойчивости к патогену сортов пшеницы показал вклад данного фермента в утилизацию перекиси водорода на некротрофной стадии развития *S. nodorum*. Также в данной работе обсуждается возможная роль НАДФН-оксидазы в регуляции работы других про-/антиоксидантных ферментов – пероксидазы и супероксид дисмутазы. Так ингибиторный анализ показал зависимость активности пероксидазы от НАДФН-оксидазы и синтеза АФК, что может говорить о возможной индукции перекисью водорода работы фермента пероксидазы. Далее в работе была изучена редокс-чувствительность генов (*TaWRKY45*, *TaWRKY53b* и *TaERF3*) представителей двух мультигенных семейств транскрипционных факторов (ТФ) WRKY и ERF, являющихся ключевыми регуляторами патоген-индуцируемых защитных механизмов клеток растений. Во время первого пика генерации АФК у устойчивого сорта было обнаружено 4-х кратное увеличение транскрипции ТФ *TaWRKY45* и *TaERF3*, и снижение транскрипции *TaWRKY53b*. С помощью ингибиторного анализа показана редокс-чувствительность всех изученных ТФ. Однако *TaERF3* проявлял наибольшую чувствительность к изменению концентрации АФК в инфицированных растениях. Выдвигается предположение об осуществлении регуляции работы НАДФН-оксидазы изученными транскрипционными факторами и обсуждается положительная роль *TaWRKY45* и *TaERF3*, и отрицательная роль *TaWRKY53b* в устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum*.

Ключевые слова: *Stagonospora nodorum* Berk., сигнальные системы, НАДФН-оксидаза, пероксидаза, активные формы кислорода, транскрипционные факторы.

**Введение.** НАДФН-оксидазная сигнальная система регулирует продукцию активных форм

кислорода (АФК) и активируется в растениях под воздействием различных стрессовых факторов

ВЕСЕЛОВА Светлана Викторовна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: veselova75@rambler.ru

БУРХАНОВА Гузель Фанилевна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: guzel\_mur@mail.ru

НУЖНАЯ Татьяна Владимировна, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: tanyawww89@mail.ru

МАКСИМОВ Игорь Владимирович, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
e-mail: phyto@anrb.ru

биотической и абиотической природы [1, 2]. НАДФН-оксидаза плазмаллемы является основным ферментом этой сигнальной системы, активация которой приводит к интенсивному образованию свободных радикалов (супероксид радикала и др.) и перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) в апопласте [1, 2]. В образование АФК, кроме НАДФН-оксидазы, вносят вклад и другие ферменты, например оксалаксоксидаза и пероксидазы (ПО) [2]. Супероксиддисмутаза (СОД) катализирует реакцию дисмутации супероксид анионов, полученных при окислении НАДФН, в  $H_2O_2$  [2]. Значительное повышение содержания АФК, наблюдающееся при активации НАДФН-оксидазы у многих инфицированных растений, оказывает прямое биоцидное действие на патогены. В тоже время, АФК рассматривают в качестве сигнальных молекул, вовлеченных в передачу внутриклеточных сигналов, регулирующих экспрессию генов и индуцирующих ряд молекулярных, биохимических и физиологических реакций, влияющих на устойчивость организма [3]. Молекула  $H_2O_2$  является незаряженной и относительно долгоживущей, может преодолевать значительные расстояния и проникать через мембраны, поэтому является наиболее подходящим кандидатом на роль вторичного мессенджера в различных сигнальных системах. Передача окислительного сигнала в клетках многих эукариот осуществляется кальциевой, липоксигеназной, НАДФН-оксидазной, а также МАП-киназной сигнальными системами [1]. Однако в знаниях о цепочке сигнальных событий остаются пробелы, требующие дальнейшего изучения.

Кроме того, вопрос о сенсорах АФК, в частности  $H_2O_2$ , в клетке остается открытым, а основная роль в передаче сигнала об окислительном взрыве отводится различным редокс-чувствительным белкам, способным обратимо окисляться и восстанавливаться при изменении редокс-статуса клетки. К ним можно отнести редокс-чувствительные ферменты, сигнальные белки – МАП-киназы, G-белки, фосфатазы и факторы транскрипции [1]. Транскрипционный контроль является одним из главных механизмов, регулирующих экспрессию генов, и белковые транскрипционные факторы (ТФ) являются

звеньями в передаче сигнала в любых сигнальных и гормональных системах растений. Было показано, что из всех генов ТФ арабидопсиса наиболее чувствительными к АФК оказались члены мультигенных семейств WRKY и ERF [4]. Однако до сих пор только у небольшого числа редокс-чувствительных ТФ была исследована функциональная роль в сигнализации окислительного взрыва [5, 6].

В связи с этим, целью настоящей работы являлось изучение вклада ферментов НАДФН-оксидазного сигнального каскада (НАДФН-оксидазы, ПО, СОД) в генерацию АФК и выявление редокс-чувствительности генов ТФ (*TaWRKY45*, *TaWRKY53b*, *TaERF3*) в растениях пшеницы, инфицированных гембиотрофным грибом *Stagonospora nodorum* Berk.

#### **Материалы и методы исследований.**

**Объектом исследования** служили 7-суточные проростки мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) контрастных по устойчивости к *S. nodorum* сортов Жница (восприимчивый) и Омская 35 (Ом35) (устойчивый). Растения выращивали на водной культуре как описано ранее [7]. Первые листья семисуточных проростков срезали и помещали в чашки Петри на влажную вату с добавлением бензимидазола (40 мг/л). Часть листьев перед инфицированием инкубировали в растворах ингибитора НАДФН-оксидазы - дифенилен иодониума (DPI) (10 мкМ), ингибитора активности пероксидазы - азидата натрия ( $NaN_3$ ) (1мМ) и аскорбиновой кислоты (ASC), являющейся «ловушкой» для  $H_2O_2$ , (5 мМ). Через 24 ч на листья наносили 5 мкл суспензии пикноспор агрессивного штамма гриба *S. nodorum* ( $10^5$  спор/мл) как описано ранее [7].

**Биохимические параметры.** Измерение генерации перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) и активности фермента пероксидазы (ПО) через 3, 6, 24, 48 и 72 часа после инфицирования листьев пшеницы *S. nodorum* проводили, как описано ранее [7].

**Транскрипционная активность генов.** Выделение тотальной РНК проводили с использованием реагента Trizol согласно протоколу фирмы-поставщика (“Sigma”, Германия) из листьев пшеницы, зафиксированных в жидком



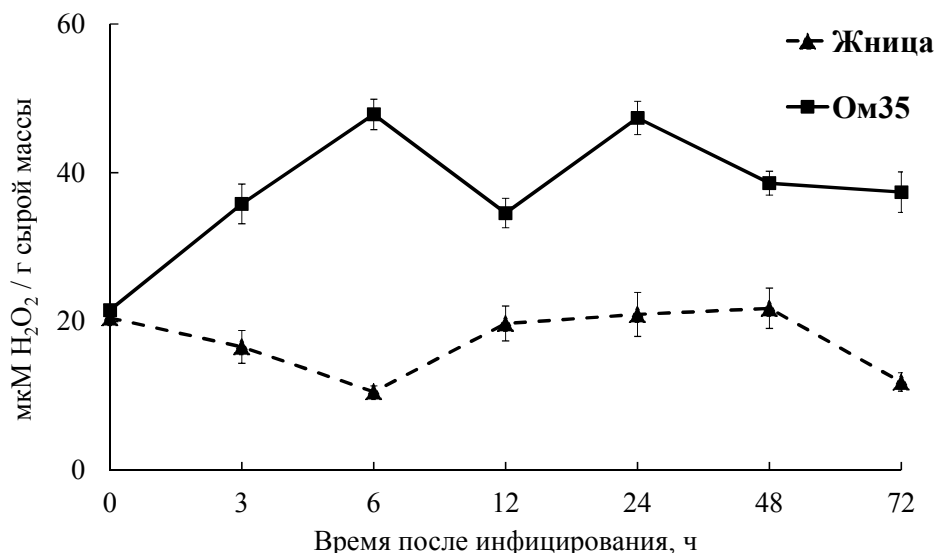


Рис. 1. Изменение содержания перекиси водорода в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы Жница и Омская 35 после инфицирования *S. nodorum*

азоте через 6, 24 и 72 ч после инокуляции патогеном. Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы (“Синтол”, Россия). Анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты НАДФН-оксидазного каскада и ТФ, проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе “iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System” (“Bio-Rad”, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I (“Синтол”, Россия). В работе использовали праймеры к генам, кодирующим НАДФН-оксидазу (*TaRboh*, AY561153), анионную изопероксидазу (*TaPrx*, AK333699), супероксид дисмутазу (*TaSod*, JX398977), транскрипционные факторы *TaWRKY45* (*TaWRKY45*, EF397613), *TaWRKY53b* (*TaWRKY53b*, EF368364), *TaERF3* (*TaERF3*, EF570122). Изменения в транскрипционной активности генов определяли относительно референсных генов белка подобного ингибитору РНКазы-L пшеницы (RNase L inhibitor-like protein) (*RLI(a)*, AY059462) и фактора АДФ-рибозилирования (*ARF*, AB050957) с помощью программного обеспечения “iCycler iQ5 Real-Time Detection System software” (“Bio-Rad”, США).

**Статическая обработка.** Все эксперименты проводили в 3 биологических и 3 анали-

тических повторностях. На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам.

### Результаты и обсуждение.

Особенностью паразитирования *S. nodorum* – возбудителя септориоза пшеницы, изученного в данной работе, является гембиотрофный 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. Растения устойчивого сорта Ом35, инфицированные возбудителем септориоза *S. nodorum*, характеризовались более интенсивной генерацией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, чем растения восприимчивого сорта Жница (рис. 1). Кроме того, при инфицировании устойчивого сорта было обнаружено два пика генерации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – через 6 и 24 ч после инфицирования, которые отсутствовали у восприимчивого сорта (рис. 1). Во многих биологических системах окислительный взрыв часто носит характер «волны» с двумя или более пиками [3]. Первый пик (ранний) возникает в течение

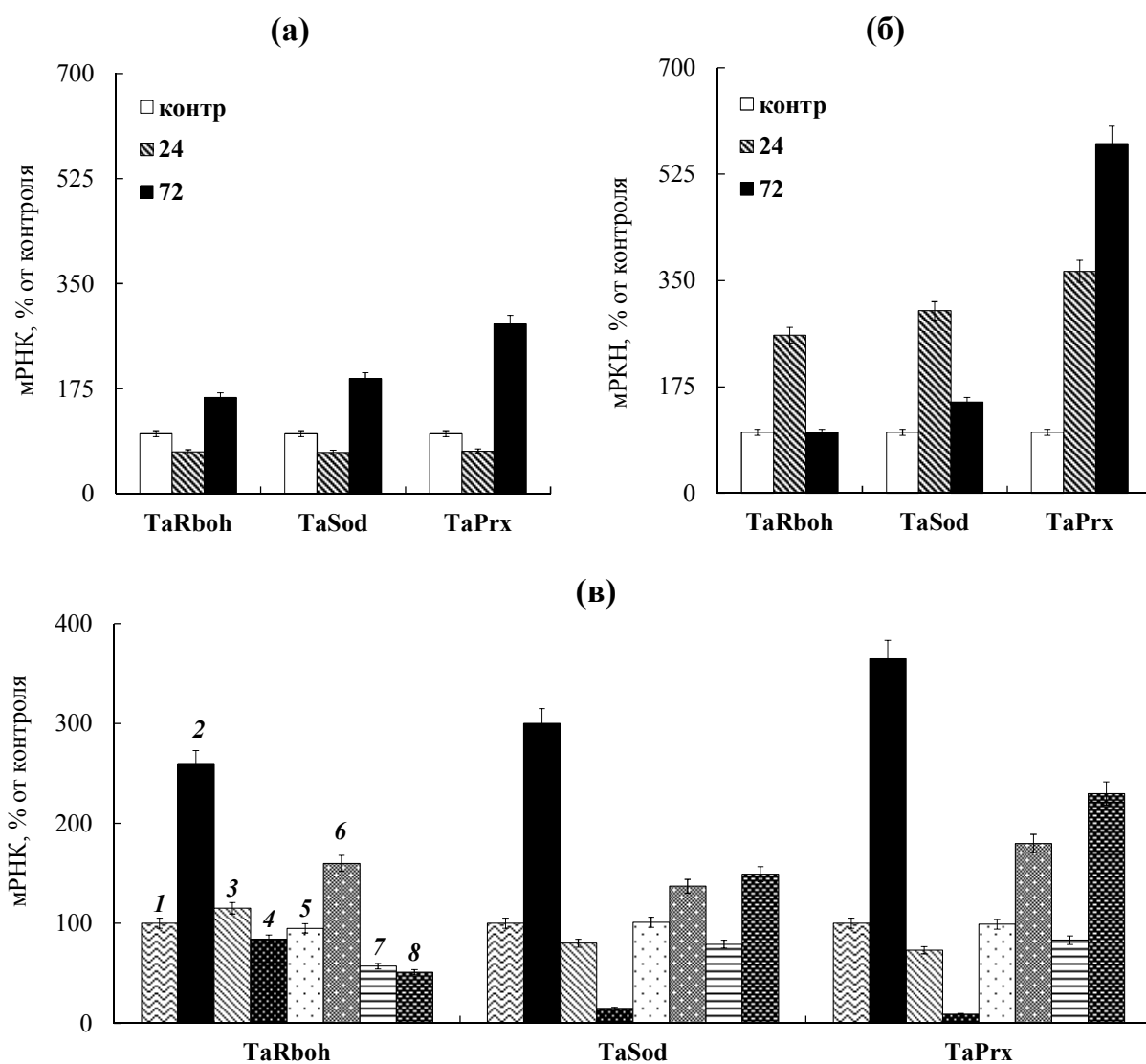


Рис. 2. Содержание мРНК генов, кодирующих ферменты про-/антиоксидантной системы: НАДФН-оксидазу (*TaRboh*), супероксид дисмутазу (*TaSod*), анионную пероксидазу (*TaPrx*) в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы Жница (а) и Омская 35 (б) через 24 и 72 часа после инфицирования *S. nodorum* и в листьях сорта Омская 35, предварительно обработанных ингибиторами НАДФН-оксидазы (DPI), пероксидазы ( $\text{NaN}_3$ ) и аскорбиновой кислотой (ASC) (в) через 24 часа после инфицирования *S. nodorum*: 1 – не инфицированные листья (контроль); 2 – инфицированные листья; 3 – неинфицированные листья, обработанные DPI; 4 – инфицированные листья, обработанные DPI; 5 – неинфицированные листья, обработанные  $\text{NaN}_3$ ; 6 – инфицированные листья, обработанные  $\text{NaN}_3$ ; 7 – неинфицированные листья, обработанные ASC; 8 – инфицированные листья, обработанные ASC

минут и часов, а второй (долгосрочный) – в течение суток после начала действия стимула [3]. Современные исследования показали, что первый (ранний) пик продукции АФК может запускать каскад последующих реакций и формировать долгосрочный АФК сигнал или «АФК волну». Для формирования и распространения «АФК волны» необходима активация НАДФН-

оксидазы, что было доказано с применением каталазы и ингибитора НАДФН-оксидазы [3].

В наших экспериментах на биотрофной стадии развития патогена через 24 ч после инфицирования у устойчивого сорта Ом35 вместе с накоплением транскриптов гена *TaRboh*, кодирующего НАДФН-оксидазу, было обнаружено накопление транскриптов генов *TaPrx* и *TaSod*

(рис. 2а), что совпадало с повышением генерации  $H_2O_2$  у данного сорта (рис. 1). Напротив, у восприимчивого сорта Жница было обнаружено уменьшение содержания транскриптов *TaPrx*, *TaRboh*, *TaSod* генов, кодирующих ферменты, генерирующие АФК (рис. 2б), что совпадало с низким содержанием  $H_2O_2$  у этого сорта (рис. 1а). Таким образом, наши результаты свидетельствуют как о роли НАДФН-оксидазы, так и о роли ПО и СОД в генерации АФК в растениях пшеницы, инфицированных *S. nodorum*. Через 72 ч после инфицирования в начале некротрофной фазы развития патогена была обнаружена противоположная реакция контрастных сортов. У восприимчивого сорта Жница содержание мРНК трех исследованных генов повышалось (рис. 2б), что впоследствии потенциально могло привести к образованию обширных зон поражения с некрозами. У устойчивого сорта Ом35 содержание мРНК двух генов (*TaRboh*, *TaSod*) снижалось, а активность гена *TaPrx* была высокой даже на некротрофной стадии развития патогена (рис. 2а), что может говорить о вкладе ПО как в генерацию, так и в утилизацию АФК через синтез фенольных соединений и лигнина [2].

Ингибиторный анализ показал большую чувствительность гена *TaRboh* к изменениям концентрации  $H_2O_2$  в растениях, так как обработка инфицированных растений устойчивого сорта аскорбиновой кислотой (ASC) подавляла накопление транскриптов *TaRboh* в 5 раз по сравнению с инфицированным контролем (рис. 2в), что совпадает с «волновой концепцией» распространения АФК сигнала и роли НАДФН-оксидазы в нем [3]. Интересно что, обработка растений ингибитором НАДФН-оксидазы DPI практически полностью подавляла транскрипционную активность генов *TaPrx* и *TaSod*, тогда как обработка азидом натрия и ASC оказывала гораздо меньшее влияние на накопление транскриптов данных генов (рис. 2в), что говорит о прямой зависимости транскрипции генов *TaPrx* и *TaSod* от НАДФН-оксидазы. На данный момент неизвестно как индуцируются апопластные ПО, однако мутации по генам *Prx* и *Rboh* приводили к почти полному ингибированию генерации АФК [1]. Еще не установлено, но предполагается взаимодействие между ПО и НАДФН-оксидазой [1]. Таким образом, наши

результаты свидетельствуют о роли НАДФН-оксидазы не только в генерации АФК, но и в регуляции других про-/антиоксидантных ферментов, участвующих в генерации АФК, таких как ПО и СОД.

Также наши результаты показали, что обработка инфицированных растений обоих сортов ингибитором НАДФН-оксидазы DPI приводила к критическому уменьшению содержания  $H_2O_2$  (рис. 3а, б). При обработке ингибитором ПО - азидом натрия, содержание  $H_2O_2$  у восприимчивого сорта оставалось на уровне контрольных растений, а у устойчивого сорта снижалось примерно в 2 раза через 24 ч инфицирования и практически не снижалось через 72 ч после инфицирования (рис. 3а, б). Эти результаты подтверждают значительный вклад НАДФН-оксидазы и свидетельствуют также о частичном вкладе ПО в генерацию АФК в растениях пшеницы на биотрофной стадии развития *S. nodorum*, что подтверждается данными литературы в других патосистемах [2, 6]. Однако анализ активности фермента ПО показал, что инфицированные листья устойчивого сорта Ом35 отличались высокой активностью свободных ПО в течение 3-х суток инфицирования (рис. 3г), что может говорить о вкладе ПО в утилизацию АФК. Ранее нами было показано, что высокая активность ПО на фоне повышенного содержания  $H_2O_2$  приводила к интенсивной лигнификации клеточных стенок инфицированных *S. nodorum* растений пшеницы, повышая тем самым их устойчивость к патогену через ограничение его роста [8]. Напротив, в листьях восприимчивого сорта Жница на фоне низкого содержания  $H_2O_2$  в первые сутки инфицирования не было обнаружено значительного повышения активности ПО, а затем активность фермента повышалась, но в гораздо меньшей степени, чем у устойчивого сорта Ом35 (рис. 3в). Скорее всего, это приводило к интенсивному развитию болезни, как было показано нами ранее [8]. Кроме того, ингибиторный анализ показал, что обработка DPI и ASC приводили к уменьшению активности ПО в инфицированных листьях обоих сортов по сравнению с необработанными инфицированными растениями (рис. 3в, г), что говорит о зависимости регуляции активности ПО от активности НАДФН-оксидазы и синтеза АФК, что

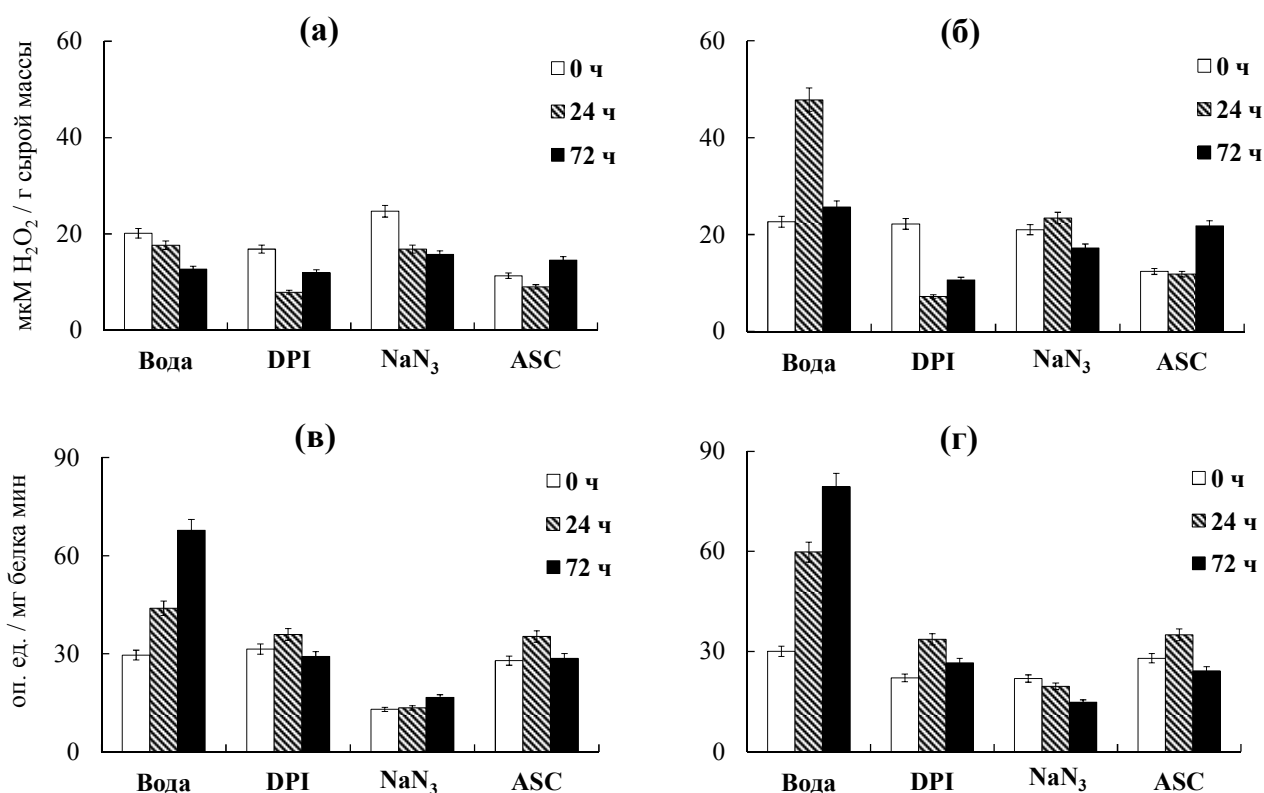


Рис. 3. Изменение содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (а, б) и активности пероксидазы (в, г) под влиянием ингибиторов НАДФН-оксидазы (DPI), пероксидазы (NaN<sub>3</sub>) и аскорбиновой кислотой (ASC) в растениях пшеницы контрастных по устойчивости сортов – Жница (а, в) и Ом35 (б, г) через 24 и 72 часа после инфицирования *S. nodorum*

совпадает с данными литературы [1]. Таким образом, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, являясь вторичным посредником в НАДФН-оксидазной сигнальной системе, возможно, индуцирует активность ПО, которая частично отвечает за генерацию АФК, а частично за утилизацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> через лигнификацию клеточных стенок растения и создание барьера для распространения патогена.

Известно, что НАДФН-оксидаза активируется элизиторами патогенов и регулируется кальций-зависимой протеинкиназой (СДПК) на посттрансляционном уровне в первые минуты и часы инфицирования [1]. В тоже время при иммунном ответе растений большое значение имеет долговременная регуляция НАДФН-оксидазы на транскрипционном уровне [1]. В настоящее время предполагают, что такая регуляция возможна через МАП-киназный каскад и активацию ТФ [1].

Первый пик генерации АФК, обнаруженный у устойчивого сорта Ом35 через 6 ч после инфицирования (рис. 1) мог быть связан с сигнальной функцией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [3, 5]. В этот период

времени нами было обнаружено 4-х кратное увеличение транскрипции ТФ *TaWRKY45* и *TaERF3*, и снижение транскрипции *TaWRKY53b* (рис. 4а). Эти данные позволяют предположить, что гены ТФ *TaWRKY45*, *TaWRKY53b* и *TaERF3* могут являться редокс-чувствительными. Через 24 ч после инфицирования во время долгосрочного пика генерации АФК, обнаруженного у устойчивого сорта Ом35 (рис. 1), транскрипция *TaWRKY45* и *TaERF3* снижалась, а транскрипция *TaWRKY53b* напротив несколько повышалась (рис. 4а). Известно, что ТФ семейств WRKY и ERF являются одними из ключевых регуляторов патоген-индуцируемых защитных механизмов клеток растений и принимают участие в гормональных сигнальных путях и гормональных взаимодействиях [5, 6]. В связи с этим привлекает внимание тот факт, что ранее нами была показана отрицательная роль этилена в устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum*, проявляющаяся в антагонистическом воздействии на формирование СК-зависимых защитных реакций [7]. Также по литературным данным известно,

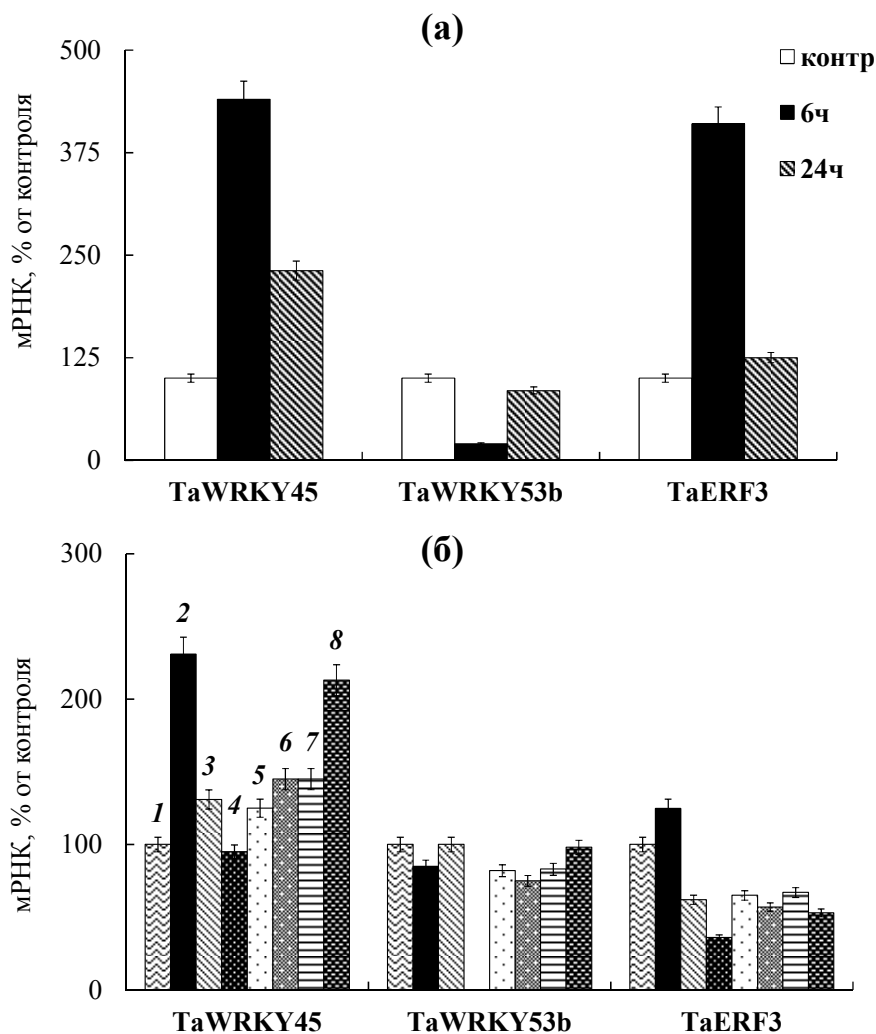


Рис. 4. Содержание мРНК генов, кодирующих транскрипционные факторы: TaWRKY45 (*TaWRKY45*, EF397613), TaWRKY53b (*TaWRKY53b*, EF368364), TaERF3 (*TaERF3*, EF570122) в листьях устойчивого сорта Омская 35 через 6 и 24 часа после инфицирования *S. nodorum* (а) и в листьях, предварительно обработанных ингибиторами НАДФН-оксидазы (DPI), пероксидазы ( $\text{NaN}_3$ ) и аскорбиновой кислотой (ASC) (б), через 24 часа после инфицирования *S. nodorum*: обозначения как на рис. 2

что WRKY45 и TaERF3 вовлечены в СК-зависимый сигнальный путь защиты растений риса от *Magnaporthe grisea* [9] или пшеницы от *Blumeria graminis* [10], соответственно. AtWRKY33, являющийся ортологом TaWRKY53b, положительно регулировал этиленовый сигнальный путь и подавлял СК сигнальный путь защитного ответа при инфицировании арабидопсиса *P. syringae* [11]. Таким образом, наши результаты предполагают положительную роль TaWRKY45, TaERF3 и отрицательную роль TaWRKY53b в устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum*.

Ингибиторный анализ показал, что ген *TaERF3* был наиболее чувствителен к накоплению

АФК в инфицированных растениях, так как при обработке растений DPI, азидом натрия или ASC содержание транскриптов *TaERF3* значительно уменьшалось (рис. 4б). *TaWRKY45* и *TaWRKY53b* реагировали на обработку DPI частичным или полным ингибированием транскрипции, соответственно (рис. 4б). Это может указывать на регуляторную роль всех изученных ТФ в работе НАДФН-оксидазы. Недавно на растениях табака инфицированных *Phytophthora infestans* было показано, что некоторые ТФ из семейства WRKY, являющиеся субстратами МАП-киназ, активировали экспрессию гена *Rboh* и индуцировали окислительный взрыв [5].

На арабидопсисе было показано, что взаимодействие AtMPK6-AtERF6 необходимо для регуляции экспрессии *AtRboh* [1], а AtERF74 напрямую связывался с промотором гена НАДФН-оксидазы и активировал его экспрессию под воздействием различных абиотических стрессовых факторов [6]. Обработка ASC практически не влияла на транскрипцию *TaWRKY45*, но повышала транскрипцию *TaWRKY53b* (рис. 4б), что может косвенно указывать на отрицательную роль *TaWRKY53b* в устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum*.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют, что НАДФН-оксидаза играет важную роль в генерации АФК в растениях пшеницы, инфицированных гемибитрофным патогеном *S. nodorum*, может регулировать работу других про-/антиоксидантных ферментов – ПО и СОД, которые также принимают участие в метаболизме АФК. Регуляция работы НАДФН-оксидазы может осуществляться редокс-чувствительными ТФ *TaWRKY45*, *TaWRKY53b* и *TaERF3*, где *TaWRKY45* и *TaERF3* предположительно играют положительную роль, а *TaWRKY53b* отрицательную роль в устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum*.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме № 0246-2018-0035 и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-00978 с использованием оборудования ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Liu Y., He C. Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35. P. 995–1007.
2. Podgorska A., Burian M., Szal B. Extra-Cellular But Extra-Ordinarily Important for Cells: Apoplastic Reactive Oxygen Species Metabolism // *Front Plant Sci.* 2017. V. 8: 1353.
3. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M.,

Shulaev V., Van Breusegem F. ROS signaling: the new wave? // *Trends in Plant Science* June. 2011. V. 16. N. 6. P. 300-309.

4. Gadjev I., Vanderauwera S., Gechev T.S., Laloi C., Minkov I.N., Shulaev V., Apel K., Inzé D., Mittler R., Van Breusegem F. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis // *Plant Physiology.* 2006. V. 141. P. 436–445.

5. Adachi H., Nakano T., Miyagawa N., Ishihama N., Yoshioka M., Katou Y., Yaeno T., Shirasu K., Yoshioka H. WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana* // *Plant Cell.* 2015. V. 27. P. 2645-2663.

6. Yao Y., He R.J., Xie Q.L., Zhao X.H., Deng X.M., He J.B., Song L., He J., Marchant A., Chen X.Y., Wu A.M. ETHYLENE RESPONSE FACTOR 74 (ERF74) plays an essential role in controlling a respiratory burst oxidase homolog D (RbohD)-dependent mechanism in response to different stresses in Arabidopsis // *New Phytologist.* 2017. V. 213. P. 1667–1681.

7. Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Maksimov I. V. Roles of Ethylene and Cytokinins in Development of Defense Responses in *Triticum aestivum* Plants Infected with *Septoria nodorum* // *Russian Journal of Plant Physiology.* 2016. V. 63. N. 5. P. 609–619.


8. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. The Effect of 1-Methylcyclopropene on the Components of Pro and Antioxidant Systems of Wheat and the Development of Defense Reactions in Fungal Pathogenesis // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2014. V. 50. N. 5. P. 516–523.

9. Shimono M., Sugano S., Nakayama A., Jiang C.J., Ono K., Toki S., Takatsuji H. Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance // *Plant Cell.* 2007. V. 19. P. 2064-2076.

10. Zhang Z., Yao W.L., Dong N., Liang H.X., Liu H.X., 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.

11. Zeng Z., Qamar S.A., Chen Z., Mengiste T. Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens // *Plant J.* 2006. V. 48. N. 4. P. 592-605.

---



**EFFECT OF NADPH OXIDASES CASCADE ON MECHANISMS REGULATING  
DEFENSE COMMON WHEAT REACTIONS UNDER THE DISEASE  
*STAGONOSPORA NODORUM* BLOTCH**

© S.V. Veselova, G.F. Burkhanova, T.V. Nuzhnaya, I.V. Maksimov

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of RAS,  
71, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

The role of the components of the NADPH oxidases cascade in the generation of reactive oxygen species (ROS) by the causal agent of leaf blotch (*Stagonospora nodorum* Berk.) in leaves of common wheat (*Triticum aestivum* L.) of cultivars contrast in the resistance to the pathogen was studied. Two peaks of hydrogen peroxide generation - 6 and 24 hours after infection in resistant plants were found. These peaks were absent in the susceptible plants. The second peak of ROS generation in the infected resistant plants coincided with accumulation of genes transcripts *TaRboh*, *TaSod*, *TaPrx*, which encoded enzymes, NADPH oxidase, superoxide dismutase and peroxidase, respectively. The significant contribution of NADPH oxidase and the partial contribution of peroxidase to the generation of ROS in wheat plants at the biotrophic stage of pathogen development by inhibitory analysis were shown. In addition, the contribution of peroxidase activity of contrast wheat varieties to utilization of hydrogen peroxide at the necrotrophic stage of *S. nodorum* development was shown. Also in this work the possible role of NADPH oxidase in the regulation of other pro-antioxidant enzymes (peroxidase and superoxide dismutase) is discussed. So, the dependence of peroxidase activity on NADPH oxidase and ROS synthesis by inhibitory analysis was shown. This may indicate that hydrogen peroxide induced peroxidase activity. Further, redox sensitivity of genes (*TaWRKY45*, *TaWRKY53b* and *TaERF3*) from two multigenic families of transcription factors (TF) WRKY and ERF, which are key regulators of pathogen-induced protective mechanisms of plant cells, was studied. During the first peak of ROS generation in resistant plants, a 4-fold increase in transcription of TF *TaWRKY45* and *TaERF3* and a decrease in the transcription of *TaWRKY53b* were detected. The redox sensitivity of all studied TF by inhibitor analysis was shown. However, *TaERF3* showed the greatest sensitivity to changes of ROS concentration in infected plants. Our results suggest that TF *TaWRKY45*, *TaWRKY53b* and *TaERF3* regulate the NADPH oxidase, and that *TaWRKY45* and *TaERF3* play a positive role, and *TaWRKY53b* plays a negative role in the resistance of wheat plants to *S. nodorum*.

Key words: *Stagonospora nodorum* Berk., plant signaling systems, NADPH oxidase, peroxidase, reactive oxygen species, transcription factors.

**РЕДОКС-СОСТОЯНИЕ ПИРИДИННУКЛЕОТИДОВ, УРОВЕНЬ КАЛЬЦИЯ И ЦИКЛИЧЕСКОГО АМФ В СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЕ АССОЦИИРОВАНЫ С КАЧЕСТВОМ ЭЯКУЛЯТА ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОМ БЕСПЛОДИИ**

© Ш.Н. Галимов, А.Р. Гайсина, З.Г. Хайбуллина, Э.Ф. Галимова

Цель настоящего исследования состояла в оценке взаимосвязи уровней кальция, циклического АМФ и редокс-состояния пиридиновых нуклеотидов в спермоплазме с качеством эякулята при бесплодии неизвестной этиологии. В исследование включено 170 мужчин с идиопатическим бесплодием в возрасте от 20 до 45 лет (средний возраст  $35 \pm 4,8$  года). Группу сравнения составили 56 мужчин фертильного возраста, имевших от 1 до 3 здоровых детей. Анализ эякулята проводили в соответствии с протоколом ВОЗ (2010). Содержание кальция в семенной плазме определяли с помощью оптической эмиссионной спектрометрии, уровень циклического АМФ – методом иммуноферментного анализа с помощью стандартной тест-системы. О редокс-состоянии пиридиновых нуклеотидов судили по соотношению пирувата и лактата, которые находили энзиматическим методом. Установлено существенное понижение в семенной плазме инфертильных мужчин с патоспермией кальция, цАМФ, пирувата и величины окислительно-восстановительного потенциала пиридиновых нуклеотидов, что соответствует анаэробизации и дезадаптации метаболических процессов. Уровень цАМФ достоверно коррелировал с долей прогрессивно подвижных сперматозоидов, но не с количеством их патологических форм. Обнаружена также положительная корреляция между концентрацией цАМФ и кальция. При патоспермии выявлена отсутствующая у фертильных доноров положительная взаимосвязь между значением коэффициента  $[НАД^+]/[НАДН]$  и концентрацией сперматозоидов. Изменения концентрации вторичных мессенджеров и редокс-состояния пиридиннуклеотидов в эякуляте могут выступать в качестве биохимических предпосылок развития бесплодия неизвестной этиологии. Выявленные нарушения метаболических процессов представляют также интерес с точки зрения поиска молекулярных мишеней для коррекции репродуктивной патологии.

Ключевые слова: бесплодие, сперма, кальций, циклический АМФ, лактат, пируват, пиридиннуклеотиды.

Мужское бесплодие является распространенной патологией, его частота варьирует в различных регионах мира в диапазоне от 2,5% до 12% [1]. Это означает, что более 30 миллионов мужчин во всем мире бесплодны. Самые высокие показатели наблюдаются в Африке и Восточной Европе, включая Россию. Считается, что мужчины несут полную ответственность за

20-30% случаев бесплодия и вносят вклад в 50% случаев в целом. Бесплодие сопряжено с широким спектром социокультурных, экологических, физических и финансовых проблем [2, 3]. Диагноз мужского бесплодия зависит в первую очередь от анализа спермограммы и его оценка оказывает определяющее влияние на лечение пациентов [4]. Несмотря на отсутствие

ГАЛИМОВ Шамиль Нариманович – д.м.н., Башкирский Государственный медицинский университет, e-mail: sngalim@mail.ru

ГАЙСИНА Айгуль Руслановна, Башкирский Государственный медицинский университет, e-mail: aigul\_gaisina@mail.ru

ХАЙБУЛЛИНА Зульфия Гатиатовна – к.б.н., Башкирский Государственный медицинский университет, e-mail: zhaibullina@mail.ru

ГАЛИМОВА Эльмира Фанисовна – д.м.н., Башкирский Государственный медицинский университет, e-mail: efgalimova@mail.ru



тесной взаимосвязи между рутинными показателями спермы и фертильностью, включение инновационных методик контроля качества эякулята в алгоритмы обследования не получило широкого распространения. Многие клиницисты продолжают использовать стандартные параметры спермы как критерии оплодотворяющей способности сперматозоидов. Однако этот подход является не вполне адекватным вследствие значительных межличностных и внутриличностных вариаций традиционных показателей спермограммы.

Молекулярные механизмы развития мужского бесплодия связаны преимущественно с окислительным стрессом: активные формы кислорода (АФК) оказывают негативное воздействие на сперматозоиды, инициируя повреждение ДНК и других критически важных структур [5]. Объективная оценка окислительного стресса необходима для идентификации его интенсивности и мониторинга эффективности лечения. Распространенные тесты, включая анализ скорости генерации АФК, общей антиоксидантной активности или уровня ТБК-реагирующих продуктов, наиболее часто используемые в лабораторной практике, не лишены недостатков. По современным представлениям, более предпочтительно использование в этих целях т.н. окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) как меры баланса между окислителями и антиоксидантами, определение величины которого дает возможность комплексной количественной оценки окислительного стресса в тканях [6]. В связи с изложенным, целью исследования явился анализ значения окислительно-восстановительного потенциала эякулята как маркера окислительного стресса сперматозоидов при идиопатическом бесплодии.

Обследовано 170 пациентов клиник вспомогательных репродуктивных технологий, состоящих в бесплодном браке от 1 года до 8 лет (основная группа). Критерии исключения – тяжёлая соматическая патология, заболевания яичек и их придатков. Группу сравнения составили 56 фертильных мужчин, имеющих от одного до трёх здоровых детей. Исследование выполнялось с информированного согласия пациентов в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации.

У всех пациентов было проведено комплексное клинично-лабораторное обследование с анализом эякулята в соответствии с протоколом Всемирной организации здравоохранения (2010).

О метаболическом статусе спермы судили по окислительно-восстановительному потенциалу пиридиновых нуклеотидов, т.е. соотношению  $[NAD^+]/[NADH]$ , которое рассчитывали исходя из концентраций лактата и пирувата. Уровень лактата в семенной плазме определяли с помощью фотометрического метода (CitricScreen, BioScreen). Длина волны измерения: 390-410 нм. Концентрацию пирувата находили в сопряженной реакции с использованием ЛДГ (Sigma-Aldrich). Для определения содержания кальция образцы эякулята подвергали минерализации с помощью системы AntonPaarMultiwave 3000. Концентрация кальция измерялась методом индуктивно связанной эмиссионной спектроскопии (PerkinElmerOptima 2000 DV). Уровень цАМФ в сперматозоидах определяли с помощью набора AMP-ELISA (EnzoLifeSciences / Biomol, Farmingdale, NY).

Параметры эякулята фертильных и бесплодных мужчин представлены в табл. 1.

Как следует из полученных данных, мужчины с бесплодием неясной этиологии делятся на две группы в зависимости от наличия патологии спермограммы. Отклонения от стандартных показателей найдены у 60% обследованных, у значительной доли пациентов – 40% инфертильных индивидов – статистически значимых отклонений количества и качества сперматозоидов не выявлено. Это свидетельствует о том, что традиционный анализ имеет недостаточную диагностическую и прогностическую ценность, поскольку более чем в трети случаев он не дает информации об истинном потенциале фертильности.

При биохимическом исследовании эякулята выявлен значительный градиент концентраций изученных метаболитов в семенной плазме у фертильных доноров и бесплодных мужчин (табл. 2). При патоспермии обнаружено существенное понижение уровня кальция, эссенциального участника процессов хемотаксиса, акросомальной реакции и капацитации. Не исключено, что при идиопатическом бесплодии происходит нарушение механизмов транспорта

Т а б л и ц а 1

*Параметры спермограммы обследованных мужчин (M±m)*

Показатель	Фертильные доноры (n= 56)	Бесплодные мужчины	
		Нормоспермия (n=68)	Патоспермия (n=102)
объем эякулята, мл	3,5±0,2	3,4±0,3	3,5±0,2
концентрация сперматозоидов, млн/мл	67,1±3,4	58,2±5,0	19,4±2,1*
патологические формы, %	33,2±2,1	38,4±2,3	68,4±5,3*,**
прогрессивно-подвижные сперматозоиды, %	51,9±2,6	47,5±3,7	27,2±1,6*,**

*Примечание:* здесь и в табл. 2: \* $p < 0,05$  по сравнению с фертильными донорами\*\* $p < 0,05$  по сравнению с нормоспермией

Т а б л и ц а 2

*Содержание метаболитов и нуклеотидов в спермоплазме обследованных мужчин*

Показатель	Фертильные доноры (n=55)	Бесплодные мужчины	
		Нормоспермия (n=40)	Патоспермия (n=68)
кальций, мМ/л	5,22±0,41	4,31±0,26	2,27±0,16*,**
АТФ, нМ/мл	53,0±6,5	54,1±6,0	35,0±4,2*,**
цАМФ, пМ/мл	27,9±2,2	24,6±2,2	14,6±1,8*,**
лактат, мМ/л	4,51±0,32	6,38±0,43*	9,04±0,67*,**
пируват, мМ/л	2,14±0,11	2,02±0,12	1,26±0,09*,**
НАД+]/[НАДН]	4119±35	3844±29*	1861±15*,**

и распределения этого элемента между сперматозоидами и окружающей средой.

Уровень цАМФ при бесплодии с патоспермией статистически значимо снижался относительно группы сравнения. Поскольку оптимальная концентрация кальция и цАМФ выступает в качестве триггера двигательной активности гамет, представляло интерес определение корреляций между этими параметрами спермоплазмы с морфофункциональными характеристиками эякулята.

Уровень цАМФ коррелировал с долей прогрессивно подвижных сперматозоидов ( $p < 0,01$ ), но не с количеством их патологических форм. Обнаружена также положительная связь между концентрацией цАМФ и Са ( $p < 0,005$ ) во всех образцах спермы. Тесная корреляция, выявляемая

между вторичными посредниками и подвижностью половых клеток, говорит о взаимосвязи и взаимообусловленности механизмов нарушения функции моторного аппарата гамет с процессами передачи межклеточных сигналов и их энергетическим обеспечением.

Содержание лактата и пируват в спермоплазме изменялось разнонаправленно – наблюдался прирост лактата, особенно при патоспермии, на фоне снижения пирувата. По соотношению лактата и пирувата можно судить о редокс-состоянии клеток, отдельных клеточных компартментов и биологических жидкостей. У фертильных мужчин коэффициент [НАД+]/[НАДН] спермоплазмы имеет очень большую величину по сравнению с другими объектами, в частности, с печенью или миокардом – более 4000 против

500-700. У бесплодных пациентов констатировано падение редокс-потенциала пиридиннуклеотидов и переход этой системы как основного интерфейса метаболических процессов в гипервосстановленное состояние.

Кальций и цАМФ выступают как синергисты, запускающие реакции фосфорилирования флагеллярных белков в процессе созревания и приобретения сперматозоидами способности к активным движениям, и, наряду с АТФ, они прямо или косвенно вовлечены в управление апоптозом в гаметях [7]. Метаболизм АТФ сопряжен с превращениями цАМФ, который непосредственно причастен к большинству физиологических процессов, детерминирующих фертильность эякулята. В сперматозоидах цАМФ повышает скорость утилизации гексоз, является позитивным индуктором биосинтеза белка, инициирует двигательную активность на этапе созревания в эпидидимисе, стимулирует и пролонгирует их прогрессивную подвижность, ингибирует преждевременную капацитацию, регулирует поступление  $Ca^{2+}$  и  $Na^+$ , стимулирует митохондриальное окисление и активность протонной АТФазы в ходе акросомальной реакции и т.д. Поэтому дефицит цАМФ может внести существенный вклад в нарушение репродуктивной функции, тем более что этому посреднику принадлежит множество неизвестных ранее ауто- и паракринных функций, в частности, активно обсуждается роль цАМФ в межклеточной коммуникации сперматозоидов [8].

Интегральным показателем метаболического и энергетического состояния клеток считается соотношение  $[НАД^+]/[НАДН]$ . У фертильных мужчин оно поддерживается на очень высоком уровне, что указывает на существование в норме аэробного фенотипа эякулята. Депрессия этого отношения влечет за собой множество негативных последствий, поскольку редокс-состояние пиридиннуклеотидов – важнейший инструмент гомеостаза и индикатор интенсивности метаболизма, а также регулятор передачи внутриклеточных сигналов в ответ на стрессорные стимулы.

$НАД^+$  используется в качестве субстрата поли(АДФ-рибоза)-полимеразами и сиртуинами, чьи мишени и конечные продукты регулируют рост и продолжительность существования

различных типов клеток. При низком уровне  $НАД^+$  нарушается ацетилирование гистонов и их замещение протаминами в ходе спермиогенеза, растет доля аномальных сперматозоидов. Сиртуины выступают как модуляторы метаболических и стрессиндуцированных реакций, благодаря их активации пиридиннуклеотиды связывают окислительно-восстановительное состояние с сигнальными и транскрипционными процессами [9]. Таким образом, сдвиги содержания пиридиннуклеотидов могут отразиться на выживаемости и формах клеточной гибели сперматозоидов через несколько тесно связанных механизмов. С этих позиций метаболизм  $НАД$  может рассматриваться в качестве перспективной молекулярной мишени при различной патологии, включая бесплодие [10].

Таким образом, особенностями метаболического профиля микроокружения сперматозоидов при идиопатическом бесплодии являются выраженные изменения концентрации вторичных мессенджеров – кальция и цАМФ, снижение уровня пирувата и избыток лактата, гипервосстановленное состояние пиридиновых нуклеотидов, которые могут выступать в качестве молекулярных предикторов нарушения оплодотворяющей способности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Agarwal A., Mulgund A., Hamada A. A unique view on male infertility around the globe // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2015. Vol. 13. P. 37.
2. Галимов Ш.Н., Галимова Э.Ф. Вымирающий пол - иллюзия или реальность? // *Управление здравоохранением.* 2005. № 1-2. С. 35-41.
3. Galimova E.F., Amirova Z.K., Galimov Sh.N. Dioxins in the semen of men with infertility // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2015. Vol. 22 (19). P. 14566-14569.
4. Божедомов В.А., Рохликов И.М., Третьяков А.А. и др. Актуальные вопросы оказания помощи парам с мужским фактором бездетного брака: клинические и организационно-методические аспекты // *Андрология и генитальная хирургия.* 2013. № 4. С. 7-16.
5. Aitken R. Oxidative stress and the etiology of male infertility // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016. Vol. 33, № 12. 1691-1692.
6. Agarwal A., Roychoudhury S., Bjugstad K. Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility? // *Ther. Adv. Urol.* 2016. Vol. 8. P. 302-318.

7. Mendoza F., Perez-Marin C., Garcia-Marin L. Localization, Distribution, and Function of the Calcium-Sensing Receptor in Sperm // *J. Androl.* 2012. Vol. 33. P. 96-104.

8. Alonso C., Osycka-Salut C., Castellano L. Extracellular cAMP activates molecular signalling pathways associated with sperm capacitation // *Mol. Hum. Reprod.* 2017. Vol. 23 (8). P. 521-534.

9. Srivastava S. Emerging therapeutic roles for NAD(+) metabolism in mitochondrial and age-related disorders // *Clin. Transl. Med.* 2016. Vol. 5 (1). P. 25.

10. Павлов В.Н., Галимова Э.Ф., Терегулов Б.Ф., Галимов Ш.Н. Молекулярные и метаболические аспекты мужского бесплодия // *Вестник урологии.* 2016. № 2. С. 40-59.

---

**REDOX-STATE OF PYRIDINNUCLEOTIDES, CALCIUM LEVEL AND CYCLIC AMP IN SEMINAL PLASMA ASSOCIATED WITH SPERM QUALITY IN IDIOPATHIC INFERTILITY**

© **Sh.N. Galimov, A.R. Gaisina, Z.G. Khaybullina, E.F. Galimova**

Bashkir State Medical University,  
3, ulitsa Lenina, 450008, Ufa, Russian Federation

The purpose of this study was to assess the relationship between calcium levels, cyclic AMP and the redox state of pyridine nucleotides in the spermoplasm with the quality of the ejaculate in infertility of unknown etiology. The study includes 170 men with idiopathic infertility between the ages of 20 and 45 (mean age 35±4.8 years). The comparison group consisted of 56 men of fertile age who had from 1 to 3 healthy children. The analysis of the ejaculate was carried out in accordance with the WHO protocol (2010). The calcium content in the seminal plasma was determined by means of optical emission spectrometry, the level of cyclic AMP by the method of enzyme immunoassay by means of a standard test system. The redox state of pyridine nucleotides was evaluated by the lactate/pyruvate ratio, which was found by the enzymatic method. A significant decrease in infertile plasma infertile men with calcium, cAMP, pyruvate and oxidation-reduction potential of pyridine nucleotides is established. This corresponds to anaerobization and disadaptation of metabolic processes. The level of cAMP significantly correlated with the proportion of progressively motile spermatozoa, but not with the number of their pathological forms. Also, a positive correlation between the concentration of cAMP and calcium was detected. With pathospermia, the positive relationship between the value of the coefficient  $[NAD^+]/[NADH]$  and the concentration of spermatozoa is established, which is absent in fertile donors. Changes in the concentration of secondary messengers and the redox state of pyridine nucleotides in the ejaculate can act as biochemical prerequisites for the development of infertility of unknown etiology. The revealed disturbances of metabolic processes are also of interest from the point of view of the search for molecular targets for the correction of reproductive pathology.

Key words: infertility, sperm, calcium, cyclic AMP, lactate, pyruvate, pyridine nucleotides.

УДК: 577.112.083

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-80-84

**ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ РОДА ASPERGILLUS,  
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ АЗЕРБАЙДЖАНА**

© Х.Г. Ганбаров, А.Х. Сафарова, С.М. Шафиева

Была изучена общая протеолитическая (желатиназная) активность грибов рода *Aspergillus*, выделенных из почв Азербайджана: *A. clavatus* штамма BDU-44, *A. fumigatus* штаммы BDU-2, BDU-8 и BDU-48, *A. niger* штаммы BDU-6, BDU-15, BDU-28 и BDU-42, *A. terreus* BDU-18, BDU-38 и BDU-64, *A. versicolor* штаммы BDU-16, BDU-21 и BDU-42. В качестве активного продуцента внеклеточной протеиназы отобраны штаммы грибов *Aspergillus flavus* BDU-44 и *A. niger* BDU-15, у которых общая активность внеклеточной протеиназы составляла 26.7 и 28.8 мкмоль×мин<sup>-1</sup>×мг<sup>-1</sup> белка, соответственно. У данных штаммов грибов изучена динамика изменения внеклеточной активности кислой (рН2.5 и рН5.5), нейтральной (рН7.2) и щелочной (рН9.5) протеиназ в процессе роста культур. Показано, что все типы протеиназ максимальную активность проявляют в конце экспоненциальной фазы роста. Активность всех типов протеиназ у грибного штамма *A. flavus* BDU-44 была в 2.0-3.5 раза больше активности протеиназ штамма гриба *A. niger* BDU-15. У обоих штаммов максимальная активность (230 и 71 мкмоль×мин×мг<sup>-1</sup> белка) проявляет кислая рН5.5 протеиназа, а минимальная активность (68 и 39 мкмоль×мин<sup>-1</sup>×мг<sup>-1</sup> белка) - нейтральная протеиназа. У грибного штамма *A. flavus* BDU-44 уровень активности кислой рН5.5 протеиназы была в 1.24, 5.11 и 1.21 раза больше, соответственно, активности кислой рН 2.5, нейтральной и щелочной протеиназ. А у штамма гриба *A. niger* BDU-15 уровень активности кислой рН5.5 протеиназы была в 1.2, 2.5 и 1.3 раза больше, соответственно, активности кислой рН2.5, нейтральной и щелочной протеиназ.

Ключевые слова: мицелиальные грибы, *Aspergillus*, кислая, нейтральная и щелочная протеиназы.

Протеолитические ферменты играют важную роль в регуляции различных биологических процессов на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях. Основной функцией протеиназы является гидролиз белков. Однако, внеклеточные протеиназы, синтезируемые и секретируемые различными микроорганизмами, в том числе мицелиальными грибами, характеризуются определенными функциями [1].

Изучение протеиназ обусловлено не только их физиологическими значениями, но и широким применением в научных исследованиях и в народном хозяйстве [2].

В микробиологической промышленности протеиназы получают главным образом из мицелиальных грибов рода *Aspergillus*. Протеолитические ферменты изучались у *Aspergillus awamori*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae* и *A. terreus* [3-6].

Протеазы аспергиллов применяются как пищевая добавка для размягчения мяса, для получения гидролизатов, для переработки отходов мясной промышленности, как компоненты моющих средств, для устранения загрязнений белковой природы, в качестве компонентов лекарств, для регуляции образования нежелательных белков [7].

ГАНБАРОВ Худаверди Ганбарович – д.б.н., Бакинский Государственный Университет,  
e-mail: khuda1949@mail.ru

САФАРОВА Айтен Ханлар гызы, Бакинский Государственный Университет,  
e-mail: ayten.84.safarova@gmail.com

ШАФИЕВА Самира Мазаировна – к.б.н., Бакинский Государственный Университет,  
e-mail: shafievasamira@mail.ru

Интерес к протеазам носит и научный характер, что обусловлено их ролью в патогенезе с целью последующего подавления или ослабления патогенного процесса путем регуляции активности протеиназ, участвующих в этом процессе [1].

Настоящая работа посвящена изучению протеиназ грибов рода *Aspergillus*, выделенных из почв Азербайджана.

**Материалы и методы.** В качестве объекта использовали 18 штаммов грибов выделенных из почв Азербайджана и поддерживаемые в коллекции культур кафедры Микробиологии Бакинского Государственного Университета.

Грибные штаммы относились к видам *Aspergillus clavatus* (3 штамма), *A. flavus* (2 штамма), *A. fumigatus* (3 штамма), *A. niger* (4 штамма), *A. terreus* (3 штамма) и *A. versicolor* (3 штамма).

Для получения инокулята (посевного материала) грибы выращивали в жидкой среде сусло (5 баллинговое) при 28°C в течение 2-х суток на качалке 180 об/мин. Полученный посевной материал (3% по объему) переносили в среду следующего состава (%): сахароза-3,0; пептон-1,0; NaCl-0,2; MgSO<sub>4</sub>-0,5; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0,05 и инкубировали при 28°C в течение 5 суток. Затем биомассу отделяли центрифугированием и надосадочную жидкость использовали как ферментный раствор.

Общую протеолитическую активность определяли вискозиметрическим методом и в качестве субстрата использовали 2,75% раствор желатина [8]. Активность выражали в %×мин<sup>-1</sup>×мг<sup>-1</sup> белка (или ед×мг<sup>-1</sup> белка).

Активность кислых (рН2,5 и рН5,5), нейтральной (рН7,2) и щелочной (рН9,5) протеиназ определяли спектрофотометрически по методу Ансона в модификации [9]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое за 1 мин при 30°C превращает казеинат натрия в неосаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние в количестве (0,181 мг), соответствующем 1 мкмоль тирозина и выражали в мкмоль×мин<sup>-1</sup>×мг<sup>-1</sup> белка (или ед×мг<sup>-1</sup> белка).

Содержание белка при измерении активности фермента определяли спектрофотометрически [10].

Все эксперименты проводили в 4-х повторностях и статистически обрабатывали. Проведенные результаты представляют собой средние значения (М) и ошибки (м), которые не превышают 5-6%.

**Результаты и их обсуждение.** Общую протеолитическую активность определяли у 18 штаммов, относящихся к 6 видам рода *Aspergillus*. Достаточно высокая активность наблюдалась у грибных штаммов *A. flavus* BDU-12 и BDU-44, *A. fumigatus* BDU-48, *A. niger* BDU-15 и BDU-28, *A. terreus* BDU-18, *A. versicolor* BDU-22 и BDU-42 (табл.1). Наибольшую активность проявляли штаммы *A. flavus* BDU-44 и *A. niger* BDU-15, а наименьшую-штаммы *A. clavatus* BDU-4 и BDU-11. Протеиназная активность у первых была 5,8-8,5 раза больше, чем у вторых.

У штаммов *Aspergillus flavus* BDU-44 и *A. niger* BDU-15, проявляющих максимальную

Т а б л и ц а 1

Общая протеолитическая активность грибов рода *Aspergillus*(М±м)

N	Виды и штаммы	Активность, ед×мг-1 белка
1.	<i>A. clavatus</i> BDU-4	3,4±0,1
2.	<i>A. clavatus</i> BDU-11	4,6±0,2
3.	<i>A. clavatus</i> BDU-32	8,6±0,3
4.	<i>A. flavus</i> BDU-12	22,4±1,2
5.	<i>A. flavus</i> BDU-44	26,7±1,2
6.	<i>A. fumigatus</i> BDU-2	14,1±0,5
7.	<i>A. fumigatus</i> BDU-8	18,6±0,7
8.	<i>A. fumigatus</i> BDU-48	22,4±1,1
9.	<i>A. niger</i> BDU-6	19,5±0,2
10.	<i>A. niger</i> BDU-15	28,8±1,2
11.	<i>A. niger</i> BDU-28	24,2±1,1
12.	<i>A. niger</i> BDU-42	18,4±0,6
13.	<i>A. terreus</i> BDU-18	20,4 ±1,0
14.	<i>A. terreus</i> BDU-38	17,7±0,6
15.	<i>A. terreus</i> BDU-64	14,7±0,8
16.	<i>A. versicolor</i> BDU-16	19,4±0,8
17.	<i>A. versicolor</i> BDU-21	22,3 ±1,2
18.	<i>A. versicolor</i> BDU-42	20,4 ±1,0

Динамика образования протеиназ в процессе роста гриба *Aspergillus flavus* BDU-44 ( $M \pm m$ )

Время, часы	Рост (биомасса, г/л)	Активность протеиназы, ед×мг <sup>-1</sup> белка			
		кислая, рН2.5	кислая, рН 5.5	нейтральная, рН 7.2	щелочная, рН 9.5
10	0,07±0,002	3±0,1	11 ±0,5	5±0,2	18±0,7
24	0,12±0,005	14±0,6	30±0,8	12±0,6	38±1,2
32	0,20±0,01	30±1,0	45±2,1	30±1,4	55±2,1
48	0,41±0,02	55±2,1	72±3,5	45±2,0	85±3,6
60	0,64±0,03	110±5,4	124±6,0	60±2,6	130±7,5
72	0,87±0,04	185±8,4	230±8,5	68±2,8	190±8,0
84	0,90±0,04	150±6,0	180±6,0	45±2,4	132±7,0
36	0,89±0,03	115±4,4	136±5,0	34±1,6	115±4,1
120	0,83±0,04	98±3,5	108±4,4	26±1,1	95±3,8

протеиназную активность, изучали образование внеклеточной протеиназной активности в динамике их роста. Определяли кислые (рН2.5 и рН5.0), нейтральную (рН7.2) и щелочную (рН9.5) протеиназы. Динамика образования внеклеточной протеиназы в процессе роста гриба *Aspergillus flavus* BDU-44 представлена в таблице 2. По образованию биомассы, очевидно, что интенсивный рост гриба начинается после 32 часов и замедляется через 72 часов инкубации. Следовательно, в этом промежутке находится экспоненциальная фаза роста. Показано, что активность всех протеиназ проявляется через 10 часов инкубации, а интенсивный синтез их происходит 24 часа. Максимальная активность всех типов протеиназ наблюдается через 72 часов инкубации, что соответствует концу экспоненциальной фазы роста гриба.

У грибного штамма *Aspergillus niger* BDU-15 слабая активность всех протеиназ проявляется через 24 часа, а интенсивный биосинтез – через 32 часа инкубации. Однако наибольшая активность всех типов протеиназ наблюдалась через 72 часа культивирования, то есть в конце экспоненциального роста (табл.3). Следовательно, у обоих штаммов грибов интенсивный биосинтез протеиназ происходит в экспоненциальной фазе роста, а максимальное накопление их наблюдается в конце этой фазы.

Уровень активности протеиназ у штамма *A. flavus* BDU-44 был больше, чем у штамма *A. niger* BDU-15. Так как, у *A. flavus* BDU-44 уровень активности кислых (рН2.5 и рН5.0), нейтральной (рН7.2) и щелочной (рН9.5) протеиназ был соответственно 3.1, 3.3, 2.0 и 3.5 раза больше, чем у *A. niger* BDU-15.

Следует отметить, что уровень активности протеиназ значительно отличался между собой у обоих исследованных штаммов. Так, у *A. flavus* BDU-44 уровень активности кислой рН5.5 протеиназы был в 1.24, 5.11 и 1.21 раза больше, соответственно, активности кислой рН2.5, нейтральной и щелочной протеиназ, а у штамма *A. niger* BDU-15 уровень активности кислой рН5.5 протеиназы был в 1.2, 3.0 и 1.31 раза больше, соответственно, активности кислой рН2.5, нейтральной и щелочной протеиназ. Следовательно, у обоих штаммов грибов максимальная активность проявляется у кислой рН5.5 протеиназы, а минимальная активность наблюдается у нейтральной протеиназы.

Уровень активности протеиназ у штамма *A. flavus* BDU-44 был больше, чем у штамма *A. niger* BDU-15. Так как, у *A. Flavus* BDU-44 уровень активности кислых (рН2.5 и рН5.5), нейтральной и щелочной протеиназ был соответственно, 3.1, 3.3, 2.0 и 3.5 раза больше чем у штамма *A. niger* BDU-15.

Динамика образования протеиназ в процессе роста гриба *Aspergillusniger* BDU-44 ( $M \pm m$ )

Время, часы	Рост (биомасса, г/л)	Активность протеиназы, ед·мг <sup>-1</sup> белка			
		кислая, рН 2.5	кислая, рН 5.5	нейтральная, рН 7.2	щелочная, рН 9.5
10	0,04±0,001	0,0	0,0	0,0	0,0
24	0,08±0,003	0,0	1,2± 0,06	0,0	2,0± 0,01
32	0,14±0,005	2,0 ± 0,07	5,0± 0,02	2,0± 0,1	4,0± 0,02
48	0,35±0,006	10,0 ± 0,5	28,0± 1,2	14,0± 0,6	10,0±0,08
60	0,55±0,02	37,0 ± 1,0	46,0± 2,2	1,0± 0,05	25,0± 1,1
72	0,75±0,03	60,0 ± 3,0	71,0± 3,2	39,0± 1,9	54,0± 2,2
84	0,84±0,03	50,0 ± 2,1	57,0± 3,0	28,0± 1,2	32,0± 1,6
96	0,87±0,04	26,0 ± 2,2	40,0± 1,8	14,0± 0,08	19,0± 0,09
120	0,85±0,02	16,0 ± 0,8	22,0± 1,0	8,0± 0,04	7,6± 0,3

Таким образом, в результате поиска среди 18 штаммов грибов рода *Aspergillus* были отобраны штаммы *A.flavus* BDU-44 и *A.niger* BDU-15, проявляющие высокую активность кислых (рН2.5 и рН5.5), нейтральной и щелочной протеиназ. Активность протеиназ штамма *A.flavus*BDU-44 была в 2.0-3.5 раза больше активности протеиназ штамма *A.niger* BDU-15. Максимальная активность протеиназ у обоих штаммов грибов наблюдается в конце экспоненциальной фазы роста.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дунаевский Я. Е., Матвеева А. Р., Фатхуллина Г. Н., Белякова Г. А., Коваленко Е. Д., Белякова Г. А., Коваленко Е. Д., Белозерский М. А. Внеклеточные протеиназымицелиальных грибов как участники процесса патогенеза// Биоорганическая химия, 2008, т.34, N 3, с. 317-321.

2. Кудрявцева О. А., Дунаевский Я. Е. Камзолкина О. В., Белозерский М. А. Протеолитические ферменты грибов: особенности внеклеточных протеиназксилотрофных базидиомицетов// Микробиология, 2008, т. 77, N6, с. 725-737.

3. Negi S., Benerjee R/. Characterization of amylase and protease produced by *A. awamori* in a single bioreactor// Food Research International, 2000, vol. 42, Is. 4, P. 443-448

4. Muthulakshini C., Gomathi D., Kumar D., Ravikumar G, Kolaiselvi M. Production? Purification

and characterization of protease by *Aspergillusflavus* under solid state fermentation// Jourdan J. Biol. Sci., 2011, vol.4,N3, P. 137-148.

5. Hernander-Martinez R., Gutierrez-Sanchez G., Bergmann C., Loera-Corral O., Roja-Domingree A., Huerta-Ochea S. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillusfumagatus* // Process Bioch., 2011, vol.46, N10, P. 2001-2006.

6. Charles P., Devanathan V., Anbu P., Ponnaswamy M. N., Kalaichelvan P., Hur B. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *A. nidulans* HA-10// Basirmikrobiol., 2008, vol.48, Is. s, p.347-352

7. Kolaskar V., Narayanan K., Subrahmanyam V., Rao V. Patriol characterization and application of protease from a fungal species // Indian drugs, 2012, vol. 49, N10, P.42-46

8. Chopra S., Mehta P. Influence of various nitrogen and carbon sources on the production of pectolytic, cellulolytic and proteolytic enzymes by *Aspergillusniger* // Folia microbiol., 1985, vol.30, N2, P. 117-125.

9. Грачева А. М., Грачев Ю. П., Мосичев М.С., Борисенко Е. Г., Богатков С. В., Гернет М.В. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М: Печная и пищевая промышленность, 1982, 237 с.

10. Whitaker J., Ganum P. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm// Analytical Biochemistry, 1980, vol. 109, p. 156-159.





**PROTEOLUTIC ACTIVITY OF FUNGI GENUS *ASPERGILLUS*, ISOLATED  
FROM SOIL OF AZERBAIJAN**

© **Kh.G. Ganbarov, A.X. Safarova, S.M. Shafiyeva**

Baku State University  
23, Academic Zahid Khalilov street, AZ 1148, Baku, Republic of Azerbaijan

It has been studied total proteolytic (gelatinase) activity of fungi genus *Aspergillus*, isolated from soil of Azerbaijan: *A.claviatus* strain BDU-44, *A. fumigatus* strain BDU-2, BDU-8 and BDU-48, *A.niger* strains BDU-6, BDU-15, BDU-28 and BDU-42, *A.terreus* strains BDU-18, BDU-38 and BDU-64, *A.versicolor* strain BDU-16, BDU-21 and BDU-45. The total proteolytic activity of *Aspergillus flavus* BDU-44 and *A.niger* BDU-15 was, accordingly, 26.7 and 28.8  $\text{mkmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  protein and these strains was selected as an active producers of extracellular proteinase. It was studied the synthesis dynamics of acid proteinases (pH2.5 and pH5.5), neutral (pH7.2) and alkaline (pH 9.5), proteinases. It was shown that maximum activity of all proteinases is apperanted at the end of exponential phase of growth. All proteinases acitivity of *A.flavus* BDU-44 was 2.0-3.5 times more than proteinases activity of *A.niger* BDU-15. In both strains maximum activity (230 and 71  $\text{mkmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  protein) showed acid proteinase pH5.5. and minimum activity (68 and 39  $\text{mkmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  protein) – neutral proteinase. The acid proteinase pH 5.5 activity level of *A.flavus* BDU-44 was 1.24; 5.11 and 1.21 times, accordingly, more than activity of acid proteinas pH2.5; neutral and alkalike proteinases. The acid proteinase pH5.5 activity level of *A.niger* BDU-15 was 1.2; 2.5 and 1.3 times more accordingly activity of acid proteinase pH2.5, neutral and alkaline proteinases.

Key words: filamentous fungi, *Aspergillus*, acid, neutral and alkaline proteinases.

УДК 577.114

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-85-89

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЛЕКТИНОВ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ  
*AGARICUS ARVENSIS*, *ARMILLARIELLA MELLEA* И *CANTHARELLUS CIBARIUS***

© М.И. Гарипова, С.А. Башкатов, А.А. Ямалеева, Г.С. Гималетдинова

Проведено выделение и изучение удельного содержания лектинов в экстрактах плодовых тел высших грибов *Agaricus arvensis*, *Armillariella mellea* и *Cantharellus cibarius*. Экстракцию проводили цитратным буфером pH 3,5, содержащим 1М хлорид натрия. Для определения активности лектинов использована реакция гемагглютинации эритроцитов человека первой группы крови и реакция специфического торможения реакции гемагглютинации свободными моносахаридами. Показано, что в исследованных экстрактах присутствуют лектины, способные агглютинировать эритроциты первой группы крови человека. Определена удельная активность лектинов и их углеводная специфичность. Максимальная удельная активность лектинов, определенная по реакции гемагглютинации, наблюдалось в экстракте *Agaricus arvensis* и составила 137 гемагглютинирующих единиц (ГЕ) на миллиграмм белка. Установлено, что все выделенные лектины обладают специфичностью к D-галактозе, относящейся ко второй структурной группе по ориентации гидроксильных групп при третьем и четвертом атомах углерода, и не дифференцируют тип гликозидной связи в конечном дисахаридном фрагменте группоспецифического гликопротеида поверхности эритроцитов. Роль галактозы во взаимодействии исследуемых лектинов с гликопротеидами поверхности эритроцитов подтверждена в реакции торможения гемагглютинации свободной галактозой. Во взаимодействии с исследуемыми лектинами принимает участие дистальная дисахаридная галактоза гликопротеида поверхности эритроцитов (антигена H).

На сорбенте с иммобилизованными мембранами эритроцитов первой группы крови проведено аффинное выделение лектинов из экстракта *Agaricus arvensis*. Методом специфической элюции раствором галактозы получен лектин с удельной активностью в 100 раз превышающей активность исходного экстракта. Таким образом, попытка расширить возможности идентификации в составе полисахаридов моносахариды четвертой группы для расширения арсенала лектинов, дифференцирующих в том числе и структурные аналоги ксилозы, лектинами плодовых тел высших грибов, не дала положительного результата. Возможно, ограничение разнообразия выявленных лектинов связано с недостаточными методическими возможностями их выделения с применением реакции гемагглютинации с применением нативных эритроцитов человека.

Ключевые слова: лектины высших грибов, реакция торможения гемагглютинации, специфичность лектинов к структурным группам моносахаридов.

**Введение.** Лектины – белки, или гликопротеиды, избирательно связывающие определенные моносахариды (дисахариды) как в свободном состоянии, так и в составе сложных

соединений. В отличие от гликозидаз лектины не вызывают химических превращений связываемых углеводных детерминант. В зависимости от систематического положения организма, из

ГАРИПОВА Маргарита Ивановна – д.б.н., Башкирский государственный университет,  
e-mail: margaritag@list.ru

БАШКАТОВ Сергей Александрович – д.б.н., Башкирский государственный университет,  
e-mail: s\_bashkatov@list.ru

ЯМАЛЕЕВА Анна Александровна – д.б.н., Башкирский государственный университет,  
e-mail: yamaleev2@mail.ru

ГИМАЛЕТДИНОВА Гулюса Сабирьяновна, Башкирский государственный университет,  
e-mail: gimaletdinova\_93@mail.ru

которого выделены конкретные лектины, их подразделяют на бактолектины, миколектины, фитолектины и зоолектины [1]. Универсальность распространения лектинов свидетельствует о том, что они выполняют важные физиологические функции. Предполагается, что в организме растений лектины принимают участие в межклеточном взаимодействии, транспорте углеводов и углеводсодержащих соединений и защите от патогенов [2]. В настоящее время лектины широко используются для связывания и выделения углеводов и гликопротеидов, для исследования межклеточного взаимодействия, диагностики и терапии злокачественных опухолей. По одной из классификаций, моносахариды, входящие в состав гликопротеидов клеточной поверхности делятся на 4 основные группы по ориентации гидроксильной группы в третьем и четвертом положениях пиранозного цикла [2]. К первой группе моносахариды, в которых гидроксилы в 3 и 4 положениях ориентированы под плоскость молекулы. Примером моносахаридов этой группы является остаток L-фукозы. Во вторую группу включены моносахариды с расположением указанных гидроксильных групп над плоскостью пиранозного кольца, примером подобных моносахаридов является D-галактоза. Моносахариды третьей группы имеют гидроксильную группу в третьем положении в  $\beta$ -форме, а в четвертом положении – в  $\alpha$ -форме, эта группа включает, например, D-глюкозу. Моносахариды четвертой группы имеют гидроксильную группу в третьем положении в  $\alpha$ -форме и гидроксильную группу в четвертом положении в  $\beta$ -форме. Пример моносахаридов этой группы – L-ксилоза (рисунок 1).

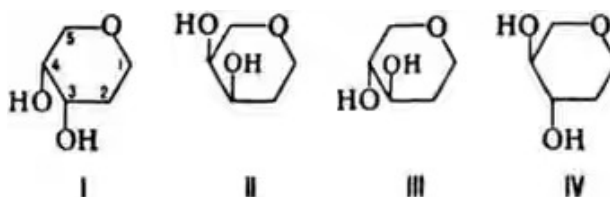


Рис.1. 4 группы моносахаридов по ориентации гидроксильной группы в третьем и четвертом положениях пиранозного цикла

В настоящее время исследователи располагают лектинами, позволяющими дифференци-

ровать моносахариды первых трех групп. Лектины, специфичные к моносахаридам четвертой группы не найдены. Из сказанного вытекает актуальность поиска новых лектинов и определения их углеводной специфичности. Плодовые тела высших грибов известны как источник фармакологически активных соединений, в частности лектинов [3]. Цель нашего исследования – провести выделение и определить углеводную специфичность лектинов плодовых тел лисичек (*Cantharellus cibarius*), опенка осеннего (*Armillariella mellea*) и шампиньона полевого (*Agaricus arvensis*).

### Материалы и методы.

**Экстракция лектинов из плодовых тел высших грибов.** Экстракцию лектинов из навески плодовых тел высших грибов (лисичек, опенка осеннего и шампиньона полевого) проводили равным объемом цитратного буфера pH3,5, содержащего 1 М хлорида натрия. Экстракцию проводили в течение 12 часов при +4° С. Осадок отделяли центрифугированием в течение 15 минут при 2800 об/мин. В полученных экстрактах грибов определяли содержание белка по методу Лоури и определяли гемагглютинирующую активность. Все исследованные экстракты разводились буфером, использованным для экстракции для выравнивания концентрации белка в пробах перед проведением реакции гемагглютинации.

Количественная оценка агглютинирующей активности экстракта плодовых тел *Cantharellus cibarius*, *Armillariella mellea* и *Agaricus arvensis*.

Количественное определение активности лектинов в экстрактах проводили методом титрования в реакции пассивной агглютинации (РПГА) эритроцитов человека первой группы крови.

Метод основан на способности лектинов агглютинировать эритроциты человека, на поверхности которых находятся гликопротеины, в частности, относящиеся к группе антигенов системы АВ0. Известно, что основная система групп крови АВ0 формируется тремя антигенами: антигеном Н, А и В. Антиген Н состоит из концевой  $\beta$ -D-галактозы,  $\beta$ -DN-ацетилглюкозамина,  $\beta$ -D-галактозы и 2-связанных между собой молекул,  $\alpha$ -L-фукозы, которые соединяются с

молекулами белка или церамида. Антиген Н является предшественником антигенов А и В. Специфические гликозидазы маскируют концевую  $\beta$ -D-галактозу Н антигена  $\alpha$ -N-ацетилгалактозамином в случае антигена А, присутствующего на поверхности эритроцитов второй группы крови, либо  $\alpha$ -D-галактозой в случае антигена В. Вероятно, биологическое значение модификации Н антигена заключается в необходимости маскировать концевую  $\beta$ -галактозу Н антигена моносахаридами, связанными  $\alpha$ -гликозидной связью [1].

Для постановки реакции геммагглютинации использовали эритроциты, отмытые от сывороточных белков физиологическим раствором. Эритроциты трижды отмывали 0,14 М раствором хлорида натрия центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 минут. Для проведения реакции агглютинации использовали суспензию эритроцитов, разведенную в 25 раз по отношению к исходному объему крови. Реакцию проводили в U-образных 96-луночных планшетах для иммунологических исследований. В лунках планшета готовили ряд двукратных разведений экстракта (по 50 мкл) и в каждую лунку добавляли по 50 мкл суспензии нативных эритроцитов человека первой группы крови [5].

Результаты реакции агглютинации оценивали визуально через 5 часов и выражали в виде титра агглютинации, соответствующего предельному разведению экстракта, при котором еще наблюдался эффект агглютинации. За единицу агглютинации (ГЕ) принимали концентрацию лектинов, дающую четкую агглютинацию при разведении в 2 раза. В контрольные лунки титруемые экстракты не вносили, заменяя их физиологическим раствором [5].

Для выяснения вопроса о том, влияет ли тип гликозидной связи между концевым и предпоследним моносахаридом гликопротеида поверхности эритроцитов на эффективность взаимодействия лектинов с ним, при постановке реакции геммагглютинации применили эритроциты первой группы крови, на поверхности которых присутствует антиген Н с концевой  $\beta$ -D-галактозой и эритроциты второй группы крови с антигеном А с концевым  $\alpha$ -N-ацетилгалактозамином.

Для определения значимости взаимодействия лектинов с концевым и следующим моносахаридом Н антигена проводили реакцию торможения агглютинации эритроцитов первой

группы крови свободной D-галактозой. После приготовления ряда двукратных разведений экстракта (по 50 мкл) в каждую лунку добавляли по 50 мкл 1 М D-галактозы. Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл суспензии нативных эритроцитов первой группы крови.

Получение аффинных сорбентов с иммобилизованными мембранами эритроцитов проводили по ранее описанному методу [6–9].

10 мл физиологического раствора со взвесью мембран эритроцитов, выделенных центрифугированием гемолизатов 5 мл цельной крови смешивали с 10 мл поливинилового носителя в альдегидной форме и доводили рН до 8,5 добавлением 0,1 М карбонатного буфера рН 8,5. Иммобилизацию проводили при 4<sup>0</sup> С в течение 18 часов. Восстановление азометиновых связей проводили добавлением 20 мг боргидрида натрия с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 4 часов. Аффинное выделение проводили при использовании в качестве буфера сорбции физиологического раствора забуференного 0,02М фосфатным буфером рН 7,2. Элюцию лектинов проводили 1 М раствором D-галактозы рН 7,2, содержащей 0,14 М хлорида натрия [10]. Скорость хроматографии поддерживалась при помощи перистальтического насоса и составляла 2 мл/мин.

**Результаты и обсуждение.** Во всех исследованных экстрактах плодовых тел высших грибов выявлена гемагглютинирующая активность. Максимальное значение титра гемагглютинации (2<sup>10</sup>) наблюдалось в экстракте *Agaricus arvensis* (таблица 1, рисунок 2).

Лишь экстракт из *Armillariella mellea* обладал незначительной агглютинирующей активностью. Вычислена удельная гемагглютинирующая активность экстрактов лектинов (ГЕ/мл). Максимальное значение этого показателя 137 ГЕ/мг наблюдалось для *Agaricus arvensis*.

Как следует из данных, приведенных на рисунке 2, титры геммагглютинации не зависели от того, антиген Н, с  $\beta$ -гликозидной связью между концевым и предыдущим моносахаридом, или А – антиген, имеющий  $\alpha$ -гликозидную связь, присутствовал на эритроцитах. Таким образом, тип гликозидной связи не влияет на эффективность взаимодействия изучаемых лектинов с гликопротеидами поверхности эритроцитов.

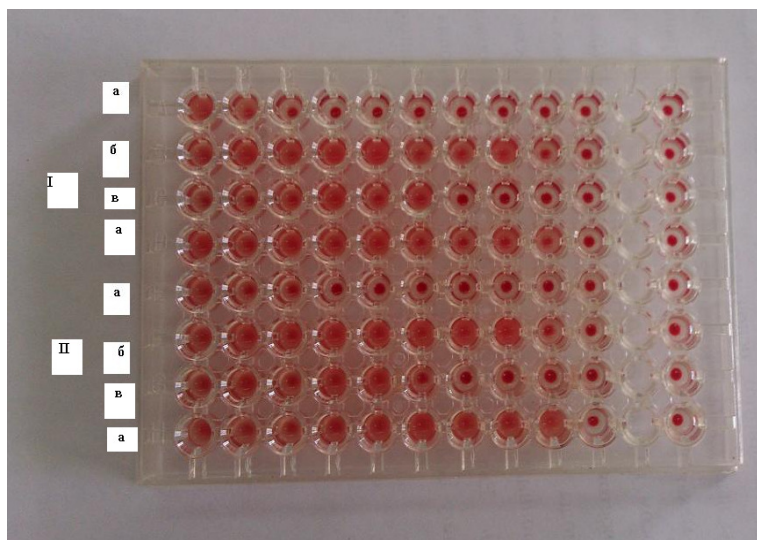


Рис. 2. Титры гемагглютинации в исследованных экстрактах I- с эритроцитами первой группы крови; II- с эритроцитами второй группы крови; а- *Armillariella mellea*; б- *Agaricus arvensis*, в- *Cantharellus cibarius*

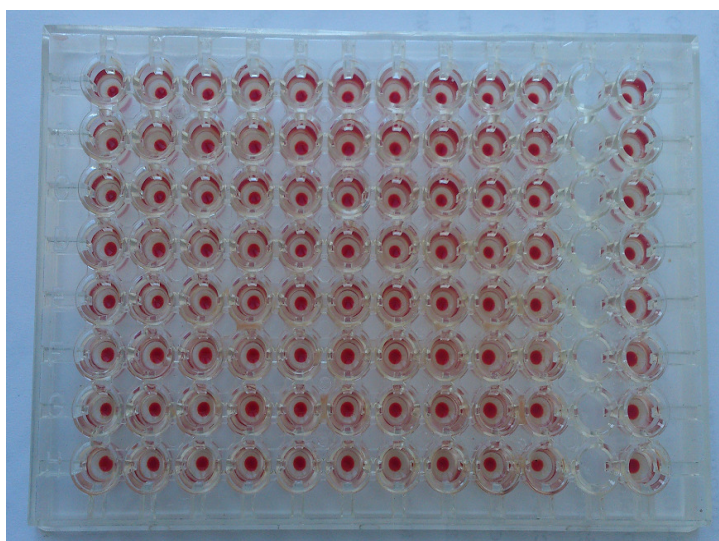


Рис. 3. Торможение реакции гемагглютигации раствором 1 М D-галактозы

Т а б л и ц а 1

Гемагглютинирующая активность  
экстрактов лектинов

Образец гриба	Титр лектинов (00 группа крови)	Титр лектинов (АО группа крови)
<i>Cantharellus cibarius</i>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>8</sup>
<i>Armillariella mellea</i>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>6</sup>
<i>Agaricus arvensis</i>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>10</sup>

При использовании эритроцитов первой группы крови выявлено торможение РГА свободной D-галактозой (рисунок 3). Вероятно, это свидетельствует о том, что во взаимодействии с лектином принимают участие первые два концевых моносахарида Н антигена, представленные галактозой. Добавление D-глюкозы торможения не вызвало. Таким образом, решающее значение во взаимодействии лектинов имеет структура конечного и следующего моносахарида.

Так как реакция взаимодействия изучаемых лектинов с эритроцитами первой группы крови тормозилась моносахаридами, принадлежащими ко второй, но не третьей (D-глюкоза)

структурной группе, выделенные лектины следует считать лектинами, распознающими вторую структурную группу моносахаридов.

Титры лектинов не различались при использовании эритроцитов с антигенами Н и А (рис.2), что свидетельствует об отсутствии влияния типа гликозидной связи ( $\alpha$  или  $\beta$ ) на взаимодействие исследованных лектинов с антигенами групп крови. Таким образом, исследованные лектины, выделенные из плодовых тел высших грибов, специфически взаимодействуют с моносахаридами второй структурной группы, тип гликозидной связи между концевым и последующим моносахаридом роли не играет. Во взаимодействии с исследуемыми лектинами принимает участие дистальная дисахаридная галактоза гликопротеида поверхности эритроцитов (антигена Н). Методом специфической элюции раствором галактозы получен лектин с удельной активностью в 100 раз превышающей активность исходного экстракта.

Вероятно, разнообразие лектинов значительно выше, чем это известно в настоящее время. Возможно, ограничение разнообразия выявленных лектинов связано с недостаточными методическими возможностями их выявления с применением реакции гемагглютинации с применением нативных эритроцитов человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Barondes S. H. Lectins: their multiple endogenous cellular functions // *Annual Review of Biochemistry*, 1981. № 50, 207-230.
2. Sage H. J., Vasquez J. J. Studies on hemagglutinin from the mushroom *Agaricus campestris* // *Journal of Biological Chemistry* 1967. №242. P. 120-125.
3. Ямалеева А.А. Лектины растений и их биологическая роль. - Уфа. Изд-во Башкир. ун-та, 2001. 204 с.
4. Елисеева О.С., Киреева Н.А., Першина А.С., Буторина О.Л., Бикбулатова С.М., Гарипова М.И. Исследование природы взаимодействий инсулина с поверхностью эритроцитов и состава гормонтранспортирующего комплекса плазмы крови человека // *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2009. № 6 . С. 476-478.
5. Гарипова М.И., Фролова И.С., Клеева О.Б., Кузнецов В.П. Новый иммуносорбент на основе поливинилового спирта для очистки интерферона // *Доклады Академии наук*. 1993. Т. 328. № 6. С. 736.
6. Гарипова М.И., Моругова Т.В., Киреева Н.А., Ибрагимов Р.И., Першина А.С., Елисеева О.С., Баранова М.В. Аффинное выделение и изучение состава связывающих инсулин белков сыворотки крови человека. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2010. т. 8. № 8. с. 40-44.
7. Гарипова М.И., Киреева Н.А., Моругова Т.В., Елисеева О.Н., Першина А.С. Аффинное выделение связывающих инсулин сывороточных гликопротеидов человека и изучение их состава в норме и при сахарном диабете первого типа. // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2007. т. 3. № 3. с. 27-32.
8. Гарипова М.И., Умнова В.Ю., Гарипов Т.С., Пиндюрина Т.Е., Штыкова Л.И. Инсулинсвязывающий компонент сыворотки человека в норме и при заболевании сахарным диабетом первого типа. // *Вестник Башкирского университета*. 2005. т. 10. № 4. с. 44-45.
9. Garipova M.I., Usmanova R.R. Isolation and partial characterization of a general hormone transporting blood protein complex. // *Journal of biomolecular structure and dynamics*. 2013. т. 31. № s1. с. 118.
10. Garipova M.I., Bashkatov S.A., Dazko O.I. Two different hormone transporting systems in human blood: features of peptide hormone transport in human blood // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2015. Т. 33. С. 104.

---

### CARBOHYDRATE SPECIFY OF CANTHARELLUS CIBARIUS, ARMILLARIELLA MELLEA AND AGARICUS ARVENSIS LECTINS DETERMINATION

© M.I. Garipova, S.A. Bashkatov, A.A. Yamaleeva, G.S. Gimalletdinova

Bashkir State University,  
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

Lectins are one of tools for carbohydrate investigation. Now investigations have lectins for identification of two from four structural types of monosaccharides and there is a need lectins identifying other monosaccharide types. Preparation and quantity estimation of lectin activity in mushrooms were carried out. It' shown that lectin quantity in *Agaricus arvensis* is maximal. All investigated lectins recognize d- galactose. Sugar specificity of lectins proved with help of specific galactose elution from immobilized erythrocyte membranes. Probably, the detection of new lectins is limited by properties of usually explored method of hem agglutination.

Key words: lectins of higher fungi, the reaction of hemagglutination inhibition, the specificity of lectins for structural groups of monosaccharides.

УДК 637.146.23:61

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-90-94

## БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КУМЫСА ПРИ АТЕРОГЕННЫХ ДИСЛИПИДЕМИЯХ

© Л.Т. Гильмутдинова, Р.Р. Кудаярова, Б.Р. Гильмутдинов, Э.М. Назарова,  
Д.Р. Исеева, К.С. Ямалетдинов

Представлены результаты оценки воздействия лечебно-профилактических программ на основе применения натурального кобыльего кумыса у 117 лиц с риском развития атеросклероза. Установлено, что разработанные программы на основе кумыса оказывают гиполипидемический, антиатерогенный эффекты с уменьшением содержания атерогенных липидных фракций с возрастанием уровня холестерина липопротеидов высокой плотности и снижением коэффициента атерогенности. При сочетанном воздействии натурального кумыса, питьевой минеральной воды с сероводородными ваннами и физическими тренировками отмечается усиление гиполипидемического эффекта с сохранением результатов до 6-12 месяцев. Кумыс, состав которого зависит от состава кобыльего молока, является богатым источником аминокислот, полиненасыщенных жирных кислот, витаминов, гормонов, ферментов, микроэлементов, что определяет его лечебно-профилактическое действие при атерогенных дислипидемиях, оказывая гиполипидемический, антиатерогенный эффект.

Ключевые слова: кобылье молоко, натуральный кумыс, аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты, риск развития атеросклероза, липидный обмен, гиполипидемический эффект, лечебно-профилактические программы.

Среди природных лечебных физических факторов Республики Башкортостан, известным и широко применяемым является натуральный кумыс – ценный продукт молочнокислого и алкогольного брожения кобыльего молока на основе особых кумысных заквасок. Кумысные закваски представляют собой микроорганизмы *Lactobacterium bulgaricum* и дрожжи типа *Torula*. Высокие целебные и питательные свойства кумыса объясняются составом кобыльего молока, который близко стоит по составу к женскому не

только по количеству молочного сахара, но и по качественной характеристике жира, белка, витаминов и существенно отличается от молока других сельскохозяйственных животных [1-3].

Проведенные нами многолетние исследования по изучению лечебных свойств кумыса показали, что его прием оказывает благоприятный эффект в лечении больных с заболеваниями органов дыхания, пищеварения, нарушениях обмена веществ, иммунодефицитных состояниях и др. [1, 4-6]. Кумыс, имеющий в своем составе

ГИЛЬМУТДИНОВА Лира Талгатовна – д.м.н., Башкирский государственный медицинский университет, e-mail: Gilmutdinova23@mail.ru

КУДАЯРОВА Рушания Равильевна – к.х.н., Башкирский государственный медицинский университет, e-mail: Vmk-ufa@bk.ru

ГИЛЬМУТДИНОВ Булат Рашитович – к.м.н., Башкирский государственный медицинский университет, e-mail: Vmk-ufa@bk.ru

НАЗАРОВА Эльмира Муратовна – к.м.н., Башкирский государственный медицинский университет, e-mail: Vmk-ufa@bk.ru

ИСЕЕВА Диляра Рауфовна – к.м.н., Башкирский государственный медицинский университет, e-mail: Vmk-ufa@bk.ru

ЯМАЛЕТДИНОВ Кашшаф Сайфитович – к.м.н., Башкирский государственный медицинский университет, e-mail: Vmk-ufa@bk.ru

комплекс физиологически активных веществ (аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты, антибиотические вещества, витамины, ферменты, гормоны и др.), обладает высокой биологической ценностью и усвояемостью [5].

Белки кумыса являются богатым источником аминокислот, особенно незаменимых, которые в организме не синтезируются из других веществ. Такие аминокислоты, как: метионин, лизин, триптофан, а также содержащиеся в кумысе тирозин и глутаминовая кислота, являются липотропными веществами, необходимыми для функции печени. Они препятствуют образованию холестерина в крови, высокое содержание которого является фактором риска возникновения атеросклероза. И в этой связи липотропные вещества следует считать важнейшей мерой защиты против атеросклероза [4-6].

Высокие биологические свойства кумыса объясняются содержанием в составе жира кумыса полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Среди ПНЖК кумыса преобладают линолевая и особенно  $\alpha$ -линоленовая кислоты – эссенциальные жирные кислоты, которые не образуются в организме человека, вследствие этого являются незаменимыми и должны поступать с пищей. Из линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот с помощью реакций десатурации и элонгации (увеличения количества двойных связей и удлинения цепи, соответственно) синтезируются длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты (ДЦПНЖК) – арахидоновая, эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты [7-9]. Доказанной является связь ДЦПНЖК с обменом холестерина, выражающаяся в повышенном его выведении из организма путем трансформации в легко растворимые соединения [9].

За счет наличия в кумысе значительного количества линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот, кумыс оказывает определенное гипохолестеринемическое, иммуномодулирующее, противовоспалительное действия. Все это дает основание применять кумыс в профилактике развития атеросклероза и связанных с ним сердечно-сосудистых осложнений [6,10,11].

**Цель исследования:** изучение биохимических механизмов применения кумыса в лечебно-профилактических программах при атерогенных дислипидемиях.

**Материал и методы.** В исследование включены 117 мужчин с фактором риска развития атеросклероза - с атерогенными дислипидемиями в возрасте от 39 до 49 лет, находившиеся в санаторий «Танып» РБ – клинической базе кафедры медицинской реабилитации, физиотерапии и курортологии ИДПО БГМУ.

Критериями включения в исследование явилось наличие атерогенных дислипидемий, отсутствие клинических признаков атеросклероза, отсутствие верифицированного заболевания болезней системы кровообращения. Критериями исключения из исследования явились: ишемическая болезнь сердца, симптоматическая артериальная гипертензия, сахарный диабет, хронические заболевания печени и почек, наследственная гиперхолестеринемия.

Состояние липидного обмена изучалось по уровню общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови. Уровень ХС ЛПНП рассчитывали по формуле Friedewald W. и соавт. (1972) в модификации Dahlen G.H. и соавт. (1986). Коэффициент атерогенности (КА) рассчитывали общепринятым способом по Климову А.Н. (1995):  $КА = (ОХС - ХС ЛПВП) / ХС ЛПВП$  [9].

Статистическая обработка полученных результатов выполнялась с применением пакета лицензионных прикладных программ Statsoft Statistica 7.0.

Лица с риском развития атеросклероза с соблюдением принципов простой рандомизации разделены на 2 основных и группу контроля. Лица 1-й группы (ОГ1, 39 чел.) к базовому комплексу дополнительно получали натуральный кобылий кумыс. У лиц 2-й группы (ОГ2, 39 чел.) программа состояла из базового комплекса и приема кумыса, питьевой минеральной воды (МВ) в сочетании с сероводородными ваннами (СВ) и физическими тренировками. 39 лиц составили контрольную группу (КГ), которые получали базовый санаторный комплекс, включающий гиполипидемическую диету, лечебную гимнастику, климатотерапию.

Использовался кумыс из кобыльего молока с закваской на основе микроорганизмов *Lactobacterium bulgaricum* и дрожжей типа *Torula* слабой или средней крепости с кислотностью



70-100° по Тернеру по 200-250 мл 3 раза в день. Прием слабоминерализованной гидрокарбонатной сульфатной кальциево-магниевой минеральной воды «Казанчинская» (М 1,44 г/л) осуществлялся в расчете 3-4 мл на 1 кг массы тела 3 раза в день.

Процедуры СВ проводились с использованием сульфатной магниевой кальциевой МВ (М 4,20-4,57 г/л) с содержанием сульфидных ионов до 138 мг/л (санаторий «Танып», РБ). Процедуры проводились при температуре 36-37°С, длительностью 10-15 минут, 2 дня подряд с отдыхом на третий день, на курс – 10-12 процедур. Физические тренировки проводились на велотренажере Ergometry system-380 (Siemens-Elema) в режиме пульс лимитированных тренировок продолжительностью 30 минут через день с постепенным замещением их ходьбой в режиме 2 км за 30 минут, 10-12 сеансов на курс.

Продолжительность курса лечебно-профилактических программ составила 24 дня. Исследования проводились при поступлении, после курса, а также через 6 и 12 месяцев.

**Результаты и обсуждение.** Липидный профиль плазмы крови характеризовался значимым возрастанием проатерогенных фракций. Уровни общего холестерина, триглицеридов и холестерина липопротеидов низкой плотности существенно превышали значения здоровых соответственно на 35,2% ( $p < 0,001$ ), на 88,9% ( $p < 0,001$ ) и на 53,2% ( $p < 0,001$ ), тогда как концентрация холестерина липопротеидов высокой плотности оказалась снижена на 34,6% ( $p < 0,001$ ). При этом коэффициент атерогенности в 2,02 раза ( $p < 0,001$ ) превышал значения здоровых. У лиц с избыточной массой тела и ожирением, степень выраженности дислипидемии более значима.

Под действием разработанных программ выявлено улучшение липидного профиля крови с усилением эффектов при сочетанном воздействии кумыса, питьевой минеральной воды с сероводородными ваннами и физическими тренировками (Таблица).

У лиц ОГ1 группы на фоне приема кумыса и базового санаторного комплекса отмечено снижение ОХС, ТГ и ХС ЛПНП соответственно на 11,5% ( $p < 0,001$ ), на 8,2% ( $p < 0,05$ ) и на 10% ( $p < 0,01$ ) от исходных значений на фоне снижения коэффициента атерогенности на 12,5%

( $p < 0,01$ ) и статистически незначимого возрастания уровня ХС ЛПВП на 7,8% ( $p > 0,05$ ).

Разработанная программа на основе приема кумыса в сочетании с питьевой МВ, сероводородными ваннами и физическими тренировками оказывает более значимое воздействие на липидный метаболизм по сравнению с программой на основе приема кумыса.

На фоне применения кумыса в сочетании с питьевой МВ, сероводородными ваннами и физическими тренировками у исследуемых ОГ2 группы наблюдается более значимое снижение ОХС, ТГ и ХС ЛПНП соответственно на 15,1% ( $p < 0,001$ ), на 11,8% ( $p < 0,05$ ) и на 16% ( $p < 0,001$ ) от исходных значений на фоне снижения КА на 19,1% ( $p < 0,001$ ) и возрастания уровня ХС ЛПВП на 15,5% ( $p < 0,05$ ).

У лиц контрольной группы смещения параметров липидного метаболизма на фоне базового санаторного комплекса носили недостоверный характер в сравнении с исходными значениями.

При сравнительном анализе динамики параметров основных групп с контрольной группой значимые отличия наблюдаются у лиц ОГ1 группы в отношении уровня ОХС ( $p < 0,05$ ), у лиц ОГ2 группы – в отношении значений ОХС ( $p < 0,001$ ), ХС ЛПНП ( $p < 0,05$ ), КА ( $p < 0,05$ ) и ХС ЛПВП ( $p < 0,05$ ).

Через 6 месяцев у лиц основных групп отмечено сохранение полученных в результате курса воздействия эффектов в отношении показателей липидного статуса плазмы крови с наибольшей динамикой параметров у лиц на фоне сочетанного воздействия кумыса, питьевой МВ и процедур СВ с физическими тренировками. Через 12 месяцев после курса, значения показателей липидного обмена – ОХС, ТГ, ХС ЛПНП, а также КА оказались достоверно ниже первоначальных (до курса коррекции), однако имели тенденцию к возрастанию. Полученные результаты свидетельствуют о пролонгированных эффектах разработанных лечебно-профилактических программ у лиц с риском развития атеросклероза на фоне лечебно-профилактических программ на основе кумыса.

Следовательно, полученные результаты свидетельствуют о гиполипидемическом, антиатерогенном эффектах разработанных лечебно-профилактических программ на основе кумыса

## Влияние лечебно-профилактических программ на основе кумыса на липидный профиль плазмы крови у лиц с риском развития атеросклероза

Показатели		Группы		
		ОГ1 n=39	ОГ2 n=39	КГ n=39
ОХС, ммоль/л	а	6,1±0,12	6,11±0,09	6,1±0,08
	б	5,4±0,13*** <sup>оо</sup>	5,19±0,14*** <sup>ооо</sup>	5,9±0,07
	в	5,35±0,09*** <sup>ооо</sup>	5,11±0,12*** <sup>ооо</sup>	5,88±0,11
ТГ, ммоль/л	а	2,19±0,03	2,21±0,08	2,21±0,05
	б	2,01±0,08*	1,95±0,06*	2,14±0,08
	в	1,99±0,09*	1,93±0,10*	2,13±0,14
ХС ЛПВП, ммоль/л	а	1,02±0,09	1,03±0,06	1,02±0,08
	б	1,1±0,07	1,19±0,05* <sup>о</sup>	1,03±0,06
	в	1,11±0,05	1,21±0,02**	1,04±0,10
ХС ЛПНП, ммоль/л	а	3,79±0,09	3,8±0,08	3,79±0,06
	б	3,41±0,06*** <sup>о</sup>	3,19±0,11*** <sup>ооо</sup>	3,64±0,07
	в	3,36±0,11**	3,09±0,12*** <sup>ооо</sup>	3,61±0,09
КА (отн. ед.)	а	3,21±0,05	3,2±0,10	3,21±0,06
	б	2,81±0,11**	2,59±0,11*** <sup>оо</sup>	3,06±0,10
	в	2,79±0,12**	2,55±0,06*** <sup>ооо</sup>	3,04±0,09

Примечание: \* – значимость различий показателей в сравнении с исходными, <sup>о</sup> – с КГ; \*<sup>о</sup> – p<0,05, \*\*<sup>оо</sup> – p<0,01, \*\*\*<sup>ооо</sup> – p<0,001 (по критерию Стьюдента); а – до курса, б – после курса, в – через 6 месяцев после курса.

у лиц с риском развития атеросклероза. Вероятно, в основе гиполлипидемического воздействия кумыса лежат различные механизмы, включая интенсификацию окислительно-восстановительных реакций в организме с активацией ряда гормональных систем, внутриклеточных обменных процессов, усиление катаболизма атерогенных липидов, интенсификацию процессов окисления холестерина в желчные кислоты. Гиполлипидемические свойства кумыса вероятно, так же обусловлены его химическим составом, зависящим от состава кобыльего молока с содержанием витаминов группы А, Е, С, коэнзима Q10, липотропных веществ, ряда гормонов и ферментов, которые как непосредственно, так и через улучшение окислительно-восстановительных процессов в организме обуславливают гиполлипидемическое, антиатерогенное действие кумыса [1, 5, 11].

При сочетанном применении натурального кумыса, питьевой гидрокарбонатной сульфатной кальциево-магниевой минеральной воды

«Казанчинская» с сероводородными ваннами и физическими тренировками наблюдаются более существенный гиполлипидемический эффект, чем при изолированном применении кумыса, что свидетельствует о синергизме эффектов при сочетанном воздействии природных лечебных физических факторов [12].

#### Выводы.

1. Применение натурального кумыса в лечебно-профилактических программах оказывает гиполлипидемический эффект с уменьшением содержания атерогенных липидных фракций с возрастанием уровня ХС ЛПВП в плазме крови и снижением коэффициента атерогенности с усилением эффектов при сочетанном воздействии натурального кумыса, питьевой минеральной воды с сероводородными ваннами и физическими тренировками у лиц с риском развития атеросклероза.

2. Полученные данные обосновывают возможность воздействия на организм человека сразу несколькими физическими факторами

природного происхождения, влияющими на липидный обмен, снижающих концентрацию в плазме крови атерогенных липидов и способствующих нормализации липидного спектра, устраняя тем самым один из важнейших факторов риска развития атеросклероза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гильмутдинова Л.Т., Кудаярова Р.Р. Основы кумысолечения и кумысоделия. Уфа: Изд-во УГНТУ, 2017. 205 с.
2. Griffin M. Protein and nitrogen composition of equine (*Equus caballus*) milk during early lactation stages // *Lonnerdal Title*, 1992. P. 411-421.
3. Karwacki M., Zbigniew S. Evaluation of relationships between conformation of black and white primiparas and their milk performance // *Acta sci. pol. Zootechn.*, 2002. N 1-2. P. 75-87.
4. Шамаев А.Г. Кумыс. Уфа: Китап, 2007. 312 с.
5. Ахмадуллин Р.В., Гильмутдинова Л.Т., Загидуллин Ш.З. Кумысолечение больных с заболеваниями органов дыхания в условиях санатория. Уфа, 2004. 125 с.
6. Реабилитация и комплексное лечение больных в кумысолечебном санатории «Юматово». Под ред. Л.Т. Гильмутдиновой. Уфа-Юматово, 2004. 162 с.
7. Комарова О.Н., Конь И.Я.  $\omega$ -3 полиненасыщенные жирные кислоты и их метаболиты в патогенезе, профилактике и лечении бронхиальной астмы: современные данные. Вопросы детской диетологии. 2006. Т. 4. № 3. С. 23-34.
8. Конь И.Я., Шилина Н.М., Вольфсон С.Б. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты в профилактике и лечении болезней детей и взрослых. *Лечащий врач*. 2006. № 4. С. 55-59.
9. Липовецкий Б.М. Клиническая липидология. – СПб.: Наука, 2011. 119 с.
10. Гильмутдинов А.Р. Иммуномодулирующая и клиническая эффективность применения кумысолечения в комплексной санаторной реабилитации больных, оперированных по поводу желчнокаменной болезни. *Вестник восстановительной медицины*. 2007. № 4. С. 66-69.
11. Гильмутдинова Л.Т., Кудаярова Р.Р., Янтурина Н.Х. Уникальный состав кобыльего молока – основа лечебных свойств кумыса. *Вестник Башкирского государственного аграрного университета*. – 2011. – № 3. – С. 74-80.
12. Фролков В.К., Нагорнев С.Н., Бобровницкий И.П. Использование минеральных вод питьевого применения для увеличения функциональных резервов и неспецифической резистентности организма. *Russian Journal of Rehabilitation Medicine*. 2017. № 3. С. 34-61.



### BIOCHEMICAL MECHANISMS OF THE MEDICINAL AND PREVENTIVE ACTION OF KUMYS AT ATHEROGENIC DISLIPIDEMENTS

© L.T. Gilmutdinova, R.R. Kudayarova, B.R. Gilmutdinov, E.M. Nazarova, D.R. Iseyeva, K.S. Yamaletdinov

Bashkir State Medical University,  
2a, ulitsa Teatralnaya, 450000, Ufa, Russian Federation

The results of the evaluation of the impact of therapeutic and prophylactic programs based on the use of natural mare's koumiss in 117 persons with the risk of developing atherosclerosis are presented. It is established that the developed programs based on koumiss have hypolipidemic, antiatherogenic effects with a decrease in the content of atherogenic lipid fractions with an increase in the level of high-density lipoprotein cholesterol and a decrease in the atherogenic coefficient. With the combined effect of natural koumiss, drinking mineral water with hydrogen sulphide baths and physical training, there is an increase in hypolipidemic effect with preservation of results up to 6-12 months. Koumiss, the composition of which depends on the composition of mare's milk, is a rich source of amino acids, polyunsaturated fatty acids, vitamins, hormones, enzymes, microelements, which determines its therapeutic and prophylactic effect in atherogenic dyslipidemias, exerting a hypolipidemic, anti-atherogenic effect.

Key words: mare's milk, natural koumiss, amino acids, polyunsaturated fatty acids, risk of atherosclerosis, lipid metabolism, lipid-lowering effect, treatment and prophylactic programs.

УДК 504.064.47: 547.458.8: 579.22

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-95-101

## ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ И ЕЁ УЧАСТИЯ В ДЕСТРУКЦИИ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ВТОРИЧНОГО ПОЛИПРОПИЛЕНА И НАПОЛНИТЕЛЯ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

© А.С. Григориади, В.О. Цветков, А.А. Базунова, В.П. Захаров

В работе представлена комплексная характеристика биологической активности почвогрунта, которая обуславливает деятельность микроорганизмов – активных агентов биодеструкции, необходимых для разрушения полимерных материалов. В качестве полимеров использованы новые композитные материалы на основе вторичного полипропилена «ПП 350 белый Мастербач 22», рисовой шелухи и синтетического этилен-пропиленового каучука (СКЭПТ) с разным массовым содержанием компонентов. Максимальная целлюлозолитическая и фенолоксидазная активность была зарегистрирована в пробах почвы, в которой содержался полимер, состоящий из 100 массовых частей вторичного полипропилена, 10 массовых частей рисовой шелухи и 30 массовых частей СКЭПТ.

Также этот образец характеризовался высокой численностью сахаролитических микромицетов и грибов, способных использовать целлюлозу в качестве единственного источника питания. По результатам оценки пероксидазной и полифенолоксидазной активности можно заключить, что во всех пробах почвы относительно хорошо протекают окислительно-восстановительные процессы, которые свидетельствуют о протекании деструктивных процессов. Почвенная проба, в которой экспонировались образцы полимера, состоящего из 100 массовых частей вторичного полипропилена, 10 массовых частей рисовой шелухи и 10 массовых частей СКЭПТ, обладала наибольшей микробиологической активностью. Было предположено, что в деструкции исследуемых композиционных материалов могут играть роль такие группы микроорганизмов, как целлюлозолитики, аминокетотрофы, термофильные анаэробы и микроскопические грибы, численность которых находилась на относительно высоком уровне. Таким образом, было показано, что высокая биологическая активность почвы, где протекает деструкция материала на основе вторичного полипропилена с 10 и 30 массовыми частями СКЭПТ, свидетельствует об оптимальном содержании компонентов полимера, обеспечивающем биодеструкцию за счет малочисленных специализированных групп микроорганизмов.

Ключевые слова: вторичный полипропилен, тройной этилен-пропиленовый-диеновый каучук, рисовая шелуха, биодеструкция, целлюлозолитические микроорганизмы, ферментативная активность почвы.

Полимерные материалы широко используются во всех отраслях промышленности и в быту, что влечет за собой накопление огромного количества отходов, которые трудно подвер-

гаются разложению. В настоящее время в свете решения проблемы утилизации синтетических полимеров большое внимание уделяется изучению процессов биодеструкции разных материа-

ГРИГОРИАДИ Анна Сергеевна – к.б.н., Башкирский государственный университет,

e-mail: Nyshal111@yandex.ru

ЦВЕТКОВ Вячеслав Олегович – к.б.н., Башкирский государственный университет,

e-mail: zv347@yandex.ru

БАЗУНОВА Анна Андреевна, Башкирский государственный университет,

e-mail: mbazunova@mail.ru

ЗАХАРОВ Вадим Петрович – д.х.н., Башкирский государственный университет,

e-mail: ZaharovVP@bashedu.ru

лов [1, 2]. В окружающей среде разложению подвергаются практически все полимеры, в том числе и синтетические, однако для большинства из них скорость разрушения чрезвычайно низка. На сегодняшний день одним из перспективных методов утилизации отходов считается создание смесевых композитов на основе синтетического полимера, в который включен природный компонент [3]. В качестве наполнителя чаще всего используют крахмал, целлюлозу, хитин, хитозан, коллаген или отходы сельскохозяйственной и пищевой промышленности, содержащие данные полимеры [4-7]. Включенные природные компоненты могут являться питательной средой для бактерий и стимулировать начало деструкции путем облегчения доступа микроорганизмов к стойкой по отношению к биодеструкции части полимера.

Биодеструкция любых полимеров может быть вызвана микроорганизмами различных систематических групп [8, 9], которые представлены чаще всего не единичными видами активных деструкторов, а смешанными ассоциациями организмов [10, 11]. Почва является средой, где сосредоточено большее количество микроорганизмов на единицу объема. Таким образом, для интенсификации процессов деградации полимеров требуется не только размещение их в почвенном субстрате, но и оценка биологической активности почвы, которую обуславливает деятельность микроорганизмов – активных агентов биодеструкции.

Целью данной работы являлось проведение комплексной характеристики биологической активности почвогрунта для оценки протекания процессов деструкции материалов на основе полипропилена и растительного сырья.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования использовался специально подготовленный почвогрунт, который состоял из 2 частей песка, 2 частей перегноя, 1 части конского навоза и 4 частей садовой земли [12]. Ящики с грунтом хранились в лабораторных условиях при комнатной температуре и естественной освещенности. Влажность грунта поддерживалась на уровне не менее 60%, величина рН используемого грунта составляла 6.2. В грунт вертикально погружали полимерные образцы с последующим экспонированием в течение 3 месяцев, после чего

проводили отбор проб грунта для микробиологического анализа в зоне, прилегающей к полимерным материалам. Повторность опыта трехкратная.

В исследовании использовались специально созданные полимерные материалы, в состав которых входил вторичный полипропилен «ПП 350 белый Мастербач 22» (втор-ПП) (100 массовых частей), представляющий собой дробленый материал из некондиционных изделий, производимых методом литья под давлением в технологическом производстве ООО "ЗПИ Альтернатива" (Республика Башкортостан, г. Октябрьский), 10 массовых частей рисовой шелухи (РШ) и тройной каучук этилен-пропилен-диеновый, ТУ 38.103252.92, (ОАО «Уфаоргсинтез») (СКЭПТ) с разными массовыми частями (5, 10, 30, 50 и 70).

Композиции втор-ПП-СКЭПТ с различным массовым соотношением компонентов были получены на лабораторной станции (пластограф) "PlastographEC" (Brabender, Германия) при нагрузке 200 Н и температуре 180 °С и скорости вращения роторов от 10 до 120 об/мин с последующим прессованием на автоматическом гидравлическом прессе "AutoMH-NE" (Carver, США) при 210 °С и выдержке под давлением 7000 кгс в течение 3 мин.

Для оценки биологической активности почвы проводили учет численности микроорганизмов разных эколого-физиологических групп, в том числе способных к участию в биодеструкции полимеров, а также определяли ферментативную активность почвы. Полиеноксидазная и пероксидазная активность почвогрунта определялась спектрофотометрическим методом. Целлюлозолитическую активность определяли вискозиметрически [13], за условную единицу целлюлозолитической активности принимали разницу во времени (сек.) истечения раствора карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), содержавшего исследуемый и контрольный образцы почвы. Учет численности гетеротрофов, микроорганизмов, использующих минеральные формы азота, аэробных и анаэробных целлюлозолитических бактерий и микроскопических грибов проводили стандартным методом посева на питательные среды: МПА, крахмал-аммиачный агар, Виноградского, Теппера и Чапека с сахарозой и КМЦ в качестве источника углерода [14].

*Численность гетеротрофов и микроорганизмов, использующих неорганические формы азота в почвогрунте, содержащем композитный полимерный материал разного состава.*

Вид материала, экспонируемого в почвогрунте	втор-ППП + 10 м.ч.РШ + 5 м.ч.СКЭПТ	втор-ППП + 10 м.ч.РШ + 10 м.ч.СКЭПТ	втор-ППП + 10 м.ч.РШ + 30 м.ч.СКЭПТ	втор-ППП + 10 м.ч.РШ + 50 м.ч.СКЭПТ	втор-ППП + 10 м.ч.РШ + 70 м.ч.СКЭПТ
Численность гетеротрофных микроорганизмов, $n \cdot 10^5$ КОЕ/г почвы	28,9 ± 2,75	388,5 ± 13,8	49,4 ± 1,3	211,1 ± 12,5	64,4 ± 3,1
Численность микроорганизмов, использующих минеральный азот, $n \cdot 10^5$ КОЕ/г почвы	498 ± 21,6	548,3 ± 38,1	306,6 ± 32,5	235 ± 21,8	105 ± 4,5
Численность микромицетов, $n \cdot 10^3$ грибных пропагул/г почвы	2,7 ± 0,6	2,7 ± 0,6	5,3 ± 0,9	6 ± 0,9	3,3 ± 0,3

*Примечание:* втор-ППП – вторичный полипропилен, м.ч. РШ – массовые части рисовой шелухи, КОЕ – колониеобразующие единицы.

Термофильные микроорганизмы инкубировались при температуре 60 °С.

**Результаты и их обсуждение.** При изучении биологической активности почв наиболее общим параметром оказалась численность гетеротрофных почвенных микроорганизмов, которые для питания используют органические формы азота, и микроорганизмов, использующих минеральные формы азота. Только в одной пробе почвы, содержащей втор-ППП с 10 массовыми частями СКЭПТ, была отмечена высокая численность гетеротрофов. Данный показатель в 13,5 раза превышал соответствующие значения, полученные для почвенного образца, где экспонировался полимер с 5 массовыми частями СКЭПТ, который характеризовался наименьшей численностью микроорганизмов. В пробах почвы, содержащих композитный материал, включающий в себя 5 и 10 массовых частей СКЭПТ, наблюдалась максимальная численность микроорганизмов, использующих неорганические формы азота. Данный показатель превышал в 5 раз таковой в пробе, где проводилась экспозиция материала, содержащего 70 массовых частей СКЭПТ (табл.1).

Особое внимание следует уделить группе микроорганизмов, способных использовать целлюлозу

в качестве единственного источника углерода. Так как в состав полимерного материала входит растительный компонент, именно целлюлозолитики будут принимать основное участие в начале процесса биодеструкции. Целлюлоза, являющаяся основным структурным полимером клеточной стенки, будет скорее подвергаться деструкции за счет имеющихся у почвенных микроорганизмов сформированных ферментных комплексов для утилизации данного природного полисахарида.

В разложении и минерализации растительных полимеров участвуют аэробные и анаэробные микроорганизмы-гидролитики, которые синтезируют ферменты, расщепляющие биополимеры до простых сахаров или жирных кислот. В анаэробных условиях ферментативный гидролиз целлюлозы преимущественно осуществляется мезофильными и термофильными бактериями, чаще всего клостридиями [14]. Только в одной пробе почвы, где экспонировался композитный материал с 50 массовыми частями СКЭПТ, наблюдалась высокая численность термофильных анаэробов, и она превышала в 31 раз соответствующий показатель, зарегистрированный в пробе почвогрунта, содержащего полимер с 30 массовыми частями СКЭПТ, где наблюдалась самая низкая численность термофилов.

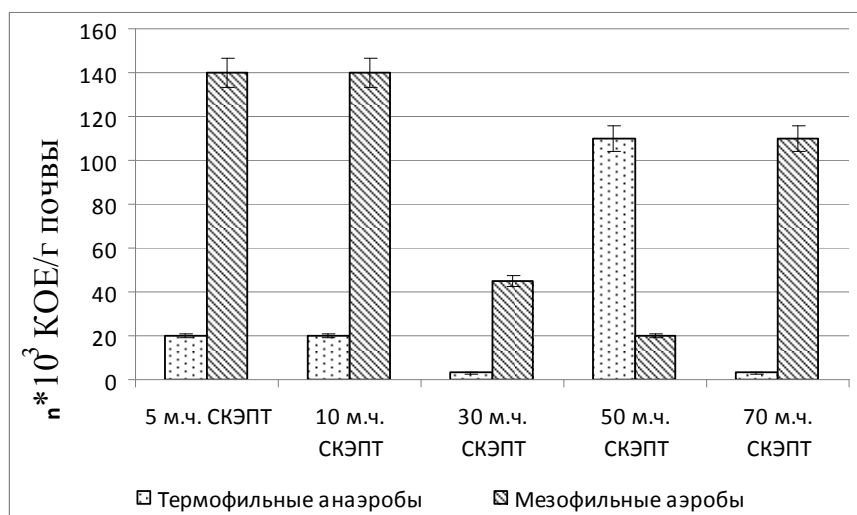


Рис. 1. Численность термофильных анаэробных и мезофильных аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов, определенная методом предельных разведений, в почве, содержащей композитный полимерный материал разного состава

Мезофильные аэробные целлюлозолитики развивались значительно медленнее. Время инкубации составило 4 недели. Почти во всех пробах преобладали мезофильные целлюлозоразрушающие аэробы, однако наибольшее и наименьшее значения их численности различались в 5,5 раза (рис. 1).

Одной из главных групп микроорганизмов, участвующих в разложении сложных органических соединений, являются почвенные микроскопические грибы. Несовершенные микроскопические грибы относятся к наиболее активным разрушителям пластиков, вызывающим различные их повреждения и деструкцию [10, 15]. Повреждения пластиков происходят в результате разрастания грибов на поверхности материала, проникновения мицелия в его толщу через микротрещины, а также вследствие агрессивного воздействия ферментов и метаболитов (органических кислот) грибов на отдельные компоненты пластиков. Так как в исследованных нами полимерах содержались растительные отходы, в их деструкции также будут активно принимать участие целлюлозоразрушающие микромицеты.

Для оценки микробиологической активности почвы и выявления её свойств, позволяющих ускорить процесс деструкции полимерных материалов, определили количество сахаролитических (на стандартной среде Чапека) и целлюлозолитических (на среде Чапека с КМЦ в качестве источника углерода) микромицетов. Было

показано, что в почвенных образцах, где протекала деструкция полимеров, содержащих в своем составе СКЭПТ в разном массовом отношении, данная группа микроорганизмов была развита слабо. Учет численности целлюлозолитических микромицетов показал, что они присутствовали только в пробах, в которых экспонировался композиционный материал с 5-30 массовыми частями СКЭПТ, при этом среднее количество грибов оставляло в среднем 215 пропагул/г почвы.

Способность микроорганизмов разрушать полимерные материалы связывают с большим разнообразием ферментов и метаболитов, секретируемых ими в окружающую среду. В результате действия внеклеточных ферментов и метаболитов полимерный материал переводится в растворимое состояние, образуются низкомолекулярные продукты распада, которые доступны микроорганизмам в качестве источников энергии и питания [10].

Процесс разложения целлюлозы является комплексным результатом деятельности литических микроорганизмов и продуцируемых ими ферментов. В частности, целлюлоза, которая в виде рисовой шелухи входит в состав биodeградируемого полимера, разрушается в почве представителями разных систематических групп микроорганизмов, продуцирующих целлюлазы. На рисунке 2А показаны результаты определения целлюлолитической активности в разных

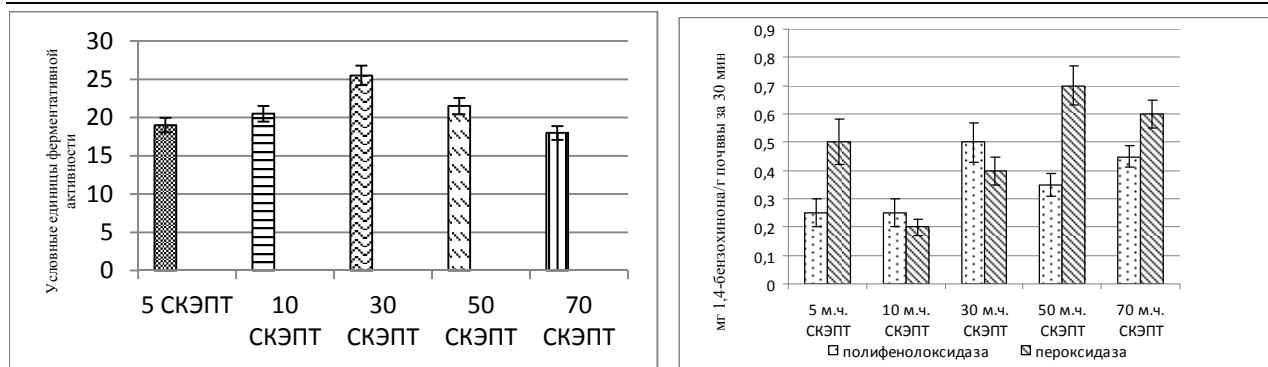


Рис. 2. Изменение активности целлюлазы (А) и фенолоксидаз (Б) в почвогрунте, содержащем полимерные материалы разного состава

образцах почвы. Наиболее высокая активность целлюлаз выявлена в присутствии полимера, содержащего 30 массовых частей каучука. В почвенных пробах, в которых экспонировались полимеры с содержанием 5, 10, 70 массовых частей СКЭПТ, ферментативная активность была на одинаковом уровне и имела относительно высокие значения.

После потребления растительного субстрата микроорганизмами полимерная матрица остается в виде пористой структуры, что объясняет снижение механической прочности модифицированного пластика. В процессе деструкции могут протекать реакции прооксиданта с солями металлов в почве, следствием чего является образование пероксидов [16]. Это фактически и приводит к разрушению полимерных цепей на фрагменты, достаточно малые и усваиваемые микроорганизмами. Наличие в среде пероксидов может провоцировать повышение активности оксидоредуктаз, направленных на дезактивацию токсичного для микроорганизмов продукта реакции.

Почти во всех пробах (рис. 2Б) отмечалась высокая пероксидазная активность. Максимальная активность была зарегистрирована в пробах, в которых проводилась экспозиция полимеров, содержащих 50 и 70 массовых частей СКЭПТ. Наличие полифенолоксидазной активности также было отмечено во всех исследуемых образцах почвогрунта. Наиболее высокая ферментативная активность была выявлена в пробах почв, содержащих полимер с 30 и 70 массовыми частями СКЭПТ. Разница между минимальным и максимальным значением ферментативной

активности в исследуемых образцах была небольшой и составляла всего 30%.

**Закключение.** В результате исследования было предположено, что в деструкции композиционных материалов, в основе которых лежат два синтетических полимера и рисовая шелуха, могли играть роль такие группы микроорганизмов, как целлюлозолитики, аминокетотрофы, термофильные анаэробы и микроскопические грибы, численность которых находилась на относительно высоком уровне. Образец почвогрунта, в котором экспонировался материал, состоящий из полипропилена, рисовой шелухи и 10 массовых частей СКЭПТ, обладал наибольшей микробиологической активностью: численность мезофильных аэробных целлюлозоразрушающих бактерий составляла 140 тыс. КОЕ/г почвы, присутствовали термофильные анаэробы, которые были внесены в результате добавления навоза, также отмечалось максимальное количество микроорганизмов, использующих органические и минеральные формы азота. Однако в данной пробе отмечалось низкое содержание микромицетов, которые являются активными деструкторами полимеров.

По результатам оценки пероксидазной и полифенолоксидазной активности можно заключить, что в исследованных пробах почвы относительно хорошо протекают окислительно-восстановительные процессы, которые также свидетельствуют о деструктивных процессах. При содержании в полимере 30 массовых частей СКЭПТ отмечалась максимальная активность целлюлазы, что может быть ассоциировано с



высокой численностью сахаролитических микробиот, а также наличием грибов, способных использовать целлюлозу в качестве единственного источника питания. С ростом доли СКЭПТ целлюлолитическая активность почвы снижалась.

Таким образом, высокая биологическая активность почвы, где экспонировались образцы композиционного материала на основе втор-ПП с 10-30 массовыми частями СКЭПТ, свидетельствует об оптимальном содержании компонентов композиции, биодegradация которых протекает за счет малочисленных специализированных групп микроорганизмов.

*Статья подготовлена в рамках выполнения научно-исследовательской работы в ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (договор № 03.G25.31.0275).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Stein R.S. Polymer recycling: Opportunities and limitations // Proc.Natl.Acad. Sci. USA. 1992. February. Vol.89. pp. 835-838.
2. Потапов А.Г., Пармон В.Н. Биоразлагаемые полимеры – вперед в будущее // Экология и промышленность России. 2010. Май. Спецвыпуск. С.4-8.
3. Готов И.Н. Биоразлагаемые полимеры: свойства, практическое использование, утилизация // Экология и промышленность России. 2007. № 10. С. 16-19.
4. Vroman I., Tighertz L. Biodegradable polymers // Materials. 2009. № 2. pp. 307-344.
5. Загруднинова А.К., Гужова А.А., Хайруллин Р.З. Электретные биоразлагаемые материалы на основе полиэтилена высокого давления и хитозана // Вестник Казанского технол. университета. 2014. Т.17. № 14. С. 281-283.
6. Бузин М.И., Легонькова О.А., Селицкая О.В., Чайка Е.М., Васильев В.Г., Никифорова Г.Г. Композиции промышленных сополимеров с отходами зернового производства как основа для создания биодegradируемых материалов // Структура и динамика молекулярных систем. 2007. Вып. 1. С. 20-23.
7. Базунова М.В., Чернова В.В., Салихов Р.Б., Кулиш Е.И., Захаров В.П. Физико-химические свойства полимерных композитов на основе полиолефинов и их отходов и лужки подсолнечника // Вестник Башкирского университета. 2018. Том 23. №1. С. 70-74.
8. Пехташева Е.Л., Неверов А.Н., Заиков Г.Е., Стоянов О.В., Русанова С.Н. Биоповреждения и

защита полимерных материалов // Вестник Казанского технол. университета. 2012. Том 15. № 10. С. 166-173.

9. Fatimah Alshehrei Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorganisms // Journal of Applied & Environmental Microbiology. 2017. Vol. 5. № 1. pp. 8-19.

10. Кузнецов А.Е. и др. Прикладная экобиотехнология. Том 1. М., БИНОМ, 2012. 629с.

11. Штильман М.И. Биодegradация полимеров // Журнал Сибирского федерального университета. 2015. Том 8. № 2. С. 113-130.

12. ГОСТ 9.049-91. Единая система защиты от коррозии и старения. Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. М.: Изд-во стандартов, 1991, 15 с.

13. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 2005. 252 с.

14. Сэги Й Методы почвенной микробиологии /Пер. с венг. И.Ф.Куренного; Под ред. Г.С.Муромцева. М: Колос, 1983. 296 с.

15. Лугаускас А. Ю., Микульскене А. И., Шляужене Д. Ю. Каталог микробиот - биодеструкторов материалов. М.: Наука, 1987. 335 с.

16. Куренков В.Ф. Химия и физика высокомолекулярных соединений. – Казань, «Бутлеровское наследие», 2009. 292с.

#### References

1. Stein R.S. Polymer recycling: Opportunities and limitations // Proc.Natl.Acad. Sci. USA. 1992. February. Vol.89. pp. 835-838.
2. Potapov A.G., Parmon V.N. Biodegradable polymers - forward to the future // Ekologiya i promyshlennost' Rossii. 2010. May. Spetsvypusk. S.4-8. (In Russian).
3. Gotov I.N. Biodegradable polymers: properties, practical use, disposal // Ekologiya i promyshlennost' Rossii. 2007. № 10. S. 16-19. (In Russian).
4. Vroman I., Tighertz L. Biodegradable polymers // Materials. 2009. № 2. pp. 307-344.
5. Zagrutdinova A.K., Guzhova A.A., Khayrullin R.Z. Electret biodegradable materials based on high-density polyethylene and chitosan // Vestnik Kazanskogo tekhnol. universiteta. 2014. T.17. № 14. S. 281-283. (In Russian).
6. Buzin M.I., Legon'kova O.A., Selitskaya O.V., Chayka Ye.M., Vasil'yev V.G., Nikiforova G.G. Compositions of industrial copolymers with waste products of grain production as a basis for creating biodegradable materials //Struktura i dinamika molekulyarnykh sistem. 2007. Vyp. 1. S. 20-23. (In Russian).
7. Bazunova M.V., Chernova V.V., Salikhov R.B., Kulish Ye.I., Zakharov V.P. Physico-chemical

properties of polymer composites based on polyolefins and their waste and sunflower husks // Vestnik Bashkirskogo universiteta. 2018. Tom 23. №1. S. 70-74. (In Russian).

8. Pekhtasheva Ye.L., Neverov A.N., Zaikov G.Ye., Stoyanov O.V., Rusanova S.N. Bio-damages and protection of polymeric materials // Vestnik Kazanskogo tekhno. universiteta. 2012. Tom 15. № 10. S. 166-173. (In Russian).

9. Fatimah Alshehrei Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorganisms // Journal of Applied & Environmental Microbiology. 2017. Vol. 5. № 1. pp. 8-19.

10. Kuznecov A.E., Gradova N.B., Lushnihov C.V. (2012) Applied ecobiotechnology: Tutorial in 2 volumes, V.1. Moscow: Binom, 629 p. (In Russian).

11. Shtil'man M.I. Biodegradation of polymers // Journal of Siberian Federal University. 2015. Vol 8. № 2.

pp. 113-130. (In Russian).

12. GOST 9.049-91. Unified system of protection against corrosion and aging. Polymer materials and their components. Methods of laboratory tests for resistance to mold fungi. M.: Izd-vo standartov, 1991, 15 s. (In Russian).

13. Khaziyev F.KH. Methods of soil enzymology. M.: Nauka, 2005. 252 s. (In Russian).

14. Seigi J. Methods of soil microbiology /Per. s veng. I.F.Kurenogo; Pod red. G.S.Muromtseva. M: Kolos, 1983. 296 s. (In Russian).

15. Lugauskas A. YU., Mikul'skene A. I., Shlyauzhene D. YU. Catalog of micromycetes - biodegraders of materials. M.: Nauka, 1987. 335 s. (In Russian).

16. Kurenkov V.F. Chemistry and physics of macromolecular compounds. – Kazan', «Butlerovskoye naslediyе», 2009. 292s. (In Russian).



## EVALUATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE SOIL AND ITS PARTICIPATION IN THE DESTRUCTION OF POLYMER COMPOSITES BASED ON SECONDARY POLYPROPYLENE AND FILLER FROM VEGETABLE RAW MATERIALS

© A.S. Grigoriadi, V.O. Tsvetkov, A.A. Bazunova, V.P. Zakharov

Bashkir State University,  
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

The paper presents the complex characteristics of the biological activity of soil, which determines the activity of microorganisms – active agents of biodegradation, necessary for the destruction of polymeric materials. New composite materials based on secondary polypropylene "PP 350 white Masterbach 22", rice husk and synthetic ethylene-propylene rubber (scept) with different mass parts were used as polymers. The maximum cellulolytic and phenol oxidase activity was recorded in soil samples, which contained a polymer consisting of polypropylene, rice husks and 30 mass parts of scept.

Also, this sample was characterized by a high number of sugar-containing micromycetes and fungi that can use cellulose as a single source of nutrition. According to the results of evaluation of peroxidase and polyphenol oxidase activity, it can be concluded that in all soil samples oxidation-reduction processes occur relatively well, which indicate the course of destructive processes. The soil sample in which samples of the polymer consisting of polypropylene, rice husk and 10 mass parts of scept were exhibited had the greatest microbiological activity. It was suggested that such groups of microorganisms as cellulolytics, aminogeterotrophs, thermophilic anaerobes and microscopic fungi, the number of which was at a relatively high level, can play a role in the destruction of the studied composite materials. Thus, it was shown that the high biological activity of the soil, where the destruction of the material based on polypropylene with 10 and 30 mass parts of the Scept, indicates the optimal content of the polymer components, providing biodegradation due to the small number of specialized groups of microorganisms.

Key words: polypropylene, ethylene-propylene rubber, rice husks, biodegradation, cellulolytic microorganisms, enzymatic activity of soil.

УДК 631.466.1

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-102-107

**ВЛИЯНИЕ БИОПРЕПАРАТА «МЕТАБОЛИТ» НА КОМПЛЕКСЫ МИКРОМИЦЕТОВ  
В РИЗОСФЕРЕ И ФИЛЛОСФЕРЕ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В УСЛОВИЯХ  
ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ НЕФТЯНЫМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ**

© А.С. Григориади, Г.Г. Багаутдинова

В статье представлены результаты исследования влияния биопрепарата «Метаболит», полученного на основе экстракта биологически активных веществ гриба-ассоцианта облепихи *Scopulariopsis acremonium*, на комплекс микромицетов в ризосфере и филлосфере сахарной свеклы в условиях нефтяного загрязнения. Под посевами сахарной свеклы численность микромицетов снижалась в 2 раза, а в ризосфере – на 30% по сравнению с нефтезагрязненными образцами почвы. Из числа всех видов, обнаруженных в загрязненной почве под посевами растений, 70% представляли собой потенциальную опасность. Доминирующими видами оказались *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*. В ризосфере сахарной свеклы после обработки биопрепаратом частота встречаемости доминантных видов значительно снижалась, так же, как и снизилась частота встречаемости большинства представителей рода *Aspergillus*, являющихся патогенами сахарной свеклы. На поверхности листьев растений, произрастающих в условиях нефтяного стресса, наибольшим разнообразием видов характеризовался род *Fusarium*. Использование биопрепарата приводило к снижению частоты встречаемости фитопатогенных грибов в микоценозе филлосферы. Отмечалось снижение индекса Шеннона на 20-25% при обработке биопрепаратом «Метаболит» в филлосфере и ризосфере растений, что свидетельствует об упрощении видового состава микромицетов.

С учетом результатов количественного и качественного анализа микоценоза препарат «Метаболит», вероятно, обладает антифугальной активностью. Предпосевная обработка семян растений способствовала снижению фитотоксичности загрязненной почвы и улучшению фитосанитарного состояния посевов. Также было показано, что препарат способствует ускорению деградации нефтяных углеводородов под посевами на 16%.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, биопрепарат «Метаболит», сахарная свекла, ризосфера, филлосфера, фитотоксичные микромицеты.

Одним из приоритетных направлений сельского хозяйства является экологизация растениеводства. Однако в условиях всеобъемлющего техногенеза получение экологически чистой продукции, не содержащей пестицидов и микотоксинов, представляет собой сложную задачу. Особое место среди поллютантов, представляющих опасность для сельскохозяйственных растений, занимают нефтяные углеводороды. Это связано, в первую очередь, с масштабностью ис-

пользования топлива на основе нефти, во-вторых, с непосредственным токсическим действием поллютанта, и, в-третьих, с действием нефти на комплексы микромицетов, способных приводить к различным заболеваниям растений.

В настоящее время среди технологий экологизации земледелия наиболее перспективным считается применение микробных препаратов. Препараты, созданные на основе живых микроорганизмов или их метаболитов, обладают ро-

---

ГРИГОРИАДИ Анна Сергеевна – к.б.н., Башкирский государственный университет,

e-mail: Nyshal11@yandex.ru

БАГАУТДИНОВА Гульназ Галимовна – к.б.н., Башкирский государственный университет,

e-mail: gulnazbag@rambler.ru

стимулирующими свойствами, имеют анти-стрессовую и иммуномодулирующую активность, в том числе повышают устойчивость растений к фитопатогенной инфекции [1, 2]. Особое место занимают препараты, основанные на симбиотических микроорганизмах. Растения взаимодействуют с множеством микроорганизмов, особенно на границе корневой системы и почвы, эти микроорганизмы могут по-разному влиять на растение. Ассоциированные с растением сообщества микроорганизмов способствуют усилению сопротивляемости растений к вторжению возбудителей и ограничению образования патогенных ассоциаций, а также могут стимулировать рост растений и усвоение ими питательных веществ [3, 4]. Так как обработка растений биопрепаратами способствует повышению микробного разнообразия ризосферы, то возникает предположение, что их использование позволит ускорить процесс деградации нефтяных углеводородов. Однако в литературе отсутствуют данные об эффективности применения микроорганизмов-симбионтов или их метаболитов при выращивании сельскохозяйственных растений на нефтезагрязненных почвах.

Целью данной работы явилась оценка влияния биопрепарата «Метаболит» на микологический комплекс под посевами сахарной свеклы в условиях нефтяного загрязнения.

**Материалы и методы.** Полевые исследования проводились на площадках размером 25м<sup>2</sup> в 4-х кратной повторности. Почва - чернозем выщелоченный. В качестве объектов исследования использовали почву из под растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris L*, var. *saccharifera*). Семена перед посевом обрабатывали 0,001% раствором биопрепарата «Метаболит», который представляет собой природный экстракт биологически активных веществ микромицета-ассоцианта *Scopulariopsis acremonium* (Delacr.) Vuill., выделенного из корней трехлетней культуры облепихи (*Hippophae rhamnoides*). В контрольных вариантах опыта семена замачивали в дистиллированной воде. Через 60 суток после всходов растений сахарной свеклы часть опытных делянок искусственно загрязняли нефтью в

концентрации 6,1/100г и затем проводили дополнительное опрыскивание биопрепаратом. Выделение микромицетов проводили по общепринятой методике посева почвенной суспензии на подкисленную агаризованную среду Чапека [5]. При изучении структуры комплекса почвенных грибов исследовали качественный состав микроорганизмов с учетом встречаемости видов и коэффициента разнообразия Шеннона [6].

**Результаты и их обсуждение.** Эффективность использования биопрепарата в качестве стимулятора нефтедеструкции была доказано химическим анализом. К концу вегетации растений (через 130 сут) содержание остаточных нефтепродуктов под растениями сахарной свеклы составляло 41% и 25% в вариантах без обработки и соответственно с обработкой биопрепаратом семян и посевов от первоначальной концентрации поллютанта.

Нефтяное загрязнение стимулировало развитие микроскопических грибов под посевами сахарной свеклы, что проявилось в увеличении их численность в ризосфере в 2,7 раз, а в эдафосфере – на 70% по сравнению с контрольными необработанными почвенными образцами (рис. 1). Обработка препаратом приводила к существенному снижению данного показателя. Под посевами сахарной свеклы численности микромицетов восстанавливалась до контрольных значений, а в ризосфере – снижалась на 30% по сравнению с нефтезагрязненными образцами почвы. Следует отметить, что во всех вариантах опыта наблюдался ризосферный эффект [7].

Изучение качественного состава микоценоза сахарной свеклы позволит косвенно оценить снижение негативного влияния нефтяного загрязнения под воздействием препарата «Метаболит». Фитопатогенные и оппортунистические виды микромицетов обладают высокой устойчивостью к действию антропогенных факторов, они способны вытеснять чувствительных представителей, которые, зачастую, не оказывают неблагоприятное влияние на растения, и занимать их место в структуре сообщества [8].

Из ризосферы сахарной свеклы, подвергшейся влиянию нефтяного загрязнения, было

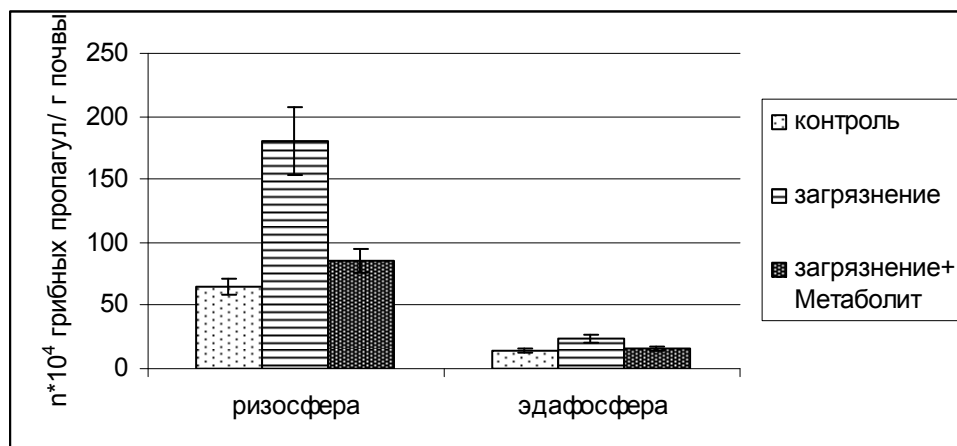


Рис. 1. Численность микромицетов в ризосфере и эдафосфере сахарной свеклы после обработки биопрепаратов в условиях нефтяного загрязнения

выделено 45 вид микроскопических грибов, из них 32 вида были идентифицированы как представители родов *Aspergillus* (13), *Penicillium* (14), *Fusarium* (5). Значительно меньшим количеством видов оказались представлены роды *Trichoderma*, *Alternaria*. Остальные роды были представлены единично встречающимися колониями. Доминирующими видами оказались *Asp. niger*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, и все они относятся к группе фитопатогенов. Из числа всех идентифицированных видов 70% представляли потенциальную опасность для растений, так как в литературе описаны их токсические свойства [9]. Виды *Penicillium glabrum*, *P. restrictulosum*, *P. steckii*, *P. godlewskii*, *P. velutinum*, *F. merismoides*, *Chrysosporium sp.* встречались исключительно в нефтезагрязненных пробах почвы. Эти грибы, по-видимому, могут участвовать в утилизации нефти или просто оказались устойчивы к загрязнению. Увеличение частоты встречаемости видов рода *Penicillium* было связано с их высокой спорулирующей способностью, что в сообществе почвенных микроорганизмов создает предпосылки для интенсивного токсинообразования.

Обработка семян и растений сахарной свеклы биопрепаратом «Метаболит» способствовала изменению структуры комплекса микроскопических грибов. Было отмечено, что происходило существенное снижение частоты встречаемости фузариий, они из группы доминантных видов перешли в группу типично ред-

ких. В ризосфере сахарной свеклы также снизилась частота встречаемости большинства аспергиллов, являющихся патогенами сахарной свеклы. Типично частые виды *Asp. flavus*, *Asp. fumigatus*, *Asp. glaucus*, *Asp. glawatus*, *Asp. ochraceus*, *Asp. oryzae*, *Asp. restrictus*, *Asp. terreus* стали относиться к группе типично редких в пробах почв, загрязненных нефтью и обработанных биопрепаратом. Исключением явился вид *P. simplicissimum*, частота встречаемости которого при обработке препаратом увеличилась. Расчет индекса Шеннона показал, что в условиях нефтяного стресса при обработке семян и растений сахарной свеклы «Метаболитом» наблюдалось снижение величины этого показателя на 20%, что свидетельствует об упрощении видовой структуры комплекса микромицетов. С учетом результатов количественного анализа микоценоза препарат «Метаболит», вероятно, обладает антифугальной активностью. Схожие данные были получены Н.В. Безлером при обработке семян и растений бактериальным препаратом, обладающим антагонистической активностью в отношении фитопатогенных микроскопических грибов [10].

Кроме корней микроскопические грибы могут поражать надземные органы растений, поэтому особый интерес представляет изучение видового состава микромицетов в филлосфере (на поверхности листьев) растений сахарной свеклы. Из филлосферы сахарной свеклы было выделено значительно меньше видов грибов,

Т а б л и ц а 1

*Видовое разнообразие микромицетов в филлосфере сахарной свеклы при обработке биопрепаратом*

Виды	Нефть	Нефть + «Метаболит»
<i>Acremonium</i> sp. D. Hawksw.	ТР	ТР
* <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	ТЧ	С
* <i>Aspergillus flavus</i> Link.	ТР	ТР
* <i>A. brasiliensis</i> Varga, Frisvad & Samson.	ТЧ	ТР
* <i>Asconita betae</i>	ТЧ	-
* <i>Cercospora beticola</i> Sacc.	ТЧ	С
<i>Cladosporium avenaceum</i>	ТР	С
* <i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Sm.) Sacc.	ТЧ	С
* <i>F. herbarum</i> (Corda) Fr.	ТР	С
* <i>F. oxysporum</i> E.F. Sm. & Swingle	ТЧ	С
* <i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	ТЧ	С
<i>Mortierella lignicola</i> (G.W. Martin) W. Gams & R. Moreau	ТР	-
* <i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	ТР	С
* <i>Oidium erysipoides</i>	ТЧ	ТР
* <i>Pleospora betae</i> Björl., Bot.	ТЧ	С
* <i>Pythium</i> sp. B. Paul	ТЧ	ТР
* <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.	ТР	С
<i>Talaromyces luteus</i> (Zukal) C.R. Benj.	ТР	ТР
* <i>Thanatephorus cucumeris</i> (A.B. Frank) Donk.	ТЧ	ТР
* <i>Trichoderma koningi</i> Oudem.	ТР	С

*Примечание:* « - » - вид не обнаружен; \* - фитотоксичный вид.

чем из ризосферы, что обусловлено естественными причинами. Наибольшей видовой представленностью в филлосфере свеклы характеризовался род *Fusarium* (табл. 1), что свидетельствует о возможности инфицирования этими микроорганизмами как корнеплодов, так и в дальнейшем, семян растений.

Обработка семян и растений сахарной свеклы биопрепаратом «Метаболит» способствовала уменьшению доли фитопатогенных грибов в микоценозе филлосферы, что является результатом снижения частоты встречаемости фитопатогенов. В таблице 1 видно, что практически все виды стали в сообществе случайными. Также отмечалось снижение индекса Шеннона на 25% при обработке биопрепаратом «Метаболит» в филлосфере, т.е. как и в ризосфере, происходило упрощение видового состава микромицетов.

**Заключение.** В результате нашего исследования, было показано, что в условиях нефтяного стресса увеличилась доля фитотоксичных видов в ризосфере корней растений, что согласуется с данными других авторов [8, 11]. Обработка семян и растений сахарной свеклы «Метаболитом» способствовала снижению фитотоксичности загрязненного чернозема за счет уменьшения численности почвенных грибов, снижения видового разнообразия фитопатогенных представителей микромицетов в ризосфере за счет их выпадения из сообщества или снижения частоты встречаемости. Это, в конечном счете, повышает устойчивость растений к условиям нефтяного стресса, улучшает фитосанитарное состояние посевов и повышает устойчивость растений к поражению гнилью в условиях нефтяного загрязнения. Также было показано,

что активация микробиологических процессов в почве при использовании биопрепарата на 16% ускорила разложение нефтяных углеводородов в почве.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гельцер Ф.Ю. Симбиоз с микроорганизмами – основа жизни растений. М.: МСХА, 1990. 134 с.
2. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus Cohn* в агроэкосистемах. М.: Наука, 2007. 150 с.
3. Шкалик В.А., Дьяков Ю.Т. Иммунитет растений.– М.: Колос, 2005. 190 с.
4. Яблонская Е.К. Применение экзогенных элиситоров в сельском хозяйстве // Научный журнал КубГАУ. 2015. №109(05). С.1-10.
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии. /Под. ред. Д.Г.Звягинцева. М.: МГУ, 1991. 304с.
6. Мифтахова А.М., Киреева Н.А., Бакаева М.Д. Экология почвенных микромицетов. Уфа: РИО БашГУ, 2005. 104 с.
7. Шапошников А.И., Белимов А.А., Кравченко Л.В., Виванко Д.М. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2011. №3. С. 16-22.
8. Марфенина О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов. М.: Медицина для всех, 2005. 196 с.
9. Билай В.И., Курбачкая З.А. Определитель токсинообразующих микромицетов. Киев: Наукова Думка, 1990. 236 с.
10. Безлер Н.В. Агробиологические аспекты использования физиологически активных веществ и биопрепаратов в посевах сахарной свеклы // Автореф. дисс...докт. биол. н. Рамонь: ВНИИ СС и С. 2008. 47с.

11. Назаров А.В., Иларионов С.А. Изучение причин фитотоксичности нефтезагрязненных почв // Альтернативная энергетика и экология. 2005. №1. С. 60-65.

#### Reference

1. Geltzer F.U. Symbiosis with microorganisms - the basis of plant life. M.: ICCA. 1990. 134 p. (In Russian).
2. Melentiev A.I. Aerobic spore-forming bacterium *Bacillus Cohn* in agroecosystems. Moscow: Nauka. 2007. 150 p. (In Russian).
3. Shkalikov V.A., D'yakov YU.T. Immunity of plants. M.: Kolos, 2005. 190 p. (In Russian).
4. Yablonskaya Ye.K. Application of exogenous elicitors in agriculture // Nauchnyy zhurnal KubGAU. 2015. №109(05). P.1-10. (In Russian).
5. Methods of soil microbiology and biochemistry /Pod. red. D.G.Zvyagintseva. M.: MGU, 1991. 304 p. (In Russian).
6. Miftakhova A.M., Kireyeva N.A., Bakayeva M.D. Ecology of soil micromycetes. Ufa: RIO BashGU, 2005. 104 p. (In Russian).
7. Shaposhnikov A.I., Belimov A.A., Kravchenko L.V., Vivanko D.M. Interaction of rhizosphere bacteria with plants: mechanisms of formation and factors of the effectiveness of associative symbioses (review) // Agricultural Biology. 2011. №3. P. 16-22. (In Russian).
8. Marfenina O.Ye. Anthropogenic ecology of soil fungi. M.: Meditsina dlya vsekh, 2005. 196 p. (In Russian).
9. Bilay V.I., Kurbatskaya Z.A. The determinant of toxin-forming micromycetes. Kiyev: Naukova Dumka, 1990. 236 p. (In Russian).
10. Bezler N.V. Agrobiological aspects of the use of physiologically active substances and biological products in crops of sugar beets // Thesis of Doctor of Biological Sciences. Ramon: Research Institute of the SS and AS .2008. 47 p. (In Russian).

---

### EFFECT OF BIOLOGICAL PRODUCT “METABOLITE” ON MYCOLOGICAL COMPLEXES IN RHIZOSPHERE AND FILLOPHFERE OF THE SUGAR BEET IN THE CONDITIONS OF SOIL POLLUTION BY OIL HYDROCARBONS

© A.S. Griroriadi, G.G. Bagautdinova

Bashkir State University,  
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

The article presents the results of investigations of the influence biologic product “Metabolite”, derived from an extract of biologically active substances of the association fungus *Scopulariopsis acremonium*, on a complex of micromycetes in rhizosphere and fillosphere of sugar beet in the conditions of oil pollution. In the soil under the sugar beet plants the number of micromycetes decreased 2 times, and in the rhizosphere their number decreased by 30% in comparison with oil contaminated soil samples. Of all the species found in contaminated soil under plant crops, 70% of them were a potential hazard. The dominant species were *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*. In the rhizosphere of sugar beet after treatment with a bioproduct, the frequency of occurrence of dominant species was significantly reduced. Similarly, the incidence of most representatives of the genus *Aspergillus*, which are pathogens of sugar beet, has decreased. On the surface of the leaves of plants that grow under conditions of oil stress, the *Fusarium* genus was the largest variety of species. The use of bioproducts resulted in a decrease in the frequency of occurrence of phytopathogenic fungi in the phyllosphere. There was a decrease in the Shannon index by 20-25% after processing with the bioproduct “Metabolite” in the phyllosphere and rhizosphere of plants, which indicates the simplification of the species composition of micromycetes.

Taking into account the results of quantitative and qualitative analysis of mycocenosis, the product “Metabolite” probably possesses antifungal activity. Pre-treatment of seeds of plant has reduced the phytotoxicity of polluted soil and improve the phytosanitary condition of the crops. It was also shown that the bioproduct helps to accelerate the degradation of petroleum hydrocarbons under crops by 16%.

Key words: oil pollution, biological product “Metabolite”, sugar beet, rhizosphere, fillosphere, phytotoxic micromycetes.



УДК 57.013:612.1

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-108-112

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА  
МОРФОЛОГИЮ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ СТРЕССЕ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ  
ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

© А.В. Дерюгина, А.Г. Самоделкин, М.Н. Иващенко, П.С. Игнатьев,  
А.А. Белов, М.Н. Таламанова

Исследована морфология эритроцитов в норме и при стрессе и изучено влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на поверхностную архитектуру эритроцитов методом лазерной интерференционной микроскопии. Анализ интерферограмм интактных эритроцитов соответствовал фазовому портрету дискоцитов. Характеризовался равномерной клеточной мембраной, малым числом ее локальных повреждений, равномерным внутриклеточным распределением гемоглобина. У стрессированных животных наблюдались существенные сдвиги соотношения дискоцитов и патологических форм эритроцитов в сторону увеличения последних. После воздействия стресса диаметр клеток и толщина в области краев уменьшались, а размер центральной зоны увеличивался, имелась неравномерность распределения уровня гемоглобина в примембранных слоях. Лазерное излучение не изменяло микрорельеф поверхности эритроцитов. Воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения на фоне стресса приводило к восстановлению морфологии и размера эритроцитов к первой неделе эксперимента.

Ключевые слова: лазерная интерференционная микроскопия, эритроциты, стресс, низкоинтенсивное лазерное излучение.

**Введение.** Система крови служит надежным клиническим показателем для оценки состояния организма, а изучение морфологии эритроцитов при различной патологии представляет большой интерес, потому что они участвуют в процессах гомеостаза всего организма. Выявление и коррекция функциональных морфологических и биохимических изменений в эритроцитах при стрессе имеет существенное

значение, как в теоретическом, так и практическом аспектах для изучения последствий чрезвычайных раздражений на уровне клеток [1].

Лазерная терапия – высокоэффективный метод лечения, который вот уже более 30 лет успешно развивается как вполне самостоятельное направление современной медицины. В основе эффекта низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) лежит комплексное неспецифическое

ДЕРЮГИНА Анна Вячеславовна – д.б.н., Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: derugina69@yandex.ru

САМОДЕЛКИН Александр Геннадьевич – д.б.н., Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, e-mail: kafedra2577@mail.ru

ИВАЩЕНКО Марина Николаевна – к.б.н., Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, e-mail: mi11207@rambler.ru

ИГНАТЬЕВ Павел Сергеевич – к.ф.-м.н., Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова, e-mail: ignasha2000@yandex.ru

БЕЛОВ Андрей Александрович, Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, e-mail: andrey.raven@gmail.com

ТАЛАМАНОВА Мария Николаевна – к.б.н., Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: manjatal@ya.ru

действие на организм, когда местные изменения вызывают смену уровня функционирования биосистем за счет формирования защитно-адаптивной реакции. Несмотря на широкое применение НИЛИ, до настоящего времени, практически отсутствует детальная картина морфологических изменений эритроцитов при стрессе и при воздействии НИЛИ.

Особый интерес представляет сопоставление физиологических и биохимических данных с морфометрическими, так как размеры и форма эритроцитов являются существенными факторами, определяющими динамику оксигенации-деоксигенации гемоглобина, и играют заметную роль в деформируемости, фильтруемости и, элиминации их из сосудистого русла. Важным является формирование новых методов исследования морфологии эритроцитов для развития диагностики и терапии заболевания, внедрение сложного научно-технического оборудования, в том числе лазерной интерференционной микроскопии.

В литературе имеется сравнительно мало работ, посвященных анализу свойств нефиксированных эритроцитов, что объясняется трудностями исследования живых клеток. Традиционные методы анализа размеров эритроцитов, как правило, позволяют получать усредненные данные, что делает невозможным оценку внутренней структуры популяции эритроцитов. Даже такие современные методы исследования как электронная микроскопия, требуют фиксации клеток, что приводит к определенному изменению их истинных размеров и значительно затрудняет изучение эритроцитов в динамике.

Методы лазерной интерференционной микроскопии лишены описанных недостатков и позволяют исследовать живые клетки, проводить оценку состояния эритроцитов в динамике по таким важнейшим параметрам как форма и размеры, масса и концентрация плотных веществ в клетке [2].

Указанное явилось основанием для исследования морфологии эритроцитов в норме и при стрессе и изучения влияния НИЛИ на поверхностную архитектуру эритроцитов.

**Материалы и методы исследования.** Исследование проведено на 24 нелинейных белых

половозрелых крысах массой 180–200 г. Животных содержали в виварии, оборудованном согласно требованиям «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» №1045-73. Опыты проводили в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г., ФЗ РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 и с нормативными документами, представленными в руководстве «Guide for care and use of laboratory animals. ILAR publication, 1996, National Academy Press».

Было сформировано 4 группы: животные первой группы служили контролем (интактные), животные второй группы подвергались воздействию НИЛИ, у животных третьей группы моделировали стресс, путем внутрибрюшинного введения адреналина в концентрации 0,1 мг/кг, животным четвертой группы - вводили адреналин в концентрации 0,1 мг/кг, а затем через 30 минут облучали НИЛИ.

В качестве источника излучения применяли аппарат лазерный терапевтический «Успех» (ГП «Восход»), работающий в импульсном режиме, с длиной волны излучения 0,8-0,9 мкм, частотой следования импульсов 415 Гц, минимальное значение плотности средней мощности излучения в плоскости выходного окна аппликатора 193 мкВт/кв.см. Воздействие проводилось на затылочную область в течение 10 минут. Забор крови производили через час, сутки и неделю после начала эксперимента из подъязычной вены.

Топографию поверхности эритроцитов изучали методом лазерной модуляционной интерференционной микроскопии в микроскопе МИМ-340 (Екатеринбург, Россия).

Статистическая обработка проводилась с помощью пакета программ BIOSTAT и Microsoft Excel. Для оценки достоверности различий между группами использован t-критерий Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

**Результаты и обсуждение.** Анализ интерферограмм интактных эритроцитов характеризовался практически равномерной клеточной

*Размер эритроцитов в исследуемых группах крыс*

Группа животных	Время	Нормоциты (7-7,7 мкм)	Микроциты (менее 6 мкм)	Макроциты (более 8 мкм)
Интактные	1 час	85,0±0,7	7,0±1,1	8,0±0,7
	1 сутки	82,0±1,3	8,50±1,1	9,5±1,1
	1 неделя	82,5±1,7	8,50±0,4	9,0±1,4
НИЛИ	1 час	85,0±0,7	8,5±0,7	6,5±1,7
	1 сутки	80,5±1,0	9,5±1,0	10,0±1,1
	1 неделя	86,5±0,3*	6,0±1,0*	7,5±0,3*
Адреналин	1 час	34,0±0,7 *	53,5±1,0 *	12,5±1,7*
	1 сутки	54,50±5,30*	35±3,53*	10,50±1,3
	1 неделя	77,0±1,4*	14,5 ±0,3*	8,5±1,1
Адреналин + НИЛИ	1 час	30,0±1,1*	55,5±1,6*	14,5±0,4*
	1 сутки	56,0±4,2 *	31,0±3,8*	13,0±1,1*
	1 неделя	81,0±1,4	9,5±1,0	8,0±0,7

*Примечание:* \*  $p < 0,05$  по отношению к интактной группе

мембраной, малым числом ее локальных повреждений, равномерным внутриклеточным распределением гемоглобина, что соответствует фазовому портрету дискоцитов. Функциональные возможности таких эритроцитов максимальны.

При сравнении фазового портрета эритроцитов, полученных от интактных животных и эритроцитов, полученных от стрессированных животных, были выявлены изменения размеров клеток, топографии и рельефа поверхности мембраны эритроцитов.

У стрессированных животных спустя час наблюдались существенные сдвиги соотношения дискоцитов и патологических форм эритроцитов в сторону увеличения последних. После стрессового воздействия диаметр клеток и толщина в области краев уменьшались, а размер центральной зоны увеличивался, имелась неравномерность распределения уровня гемоглобина в примембранных слоях. С первого часа регистрировался выраженный анизоцитоз, который сохранялся к первым суткам, при этом количество нормоцитов не достигало уровня интактной группы и к первой неделе эксперимента (табл.1).

Патологически измененные эритроциты вызывают нарушение микроциркуляции, вязкости в

магистральных сосудах, а также образование микроагрегатов в микрососудах, что влечет микроэмболию с нарушением функции жизненно важных органов.

В группе, где на стрессированный организм осуществлялось воздействие НИЛИ, увеличение количества морфологически измененных эритроцитов регистрировалось на протяжении первых суток исследования, с последующим восстановлением морфологии эритроцитов к первой неделе эксперимента, в отличие от действия адреналина, при котором измененные формы эритроцитов сохранялись и к первой неделе исследования (табл.2). Размеры эритроцитов так же восстанавливались к первой неделе эксперимента (табл.1).

Лазерное излучение не изменяло микрорельеф поверхности эритроцитов, при сканировании образцов эритроцитов, полученных после воздействия НИЛИ обнаружены в основном нормоциты (табл. 1, 2).

Таким образом, стрессовое воздействие определило существенное изменение морфологии и размеров эритроцитов. В свою очередь, действие НИЛИ на фоне адреналина вызывало замедление эхиноцитарной и стаматоцитарной

Типы эритроцитов интактных крыс и крыс, подвергшихся стрессу  
( $M \pm m$  при  $n=6$ )

Группа	Время после воздействия	Типы эритроцитов, %			
		Дискоциты	Эхиноциты	Стоматоциты	Дегенер. измененные
Интактные	1 час	86,0 $\pm$ 0,7	11,0 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,4
	1 сутки	83,5 $\pm$ 0,4	13,0 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,1
	1 неделя	82,5 $\pm$ 1,6	12,5 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 1,1	1,5 $\pm$ 0,4
НИЛИ	1 час	85,0 $\pm$ 0,7	11,0 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,70	1,0 $\pm$ 0,6
	1 сутки	83,0 $\pm$ 0,3	14,0 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 0,3
	1 неделя	86,5 $\pm$ 0,3	10,5 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,3*
Адреналин	1 час	36,5 $\pm$ 2,4*	40,0 $\pm$ 2,1*	19,0 $\pm$ 0,6*	4,5 $\pm$ 0,3*
	1 сутки	54,5 $\pm$ 2,6*	35,0 $\pm$ 2,3*	7,0 $\pm$ 1,4*	3,5 $\pm$ 0,3*
	1 неделя	69,0 $\pm$ 1,4*	22,5 $\pm$ 0,3*	6,0 $\pm$ 0,7*	2,5 $\pm$ 0,3*
Адреналин+ НИЛИ	1 час	28,0 $\pm$ 2,1*	54,5 $\pm$ 1,5*	13,5 $\pm$ 1,6*	4,0 $\pm$ 0,4*
	1 сутки	57,5 $\pm$ 2,6*	32,0 $\pm$ 2,8*	6,5 $\pm$ 1,1*	4,0 $\pm$ 1,4*
	1 неделя	81,5 $\pm$ 1,4	11,5 $\pm$ 0,7	5,0 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 0,4

Примечание: \*  $p < 0,05$  по отношению к значениям интактной группы

трансформации эритроцитов, восстанавливая размер клеток, что наиболее выражено к первой неделе эксперимента.

Поддержание форм эритроцитов в виде двояковогнутого диска обеспечивает наиболее оптимальный уровень газообмена. Нарастание полиморфизма эритроцитарной популяции, появление в периферической крови патологических форм эритроцитов является не случайным фактором, а отражает нарушение основных констант периферической крови, гомеостаза организма и выступает одновременно в качестве причины и следствия нарушения структуры мембраны и метаболизма эритроцитов. Известно, что образование сферизованных форм указывает на нарушение осмотического баланса эритроцитов, связанного с выходом гемоглобина и нарастанием предгемолитического состояния [3].

Возрастание патологических форм эритроцитов, в группе с введением адреналина, можно объяснить изменением структуры мембран вследствие взаимодействия ее рецепторов со стресс-реализующим гормоном – адреналином. Повышенный уровень адреналина и адренореак-

тивность эритроцитов приводят к ингибированию Na,K-АТФ-азы и, соответственно, к накоплению кальция в цитозоле эритроцита, меняющего характер межмолекулярных взаимодействий. Известно, адреналин модифицирует состав электрофоретических полос эритроцитарной мембраны, снижая относительное содержание полос 3, 6 и 7 и увеличивая содержание белка полосы 2, 3. Активация адренорецепторов вызывает повышение уровня цАМФ в клетке и стимулирует протеинкиназы, которые в свою очередь, вызывают фосфорилирование белков полос 3, 4,1, 4,9, спектрина, анкирина, аддуцина. Результатом является морфофункциональная перестройка клеток крови [4].

Механизм НИЛИ-индуцированного действия на морфологию эритроцитов может быть связан с регулирующим действием на активность фотоакцепторных молекул. Эритроциты как порфириносодержащие клетки являются акцепторами лазерного излучения [5]. Кроме того, показано что при действии НИЛИ происходит оптимизация активности протеинкиназы С [6]. В свою очередь, активация протеинкиназ и

фосфорилирование белков цитоскелета увеличивает деформируемость мембран [7].

Восстановление морфологии и размеров эритроцитов до значений интактной группы при действии НИЛИ после стресса, свидетельствует о повышении пластической способности мембраны эритроцитов, стрессированных животных. Это, в свою очередь, обеспечивает нормализацию микроциркуляторного русла и более выраженное восстановление физиологических параметров крови.

*«Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-016-00195».*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Катюхин Л.Н. Функционально биохимические изменения эритроцитов крыс при стрессе: Автореф. дисс. канд. биол. наук. Ленинград. 1984. 20 с.
2. Игнатьев П.С. Лазерная интерференционная микроскопия морфологии и динамики биологических

объектов в реальном времени: автореф. дисс. канд. физ.-мат. наук. Москва. 2011. 24 с.

3. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Плескова С.Н., Калинин В.А. Апоптозный характер гемолиза эритроцитов, индуцированный малыми дозами ионизирующей радиации // Биофизика. 2015. Т. 60, вып. 1. С. 102-108.

4. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Плескова С.Н. Электрофоретическая подвижность и морфометрия эритроцитов крыс при стрессовых воздействиях // Современные технологии в медицине. 2010. №4. С. 23-26.

5. Козлов В.И. Механизмы лазерной фотобиостимуляции // Морфологические ведомости. 2010. №4. С. 7-14.

6. Zhang L., Xing D., Zhu D., Chen Q. Low-power laser irradiation inhibiting Abeta25-35-induced PC12 cell apoptosis via PKC activation // Cell Physiol. Biochem. 2008. №22. P. 215-222.

7. Wojcicki W.E., Beth A.H. Structural and binding properties of the stilbenedisulfonate sites on erythrocyte bands 3: an electron paramagnetic resonance study using spin-labeled stilbenedisulfonates // Biochem. 1993. V.32, №36. P. 9454-9464.

### EVALUATION OF THE EFFECT OF LOW-INTENSITY LASER RADIATION ON MORPHOLOGY RED BLOOD CELLS UNDER STRESS BY LASER INTERFERENCE MICROSCOPY

© A.V. Deryugina<sup>1</sup>, A.G. Samodelkin<sup>2</sup>, M.N. Ivashchenko<sup>2</sup>, P.S. Ignatiev<sup>3</sup>,  
A.A. Belov<sup>2</sup>, M.N. Talamanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Research Nizhny Novgorod State University Lobachevsky,  
63, prospekt Gagarina, 603950, Nizhny Novgorod, Russian Federation

<sup>2</sup>Nizhny Novgorod State Agricultural Academy,  
97, prospekt Gagarina, 603107, Nizhny Novgorod, Russian Federation

<sup>3</sup>Ural optical-mechanical plant. After E. S. Yalamov,  
33 B, ulitsa Vostochnaya, 620100, Ekaterinburg, Russian Federation

The morphology of red blood cells in normal and stress conditions was studied and the effect of low-intensity laser radiation on the surface architectonics of red blood cells was studied by laser interference microscopy. The analysis of interferograms of intact erythrocytes corresponded to the phase portrait of discocytes. It was characterized by uniform cell membrane, small number of its local damages, uniform intracellular distribution of hemoglobin. In stressed animals was observed significant shifts in the ratio of discocytes and pathological forms of erythrocytes in the direction of increasing the latter. After exposure to stress, the diameter of the cells and thickness in the region of the edges decreased, and the size of the Central zone increased, there was an uneven distribution of hemoglobin in primemembrane layers. Laser radiation did not change the microrelief of the surface of red blood cells. The effect of low-intensity laser radiation on the background of stress led to the restoration of morphology and size of red blood cells by the first week of the experiment.

Key words: laser interference microscopy, erythrocytes, stress, low-intensity laser radiation.

УДК 575.174:599.9

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-113-116

**ГАПЛОГРУППА J2a-M410 В СУБЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ БАЛКАРЦЕВ  
ПО ДАННЫМ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО РАЗНООБРАЗИЯ**

© М.А. Джаубермезов, Н.В. Екомасова, С.С. Литвинов, Э.К. Хуснутдинова

Проведён анализ генетического разнообразия популяции балкарцев проживающих в центральной части Северо-Кавказского региона по данным о Y-STR (Short tandem repeats). По результатам генотипирования выявлено 15,3% населения относящиеся к гаплогруппе J2a-M410. В ходе изучения распространения данной гаплогруппы в субэтнических группах балкарцев было показано высокое ее содержание в группе малкарцев, где она составила 20,6% от разнообразия гаплогрупп Y-хромосомы. В группе безенгиевцев частота данной гаплогруппы снижается до 18,4%, среди чегемцев встречается у 13,5% населения, среди холамцев у 10,7%, в популяции баксанцев – 9,5%. Нами проведено гаплотипирование образца относящегося к гаплогруппе J2a-M410. В результате построения медианной сети была показано удаление чегемцев и части малкарцев от остальных изученных образцов принадлежащих к гаплогруппе J2a-M410.

Ключевые слова: балкарцы, чегемцы, Y-хромосома, Y-STR, J2a-M410, медианная сеть.

**Введение.** Балкарцы проживают в центральной части Северного Кавказа в его горных и предгорных районах и тем самым являются одним из самых высокогорных тюркских народов в мире. Являясь коренным населением Кабардино-Балкарской республики, они подразделяются на 5 этнотерриториальных групп (баксанцы, чегемцы, холамцы, безенгиевцы и малкарцы). По данным переписи 2010 года численность балкарцев в России составляет 112,9 тыс. человек [1]. Генофонд балкарцев был подвергнут всестороннему изучению с использованием как однородительских, так и аутосомных маркеров [2-7]. К сожалению, большинство из этих исследований было проведено при помощи маркеров Y-SNP с довольно низким филогенетическим разрешением, а также с отсутствующими данными Y-STR. Так, среди известной ранее, но детально не

изученной гаплогруппы в данной популяции является гаплогруппа Y-хромосомы J2a-M410.

В связи с этим главной целью настоящего исследования является всестороннее изучение гаплогруппы J2a-M410 в субэтнических группах балкарцев с использованием как маркеров Y-SNP, так и Y-STR с последующим изучением степени родства между ними.

**Материалы и методика исследования.** Материалом для исследования служили образцы ДНК субэтнических групп балкарцев выделенные из цельной крови неродственных индивидов. Забор крови осуществлялся после подписания информированного согласия на участие в научном исследовании у мужчин достигнувших 18-летнего возраста и заполнивших анкеты с указанием предков до третьего поколения.

ДЖАУБЕРМЕЗОВ Мурат Алиевич – Башкирский государственный университет,

e-mail: murat-kbr@mail.ru

ЕКОМАСОВА Наталья Вадимовна – к.б.н., Башкирский государственный университет,

e-mail: trofimova\_nata\_@mail.ru

ЛИТВИНОВ Сергей Сергеевич – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: seregtg@gmail.com

ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: elzakh@mail.ru

Т а б л и ц а 1

*Микросателлитное разнообразие образца относящегося к гаплогруппе J2a*

Маркер	Значение	Маркер	Значение	Маркер	Значение
DYS19	14	DYS437	15	DYS549	13
DYS385	12-15	DYS438	9	DYS570	15
DYS389 I	14	DYS439	11	DYS576	14
DYS389 II	30	DYS448	20	DYS635	22
DYS390	24	DYS456	17	DYS643	11
DYS391	10	DYS458	17	YGATAH4	9
DYS392	11	DYS481	22		
DYS393	12	DYS533	11		

Забор венозной крови производили в местах компактного проживания балкарцев, а именно в Чегемском, Черекском, Эльбрусском районах и г.Нальчик Кабардино-Балкарской. Также для построения медианной сети была задействована открытая база данных Y-STR коммерческой компании familytreedna [8].

*Диаллельные маркеры.* Для определения гаплогрупп Y хромосомы и проведения дальнейшей работы с образцами, относящимися к гаплогруппе J, были проанализированы такие маркеры нерекombинирующей области Y-хромосомы как: 12f2, M172 и M410. Гаплогруппы Y-хромосомы определялись согласно Karafet с соавторами 2008 [9]. Исследование полиморфизма диаллельных локусов Y-хромосомы производилось с использованием ПЦР с последующим ПДРФ анализом. ПДРФ анализ проводился с помощью соответствующих рестриктаз «Fermetas» (Литва) и «СибЭнзим» (Россия). При их отсутствии анализ проводился методом секвенирования.

Микросателлитные локусы (DYS19, DYS385, DYS389 I, DYS389 II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS481, DYS533, DYS549, DYS570, DYS576, DYS635, DYS643, YGATAH4) были проанализированы на секвенаторе Applied Biosystems 3730xl.

23 Y-STR были генотипированы с использованием системы PowerPlex®Y23 (Promega). Каждый образец амплифицировали в 5 мкл объема, содержащего 1 мкл Reaction Mix, 0,5 мкл PowerPlex®Y23 10X Primer Pair Mix и 0,5 мкл

ДНК. Использовали следующие условия амплификации: начальную денатурацию проводили при 96°C в течение 2 мин, 30 циклов амплификации: 94°C в течение 10 с, 61°C в течение 1 мин и при 72°C - 30 с. с последующим 20-ти минутным удержанием при 60°C и конечными 4°C. Образцы готовили для разделения и анализа путем добавления 0,5 мкл разбавленного в соотношении 1:20 амплифицированного образца, 9,5 мкл Hi-Fi™ Formamide и 0,35 мкл CC5 Internal Lane Standard 500 (ILS), а также добавляли 1 мкл allelic ladder («аллельная лестница»).

*Статистические методы.* Программное обеспечение GeneMapper®ID, версия 3.0 (Life Technologies™) использовалось для определения размеров фрагментов. Эволюционные деревья генерировали при помощи Network 4.6.

**Результаты.** Гаплогруппа J является одной из основных в популяциях Кавказа. Возникнув в Передней Азии, где наблюдается её самая высокая частота и разнообразие линий, наблюдается снижение частоты по направлению к Ирану, Центральной Азии, Кавказу, Индии, Средиземноморью и Северной Африке [10]. Нами было выявлено, что частота гаплогруппы J2a-M410 особенно велика в субпопуляции малкарцев, где составляет 20,6%, а в общем, по балкарцам составляет 15,3%.

Для определения характера взаимосвязи гаплотипов J2a-M410 в выборке балкарцев мы построили медианную сеть по данным Y-STR (рис.1) полученных в результате гаплотипирования наших образцов (табл.1), с привлечением

- Аварец
- Малкарцы
- Безенгиевцы
- Балкарцы (не определен)
- Чегемцы

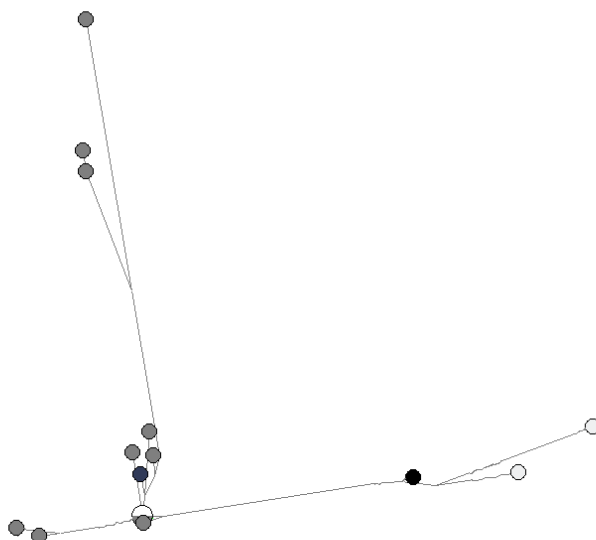


Рис. 1. Медианная сеть по данным STR-гаплотипов гаплогруппы J2a-M410

результатов открытой базы данных familytreedna. Образцы, принадлежащие к субпопуляциям балкарцев за исключением чегемцев и части малкарцев, оказались крайне схожи и при построении медианной сети (рис.1.) формировали общий генетический кластер. Небольшое удаление части малкарцев и чегемцев свидетельствует о значительном микросателлитном разнообразии в изученной популяции балкарцев. Интересно, что наиболее близким по данным микросателлитного разнообразия образцом к группе чегемцев оказался образец относящийся к аварской национальности.

**Выводы.** Как уже было отмечено, частота гаплогруппы J2a-M410 в популяции балкарцев составила 15,3%. В субэтнических группах балкарцев показано высокое ее содержание в группе малкарцев, где данная гаплогруппа составила 20,6% от всего разнообразия гаплогрупп Y-хромосомы. В группе холамцев частота гаплогруппы J2a-M410 снижается до 18,4%, среди чегемцев встречается у 13,5% населения, среди холамцев у 10,7%, в популяции баксанцев –

9,5%. Обнаружено небольшое удаление части малкарцев и чегемцев от основной массы образцов, что свидетельствует о значительном микросателлитном разнообразии в изученной популяции балкарцев. Также при детальном изучении микросателлитного разнообразия генотипированного нами образца с гаплогруппой J2a-M410 было выявлено его принадлежность к находящейся ниже в филогенетическом древе гаплогруппе J2a-M67.

*Работа поддержана программой поддержки биоресурсных коллекций (Коллекция биологических материалов человека ИБГ Уфимский федеральный исследовательский центр РАН).*

*Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (17-44-020748 p\_a), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Биологическое разнообразие”.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. <http://www.gks.ru>
2. Bulayeva K, Jorde L, Ostler C, Watkins S, Bulayev O, Harpending H. Genetics and population history



of Caucasus populations. *Hum. Biol.* 2003. V. 75(6). P. 837-853.

3. Roostalu U, Kutuev I, Loogvali E-L, Metspalu E, Tambets K, Reidla M, et al. Origin and Expansion of Haplogroup H, the Dominant Human Mitochondrial DNA Lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian Perspective. *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. № 2. P. 436-448. doi: 10.1093/molbev/msl173

4. Yunusbayev B., Metspalu M., Jarve M., Kutuev I., Rootsi S., Metspalu E., et al. The Caucasus as an asymmetric semipermeable barrier to ancient human migrations // *Mol. Biol. Evol.* 2012. V. 29. №1. P. 359-365. doi: 10.1093/molbev/msr221

5. Khusnutdinova EK, Litvinov SS, Kutuev IA, Yunusbayev B, Khusainova RI, Akhmetova VL, et al. Gene pool of ethnic groups of the Caucasus: Results of integrated study of the Y chromosome and mitochondrial DNA and genome-wide data. *Rus. J. Genetics.* 2012. V. 48. №. 6. С. 640-650.

6. Схаляхо Р. А. Тюрки Кавказа: сравнитель-

ный анализ генофондов по данным о Y-хромосоме // Вестник Московского университета. Серия XXIII. Антропология. 2013. № 2. С. 34-48.

7. Кутуев И.А., Литвинов С.С., Хусаинова Р.И., Юнусбаев Б.Б., Виллемс Р., Хуснутдинова Э.К. Генетическая структура и молекулярная филогеография популяций Кавказа по данным Y-хромосомы // *Медицинская генетика.* 2010. Т. 9. № 3. С. 18 - 25.

8. [www.familytreedna.com](http://www.familytreedna.com)

9. Karafet T. M., Mendez F. L., Meilerman M. B., Underhill P.A., Zegura S.L., Hammer M.F. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree // *Genome Res.* 2008. V. 18. № 5. P. 830-838. doi: 10.1101/gr.7172008

10. Semino O., Magri C., Benuzzi G. et al. Origin, Diffusion, and Differentiation of Y-Chromosome Haplogroups E and J: Inferences on the Neolithization of Europe and Later Migratory Events in the Mediterranean Area // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V.74. P. 1023-1034.



## HAPLOGROUP J2A -M410 IN SUB-ETHNIC GROUPS OF BALKARS ACCORDING TO MICROSATELLITE DIVERSITY

© M.A. Dzhaubermezov<sup>1</sup>, N.V. Ekomasova<sup>1</sup>, S.S. Litvinov<sup>2</sup>, E.K. Khusnutdinova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State University,

32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of RAS,

71, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

An analysis of the genetic diversity of the population of Balkars living in the central part of the North Caucasus region was carried out according to data on Y-STR (Short tandem repeats). According to the results of genotyping, 15.3% of the population belonging to haplogroup J2a-M410 was identified. During the study of the distribution of this haplogroup in sub-ethnic groups of Balkars, its high content in the Malkar group was shown, where it was 20.6% of the variety of haplogroups of the Y chromosome. In the group of Bezengievs, the frequency of this haplogroup is reduced to 18.4%, among the Chegems is found in 13.5% of the population, among Holams in 10.7%, in the Baksan population - 9.5%. We performed a haplotyping of the sample related to haplogroup J2a-M410. As a result of the construction of the median network, the removal of the Chegems and parts of the Malkar from the remaining samples belonging to the haplogroup J2a-M410 was shown.

Key words: Balkars, Chegems, Y-chromosome, Y-STR, J2a-M410, the median network.

**ПАМЯТИ УЧЕНОГО**

---

---

**ПАМЯТИ ИБРАГИМОВА РИНАТА ИСМАГИЛОВИЧА**



**01.08.1956 - 21.08.2018**

Скорпостижно ушел из жизни Ринат Исмагилович Ибрагимов — доктор биологических наук, профессор, Заслуженный деятель науки Республики Башкортостан, Почетный работник высшего профессионального образования Российской Федерации

Ибрагимов Ринат Исмагилович родился в д. Зайпекуль Миякинского района Башкирской АССР в семье учительницы и агронома, ветерана войны. После окончания средней школы поступил на биологический факультет Башгосуниверситета. Еще в студенческие годы он серьезно увлекся биохимией и свою дипломную работу подготовил в г. Ленинграде, во Всесоюзном НИИ растениеводства имени

Н.И. Вавилова (ВИР). После окончания университета в 1978 году был распределен в Отдел биохимии и цитохимии БФАН СССР.

В 1989 году начал работать в Башкирском государственном университете. С 2000 по 2017 гг. был заведующим кафедрой биохимии и биотехнологии, одновременно в течение 12 лет возглавлял биологический факультет (2001-2013 гг.).

Ринат Исмагилович пользовался огромным авторитетом в научном сообществе Российской Федерации, сотрудничал с университетами и научными центрами Беларуси, Украины, США и других стран. Основные направления его научной деятельности были связаны с изучением физиолого-биохимических и молекулярных механизмов устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов среды. Он является автором более 400 научных трудов и более десятка изобретений, руководителем многочисленных исследовательских грантов.

Ринат Исмагилович вкладывал много сил в дело подготовки научных кадров, под его руководством защищено 10 кандидатских диссертаций.

Неоценима роль Рината Исмагиловича как ученого-исследователя, организатора и координатора научных исследований и образовательного процесса на биологическом факультете. Во многом благодаря его авторитету и поддержке на биологическом факультете успешно функционирует диссертационный совет, где он являлся заместителем председателя, ведущим экспертом по направлению «Физиология и биохимия растений». Отличаясь широтой научного кругозора и аналитическим умом, всегда мог предложить ценные замечания и советы соискателям.

Рината Исмагиловича отличали неизменная доброжелательность, оптимизм, отеческое отношение к студентам, аспирантам и начинающим преподавателям. Будучи мудрым наставником, готовым оказать помощь в любой ситуации, он, вместе с тем, проявлял исключительную принципиальность и порядочность в руководстве факультетом и кафедрой. Его целеустремленность, жизнерадостность, активность, умение находить компромиссные решения в сложных ситуациях были для нас примером.

Безвременный уход Рината Исмагиловича стал трагедией для семьи, родных и близких, коллег, учеников. Светлые воспоминания о прекрасном человеке, педагоге, ученом и руководителе навсегда останутся в нашей памяти.

Коллектив кафедры биохимии и биотехнологии  
Башкирского государственного университета

# ИЗВЕСТИЯ УФИМСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

2018. № 3(1)

ISSN 2222-8349

*Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС77-41859 выдано 27 августа 2010 г. Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)*

Научный журнал  
Основан в 2010 году  
Выходит 4 раза в год

Индекс в каталоге «Пресса России» 42156

18+

*Учредителем журнала является  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Уфимский федеральный исследовательский центр  
Российской академии наук (УФИЦ РАН)*

*Главный редактор:*

М.А. Ильгамов, чл.-корр. РАН

*Редакционная коллегия:*

В.А. Вахитов, д.б.н., Ю.В. Вахитова, чл.-корр. РАН, Д.А. Гайнанов, д.э.н.,  
А.С. Гаязов, чл.-корр. РАО, Х.Н. Гизатуллин, чл.-корр. РАН,  
У.М. Джемилев, чл.-корр. РАН, Е.Н. Dowell, professor, USA,  
A.V. Kabanov, professor, USA, Т.К. Korpela, professor, Finland, А.Н. Лачинов, д.ф.-м.н.,  
А.И. Мелентьев, д.б.н., Р.Р. Мулюков, чл.-корр. РАН, В.В. Напалков, чл.-корр. РАН,  
Р.И. Нигматулин, академик, В.Н. Павлов, чл.-корр. РАН, А.В. Псянчин, д.г.н.,  
В.Н. Пучков, чл.-корр. РАН, Г.С. Розенберг, чл.-корр. РАН,  
В.М. Тимербулатов, чл.-корр. РАН, А.Г. Толстиков, чл.-корр. РАН,  
А. Tropsha, professor, USA, С.Ф. Урманчеев, д.ф.-м.н., В.М. Фомин, академик,  
Ф.Г. Хисамитдинова, д.ф.н., Э.К. Хуснутдинова, чл.-корр. РАО,  
Г.Л. Шарипов, д.х.н., З.Х. Шигапов, д.б.н., Е.С. Шиховцева, д.ф.-м.н.,  
М.С. Юнусов, академик, А.Б. Юнусова, д.и.н.

Адрес редакции: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71, каб. 207.

Телефон: (347) 284-64-33.

E-mail: [izvestia@ufaras.ru](mailto:izvestia@ufaras.ru)

URL: <http://www.sciencerb.ru>

Ответственный секретарь: Н.В. Милицкая

Верстка: Т.И. Лукманов

## Правила для авторов

В журнале «Известия Уфимского научного центра РАН» (далее Журнал) публикуются статьи по следующим научным направлениям:

- МАТЕМАТИКА и МЕХАНИКА
- ФИЗИКА
- ХИМИЯ
- БИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ и ГЕНЕТИКА
- МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЕ
- НАУКИ о ЗЕМЛЕ
- ИСТОРИЯ, АРХЕОЛОГИЯ, ЭТНОЛОГИЯ
- ЭКОНОМИКА, СОЦИОЛОГИЯ, ФИЛОСОФИЯ
- ЯЗЫКОЗНАНИЕ и ЛИТЕРАТУРОВЕДЕНИЕ

Дополнительные рубрики:

- КНИЖНОЕ ОБОЗРЕНИЕ
- ИСТОРИЯ В ЛИЦАХ
- ПОРТРЕТ УЧЕНОГО
- ЮБИЛЕЙ
- ПАМЯТИ УЧЕНОГО
- ОФИЦИАЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

*Порядок оформления статей.* Объем для статей гуманитарного профиля – не более 10 страниц, для естественно-научных – не более 8 страниц, оформленных в соответствии с настоящими Правилами. Для обзорных статей допускается превышение указанного количества страниц.

В редакцию Журнала должны быть присланы в электронном виде по электронной почте текст статьи, сканированные копии Направления от организации, Экспертного заключения (образцы заполнения – на сайте Журнала). Название статьи, ФИО авторов, сведения об авторах, ключевые слова и по возможности аннотация на английском языке прилагаются отдельным файлом. Статьи могут быть представлены на русском или английском языках. Статья должна быть тщательно отредактирована. Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Аббревиатуры включаются в текст лишь после их первого упоминания с полной расшифровкой. В аббревиатурах использовать заглавные буквы. Все статьи направляются на рецензирование специалистам в данной области знаний.

*Техническое оформление статей:* Статья представляется в формате Microsoft Word. Допустимые расширения для файлов \*.doc, \*.rtf. Параметры страницы: А4, верх – 2 см, низ – 2 см, правое – 2 см, левое – 2 см; от края до колонтитула – 2 см. Шрифт Times New Roman. Кегль шрифта – 12. Межстрочный интервал 1,5. Отступ первой строки абзаца – 1,25. Все страницы должны иметь сквозную нумерацию. Кегль шрифта для аннотаций, ключевых слов и примечаний – 11.

*Оформление ссылок на литературу.* При оформлении библиографических ссылок, в том числе на электронные ресурсы удаленного доступа, следует придерживаться **ГОСТ Р 7.05.-2008**. Литература указывается по порядку цитирования в тексте. В научной статье количество ссылок на источники – не более 10. В обзорной статье количество ссылок на источники литературы не ограничено. Просьба авторам, по возможности, повторить список литературы, используя латинский алфавит (References). При этом статьи из журналов, имеющих переводные версии, необходимо приводить с указанием названия статьи на английском языке, журнала и выходных данных (том, номер, страницы). Для оптимизации навигации в сайтовом гипертексте в соответствии с рекомендациями Министерства образования и науки РФ по подготовке и оформлению научных статей в журналах, индексируемых в международных наукометрических базах данных, редакция рекомендует выделять нужные ссылки графически, шрифт – подчеркиванием. Гиперссылкой может стать любой элемент текста, включая изображение.

*Оформление таблиц, формул, рисунков.* Данные, представленные в таблицах, не должны дублировать данные рисунков и текста, и наоборот. Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер, заголовки должны точно соответствовать содержанию граф. На каждую таблицу должна быть сделана ссылка в статье. Все разъяснения, включая расшифровку аббревиатур, даются в сносках. Рисунки должны быть продублированы в виде отдельных файлов. Допустимые форматы – TIF и JPEG. Режим – градиент серого или битовый, разрешение не более 400 пикс/дюйм. Диаграммы – в EXCEL или WORD. Рисунки должны быть пронумерованы и подписаны. Ссылки на них в тексте обязательны. Подрисуночные подписи представить отдельным файлом с обозначением фамилии автора и названия статьи, указанием номера рисунка, с объяснением значения всех кривых, букв, цифр и других условных обозначений. В тексте статьи следует указать место, где следует разместить рисунок или таблицу, и порядковый номер.

Избыточность иллюстративного материала может повлечь за собой возвращение статьи авторам для доработки на предмет сокращения. Количество рисунков и таблиц должно соответствовать объему представляемой информации.

Формулы должны выполняться в математическом редакторе и в случае необходимости должны быть пронумерованы. Их длина не должна превышать 80 мм. Простые формулы требуется набирать в виде текста с соблюдением правил разбора математических выражений. Сложные формулы набирают в виде объектов редактора MS Equation 3.0. Настройки редактора формул: Full – 11pt; Subscript/Superscript – 7pt; Sub-subscript – 5pt; Symbol – 18pt; Sub-symbol – 12pt. Греческий, русский и цифры – прямо. Латинский – курсивом, за исключением устойчивых сочетаний cos, sin, const, max, min. Смешение символов из текстовых редакторов с символами из редактора формул не допускается. Масштаб формул не уменьшать, разбивка не умецающей в строку мат. формулы на части по строкам осуществляется в первую очередь на знаках отношения между левой и правой частями формул (=, ≈, <, >, <=, >=): во вторую – на отточии, знаках сложения и вычитания; в третью – на знаке умножения в виде косога креста. Знак, на котором формула разбивается при переносе, остается в конце строки и повторяется в начале следующей.

На титульной странице статьи указать: УДК, название статьи, ФИО авторов, представить аннотацию к статье не менее 250 слов, ключевые слова (не более 8 слов), далее – текст статьи. Образец оформления статьи – на сайте Журнала.

Подписано в печать 14.09.2018.  
Формат А4, 208×280 мм. Бумага офсетная.  
Гарнитура «Таймс» Печать цифровая.  
Усл. п. л. 12,0. Уч.-изд. л. 13,7.  
Тираж 50 экз. Заказ № \_\_\_\_\_  
Свободная цена

Адрес издателя: 450098, Россия, РБ,  
г. Уфа, бульвар Давлеткильдеева, д. 5/2

Отпечатано с готового оригинал-макета

\_\_\_\_\_  
Адрес: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_