

2018. № 3(5)

**ИЗВЕСТИЯ
УФИМСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

СОДЕРЖАНИЕ

№ 3(5). 2018

БИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ И ГЕНЕТИКА

- О.В. Раскоша*
Оценка устойчивости клеток щитовидной железы полевков-экономок, обитающих в разных радиоэкологических условиях после дополнительных воздействий, методом ДНК-комет 5
- С.Р. Рахматуллина*
Влияние нитропруссид натрия на морфофизиологические и биохимические показатели у растений пшеницы *Triticum aestivum* L. при добавлении в питательную среду кадмия 12
- С.Д. Румянцев, С.В. Веселова, Е.А. Черепанова, И.В. Максимов*
Устойчивость различных видов пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond. 18
- З.Р. Саитова, Р.Г. Фархутдинов, В.В. Федяев, М.И. Гарипова, И.А. Шпирная, А.А. Ямалеева*
Влияние оксида серы (VI) на физиолого-биохимические процессы у лишайника *Physcia stellaris* (L.) Nyl. города Стерлитамак и его окрестностей 25
- Ю.В. Синицына, Я.В. Середнева, Е.А. Кальясова, А.П. Веселов*
Влияние комбинированного действия низкочастотного переменного магнитного поля и гипертермии на уровень гидропероксидов и ростовые реакции растений гороха 30
- А.Г. Соловьева, Н.В. Диденко, К.Л. Беляева*
Оценка энергетического и окислительного метаболизма крови при длительном курсе ингаляций оксида азота в эксперименте 36
- Н.В. Терлецкая, В.Ю. Ступко, А.Б. Исакова, Н.В. Зобова, Н.А. Гаевский*
Фотоморфогенез эмбрионных каллусов пшеницы в условиях эдафических стрессов 43
- И.Л. Трофимова, Н.И. Енукашвили, Т.В. Кузнецова*
Особенности прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях человека 52
- О.В. Турковская, Н.Н. Позднякова*
Особенности использования грибов в экологических биотехнологиях 60
- В.В. Федяев, Р.Г. Фархутдинов, И.А. Массалимов, В.О. Цветков, З.И. Шарипова, И.А. Ярмухаметова, Р.Н. Латыпов, А.А. Ямалеева*
Влияние полисульфида кальция на ростовые и физиолого-биохимические процессы растений пшеницы 67

Л.А. Халилова, Ю.В. Орлова, О.В. Майорова, Н.А. Мясоедов, Л.Г. Попова, Ю.В. Балнокин Морфофизиологический анализ мутанта ARA7 <i>Arabidopsis thaliana</i> в условиях солевого стресса.....	74
В.О. Цветков, И.А. Шпирная, В.О. Максимова, Р.И. Ибрагимов Определение активности амилаз и протеаз с использованием субстратов, иммобилизованных в поликриламидном геле.....	81
А.В. Чемерис, Н.А. Рожнова, Г.А. Геращенко Некоторые недавние улучшения методов геномного редактирования	86
О.А. Чурикова, А.А. Криницына Некоторые особенности развития сирени в медленно растущей культуре <i>in vitro</i>	94
М.А. Шелякин, И.Г. Захожий, Т.К. Головкин Изменение дыхания и соотношения дыхательных путей при адаптации лишайников к действию УФ-В радиации	100
А.А. Шульгина, Е.А. Калашикова, И.Г. Тараканов Зависимость морфогенеза <i>Stevia rebaudiana</i> <i>in vitro</i> от факторов различной природы	105
Л.Ф. Юсупова, А.Х. Нургулиева, И.Р. Гилязова, Д.С. Прокофьева, Ф.Р. Мунасыпов, Ш.М. Хуснутдинов, Р.Р. Рахимов, Д.Д. Сакаева, Э.К. Хуснутдинова Исследование ассоциации аллелей и генотипов полиморфного варианта rs16260 гена <i>CDH1</i> с риском развития рака желудка	110
Л.Г. Яруллина, Г.Ф. Бурханова, А.В. Сорокань, В.О. Цветков, Р.И. Ибрагимов, И.В. Максимов Влияние салициловой и жасмоновой кислот на активность ингибиторов гидролитических ферментов в растениях картофеля при инфицировании <i>Phytophthora infestans</i>	117

CONTENTS

2018. № 3(5)

BIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND GENETICS

- O.V. Raskosha*
Estimation of stability of thyroid gland cells of tundra voles living in different radioecological conditions after additional exposure, using the “DNA-comet” assay 5
- S.R. Rakhmatullina*
Sodium nitroprussidum’s influence on morphophysiological and biochemical indicators of *Triticum aestivum* L. wheatsprouts while adding it into nutrient cadmium medium 12
- S.D. Rumyantsev, S.V. Veselova, E.A. Cherepanova, I.V. Maksimov*
The resistance of different wheat species to greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond..... 18
- Z.R. Saitova, R.G. Farkhutdinov, V.V. Fedyaev, M.I. Garipova, I.A. Shpirnaya, A.A. Yamaleeva*
Effect of sulfur oxide (VI) on the physiological-biochemical processes of the *Physcia stellaris* (L.) Null. cities of Sterlitamak and its vicinities 25
- Yu.V. Sinitsyna, Ya.V. Seredneva, E.A. Kal’yasova, A.P. Veselov*
Influence of combined action of low-frequency alternating magnetic field and hyperthermia on the level of hydroperoxides and growth reactions of pea plants 30
- A.G. Soloveva, N.V. Didenko, K.L. Belyaeva*
The evaluation of biochemical parameters of rats blood during long inhalation application of different concentrations of nitric oxide 36
- N.V. Terletsкая, V.Yu. Stupko, A.B. Iskakova, N.V. Zobova, N.A. Gaevsky*
Photomorphogenesis of wheat embryogenic calli under edaphic stress conditions 43
- I.L. Trofimova, N.I. Erukashvily, T.V. Kuznetzova*
Peculiarities of 1qh, 9qh, 16qh regions of human chromosome from extraembryonic and embryonic tissues 52
- O.V. Turkovskaya, N.N. Pozdnyakova*
Peculiarities of the application of fungi in the environmental biotechnology..... 60
- V.V. Fedyaev, R.G. Farkhutdinov, I.A. Massalimov, V.O. Tsvetkov, Z.I. Sharapova, I.A. Yarmuhametova, R.N. Latypov, A.A. Yamaleeva*
The influence of calcium polysulphide on morphological and physiological-biochemical processes of wheat plants..... 67

<i>L.A. Khalilova, Y.V. Orlova, O.V. Majorova, N.A. Myasoedov, L.G. Popova, Y.V. Balnokin</i>	
Morpho-physiological analysis of an <i>Arabidopsis thaliana</i> ARA 7 mutant under salt stress	74
<i>V. Tsvetkov, I. Shpirnaya, V. Maksutova, R. Ibragimov</i>	
Determination of the activity of amylases and proteases using substrate-immobilized polyacrylamide gel	81
<i>A.V. Chemeris, N.A. Rozhnova, G.A. Gerashchenkov</i>	
Some recent improvements in genome editing techniques	86
<i>O.A. Churikova, A.A. Krinitsina</i>	
Some special features of lilac development in slow growth culture in vitro.....	94
<i>M.A. Shelyakin, I.G. Zakhozhiy, T.K. Golovko</i>	
Changes of total respiration and respiratory pathways ratio in lichens adaptation to UV-B radiation	100
<i>A.A. Shulgina, E.A. Kalashnikova, I.G. Tarakanov</i>	
The effect of various factors on the morphogenesis of <i>Stevia rebaudiana</i> in vitro.....	105
<i>L.F. Yusupova, A.Kh. Nurgalieva, I.R. Gilyazova, D.S. Prokofyeva, F.R. Munasypov, Sh.M. Khusnutdinov, R.R. Rakhimov, D.D. Sakaeva, E.K. Khusnutdinova</i>	
The study of the association of alleles and genotypes of polymorphic variant of the promoter region of the <i>CDH1</i> gene with the risk of developing gastric cancer	110
<i>L. Yarullina, G. Burkhanova, A. Sorokan, V. Tsvetkov, R. Ibragimov, I. Maksimov</i>	
The influence of salicylic and jasmonic acids on the activity of inhibitors of hydrolytic enzymes in potato plants during infection of <i>Phytophthora infestans</i>	117

УДК 539.16.04:599.323.4-144.4:575

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-5-11

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОЛЕВОК-ЭКОНОМОК, ОБИТАЮЩИХ В РАЗНЫХ РАДИОЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ ПОСЛЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ, МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ

© О.В. Раскоша

В статье представлены данные об оценке уровня цитогенетических нарушений с помощью нейтральной версии метода «ДНК-комет» в эпителиальных клетках щитовидной железы (ЩЖ) половозрелых самцов полевок-экономок (65 особей), отловленных в природных условиях на участках с нормальным (10-15 мкР/ч) и повышенным радиационным фоном (50-1200 мкР/ч), с учетом модифицирующего действия дополнительных факторов. Применение химической (паракват, 2 мг/кг массы тела) и радиационной (острое облучение, доза 3 Гр) нагрузок позволило обнаружить различия в ответной реакции генома клеток ЩЖ животных, обитающих в разных радиологических условиях; хроническое облучение полевок способствует высокой устойчивости тироцитов к провокационному действию этих факторов. Уретановая интоксикация (1 мг/г массы тела) вызывает сходные цитогенетические нарушения, проявляющиеся в повышении доли клеток с высокой фрагментацией ДНК в клетках ЩЖ контрольных и облученных животных (в 2.5 и в 4.5 раза, соответственно).

Ключевые слова: хроническое воздействие, ионизирующее излучение, малые дозы, дополнительные воздействия, мышевидные грызуны, щитовидная железа, метод «ДНК-комет».

В настоящее время серьезную озабоченность вызывает состояние территорий, загрязненных радиоактивными отходами, так как долгоживущие естественные радионуклиды поступают в окружающую среду, включаются в циклы биогенной миграции и оказывают хроническое воздействие на процессы жизнедеятельности организмов. В процессах адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды приоритетное место принадлежит щитовидной железе (ЩЖ), гормоны которой влияют практически на все органы и ткани организма. Ранее было показано, что у полевок-экономок, обитающих на территориях с повышенным содержанием радионуклидов и подвергшихся длительному действию малых доз внутреннего и внешнего облучения, изменяются морфологические показатели активности ЩЖ и повышается частота тироцитов с микроядрами [1]. Определение уровня цитогенетических нарушений в соматических

клетках животных является важной частью радиологического мониторинга территорий с повышенным радиационным фоном. Для анализа степени повреждений ДНК клеток разных тканей, вызванных факторами окружающей среды, в последнее время широко используется метод «ДНК-комет», имеющий ряд преимуществ по сравнению с другими методами оценки поврежденности ДНК (высокая чувствительность, возможность регистрации повреждений ДНК в клетках любых тканей *in vivo*, минимальное количество требуемого экспериментального материала, относительно низкая стоимость, высокая «пластичность»). Отмечают, что особую актуальность детекция повреждений в структуре ДНК приобретает на ранних этапах, когда патологические процессы в организме еще не запущены и, соответственно, не могут быть диагностированы на физиологическом уровне [2]. Ранее при анализе

степени повреждений ДНК в клетках ЩЖ у линейных мышей при моделировании радиационного воздействия в малых дозах метод «ДНК-комет» зарекомендовал себя как чувствительный и информативный [3].

Для изучения устойчивости экосистем и организмов, обитающих в условиях антропогенных воздействий, перспективным представляется с помощью нагрузочных тестов выявление резервного потенциала органов и тканей животных, находящихся под воздействием неблагоприятных факторов среды, что определяет готовность организма адекватно реагировать на новое непредвиденное воздействие. Цель настоящего исследования состояла в оценке уровня цитогенетических нарушений с помощью метода «ДНК-комет» в клетках ЩЖ мышевидных грызунов, подвергнутых хроническому воздействию ионизирующего излучения в малых дозах в природных условиях с учетом модифицирующего действия дополнительных факторов химической и радиационной природы.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали 65 самцов половозрелых полевок-экономок (*Alexandromys oeconomus* Pall.) из природных популяций (зона средней тайги, Ухтинский район Республика Коми). Характерные для этого вида мышевидных грызунов пониженная миграционная способность и активная роющая деятельность упрощают проведение полевых радиэкологических работ. Полевок отлавливали на участках с нормальным (10-15 мкР/ч, 1.5 га) и повышенным (50-1200 мкР/ч, 2 га) уровнем радиационного фона, находящихся в одной климатической зоне в период их максимальной численности. Относительную численность зверьков оценивали по количеству пойманных зверьков на 100 ловушко-суток, продолжительность отлова на каждом участке составила 4-5 сут. Привезенных с участков животных содержали в «Научной коллекции экспериментальных животных Института биологии Коми НЦ УрО РАН» (<http://www.ckp-rf.ru/usu/471933/>). Участок с повышенным радиационным фоном образовался в

50-е года в результате длительного разлива из заброшенных незатампонированных скважин по поверхности почв радиоактивных пластовых вод сложного химического состава, содержащих преимущественно радий. По данным лаборатории миграции радионуклидов и радиохимии Института биологии Коми НЦ УрО РАН, удельная активность ^{226}Ra в почве этого участка значительно превышает среднее содержание радионуклида в почвах подобного типа и варьирует от 0.01 до 80 Бк/г. Суммарная поглощенная доза облучения для группы животных, обитающих на радиовом участке, изменялась от 1,2 до 24,0 сЗв/мес [4].

Для выявления резервных возможностей ЩЖ животных были использованы тесты с дополнительными воздействиями. В качестве химической нагрузки использовали уретан (этилкарбамат; Sigma-Aldrich, USA), который является канцерогеном-промотором [5] и неспецифический прооксидант – паракват (N,N'-диметил-4,4'-дипиридила дихлорида; Sigma-Aldrich, USA). Одной части полевок с контрольного и радиоактивно загрязненного участков внутрибрюшинно вводили раствор уретана в концентрации 1 мг/г массы тела (группа «уретан») или параквата – в концентрации 2 мг/кг массы тела животного (группа «паракват»). Интактные животные (группа – «без воздействия») аналогичным образом получали эквивалентное массе тела количество 0.9% раствора NaCl. Через 48 часов после химических воздействий всех животных выводили из эксперимента путем декапитации с последующим взятием материала для исследований. Для оценки эффективности провокационного острого облучения животных, привезенных с участков с нормальным и повышенным радиационным фоном, облучали в дозе 3 Гр на гамма-установке «Исследователь» с источником ^{137}Cs при мощности дозы 0.75 Гр/мин (группа «облучение»). Анализ генома клеток ЩЖ проводили через 4 часа после радиационного воздействия. Манипуляции с полевками осуществляли в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других

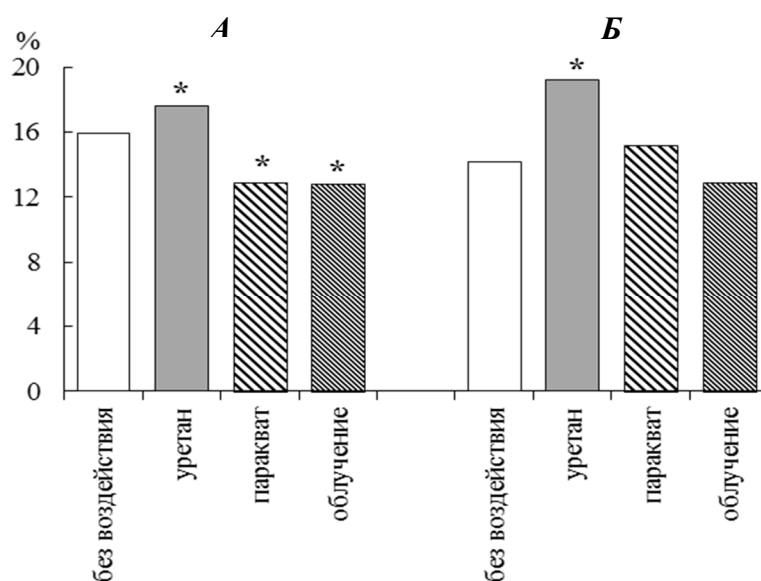


Рис. 1. Содержание ДНК в «хвосте кометы» (%TDNA) в клетках ЩЖ половозрелых полевок экономок, обитающих на участках с нормальным (А) и повышенным (Б) уровнем радиационного фона, и их модификация после дополнительных воздействий

Примечание: здесь и в таблице: * $p \leq 0.05$ – различия статистически значимо отличаются от группы «без воздействия».

научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.).

Суспензию клеток ЩЖ получали с помощью ферментативной диссоциации путем обработки ткани 0,25% раствором коллагеназы (Collagenase type IA, Sigma, USA). Подробно методика проведения микроядерного теста и метода ДНК-комет на клетках ЩЖ описана в работе [3]. Генетический материал окрашивали акридиновым оранжевым («Sigma», USA; 2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4). «ДНК-кометы» визуализировали под флуоресцентным микроскопом «Axioscop» (Carl Zeiss, Jena) с помощью видеосистемы на основе цифровой камеры «AxioCam» при флуоресцентном режиме (длина волны возбуждающего света составляла 450-490 нм, запирающий фильтр 510 нм). Обработку микрофотографий выполняли с помощью программного обеспечения «CometScore 1.5» (TriTek Corp., USA), анализировали по 50-100 «комет» на одно животное. Степень повреждения ДНК клеток ЩЖ определяли методом электрофореза ДНК при нейтральном pH [6], ко-

торый отражает изменения количества двунитевых разрывов ДНК (ДР ДНК) различной природы, как ферментативных, так и индуцированных различными повреждающими агентами, в том числе и свободными радикалами [7]. Рассчитывали среднее значение %TDNA, отражающее процент ДНК в «хвосте кометы» для группы животных, вычисляли средние значения частоты клеток с неповрежденной (практически не имеющие «хвоста кометы» или с небольшим «хвостом», диапазон 0-10%TDNA) и с высокофрагментированной ДНК (имеющие более 40% ДНК в «хвосте кометы»), а также ранжировали частоту распределения тироцитов в зависимости от процентного содержания ДНК в «хвосте кометы». Достоверность различий между сравниваемыми группами оценивали по t-критерию Стьюдента и U-критерию Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение. Анализ данных, полученных при изучении уровня ДР ДНК в клетках ЩЖ мышевидных грызунов, не показал статистически значимых различий между животными, обитающими в условиях повышен-

Содержание клеток с разной фрагментацией ДНК в ЩЖ половозрелых полевок-экономок, обитающих в разных радиоэкологических условиях, и их модификация после дополнительных воздействий

Участок отлова животных	Дополнительное воздействие (n)	Клетки с неповрежденной ДНК (диапазон 0-10)	Клетки с высоко фрагментированной ДНК (диапазон 41-100)
С нормальным радиационным фоном (10-15 мкР/ч)	Без воздействия (10)	41.1±1.7	3.8±0.7
	Уретан (8)	45.7±2.4	9.7±1.4*
	Паракват (8)	49.5±2.4	1.0±0.5*
	Облучение (8)	50.6±2.5*	2.0±0.7*
С повышенным радиационным фоном (50-1200 мкР/ч)	Без воздействия (10)	45.7±2.2	2.6±0.7
	Уретан (8)	41.1±2.5	11.8±1.6*
	Паракват (8)	47.4±2.2	4.0±0.9
	Облучение (5)	50.9±3.4	0.9±0.6

Примечание: n – количество животных.

ного и нормального радиационного фона (рис. 1). Оценка спонтанных и химически индуцированных уретаном изменений у полевок с контрольного участка свидетельствует об увеличении клеток с ДР ДНК в ЩЖ после введения уретана (%TDNA; $p \leq 0.05$). Результаты, представленные в таблице, показывают, что после уретановой интоксикации у этих животных в 2.5 раза повышается число тироцитов с высокой фрагментацией ДНК (диапазон %TDNA 41-100; $p \leq 0.05$). У полевок, обитающих на участке с повышенным уровнем ионизирующего излучения, после взаимодействия с уретаном число высоко фрагментированных тироцитов возрастает в 4.5 раза, что влияет, как и в контроле, на среднее значение %TDNA. Продемонстрированное на рисунке 2 распределение по классам клеток с учетом содержания ДНК в «хвосте кометы» позволяет более детально проследить сходство в ответной реакции ЩЖ на уретан у животных, обитающих в разных радиоэкологических условиях. Увеличение поврежденности ДНК служит сигналом для запуска генетически детерминированной программы, направленной на элиминацию клеток с нарушениями, не подлежащими восстановлению [8]. Следует отметить, что введение уретана в исследуемой концентрации

животным с обоих участков статистически значимо не влияет на долю клеток в ЩЖ с неповрежденной ДНК (диапазон %TDNA 0-10; табл. 1).

После воздействия на животных с обоих участков дополнительным химическим фактором – паракватом статистически значимые различия проявлялись только в ЩЖ контрольных особей и выражались в понижении среднего значения %TDNA (рис. 1) и доли высоко фрагментированных клеток (диапазон 41-100; табл. 1), что является подтверждением усиления эффективности репарационных процессов у полевок, обитающих в условиях нормального радиационного фона. Хроническое облучение животных в природных условиях не способствовало повышению чувствительности генетического аппарата клеток ЩЖ к действию параквата в исследуемой дозе.

По данным проведенного анализа, реакция генома клеток ЩЖ контрольных животных на острое облучение в дозе 3 Гр была аналогична с действием параквата (рис. 2). Более радиорезистентными при воздействии дополнительного острого облучения также оказались клетки ЩЖ полевок с опытного участка. Повышение устойчивости к действию дополнительных факторов у животных, испытывающих длительное воздействие

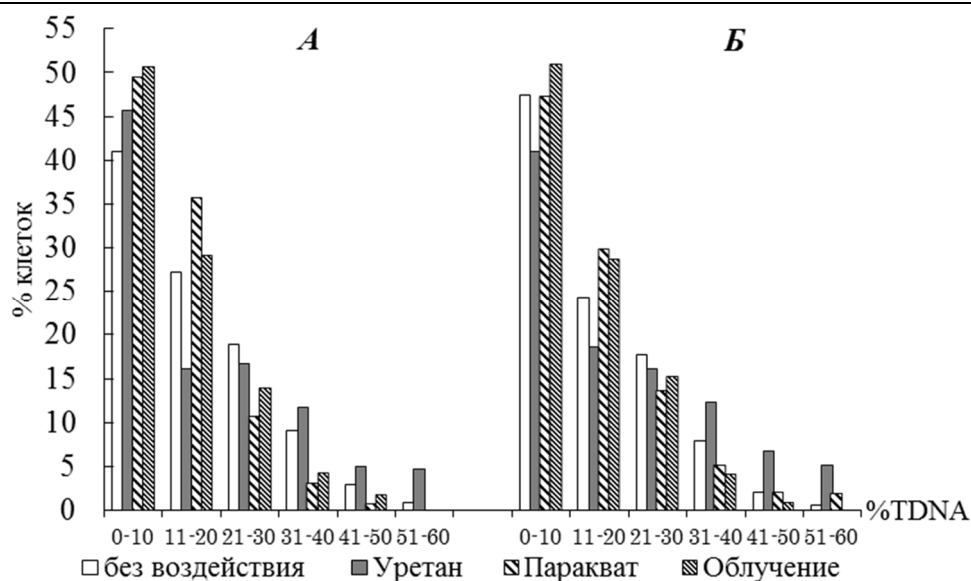


Рис. 2. Гистограмма распределения тироцитов по величине %TDNA в клетках ЩЖ половозрелых полевок экономок, обитающих на участках с нормальным (А) и повышенным (Б) уровнем радиационного фона, и их модификация после дополнительных воздействий

повышенной радиоактивности, описывается в ряде работ [9, 10]. Наблюдаемые в условиях проведенного эксперимента однонаправленные цитогенетические изменения в клетках ЩЖ животных на провокационное действие острого облучения и параквата обусловлены сходством механизмов, развивающихся в ответ на эти воздействия: в обоих случаях возникает окислительный стресс, при котором происходит чрезмерная выработка свободных радикалов.

Заключение. Применение дополнительных тест нагрузок химической (паракват) и радиационной (острое облучение) природы позволило обнаружить различия в реактивности клеток ЩЖ полевок-экономок, обитающих в условиях нормального и повышенного радиационного фона. Геном тиреоидных клеток животных, находящиеся в условиях хронического облучения, имел повышенную устойчивость к провокационным действиям острого облучения и параквата по сравнению с контрольными особями. Уретановая интоксикация вызывала сходные ответные реакции в клетках ЩЖ контрольных и облученных животных, приводящие в обоих случаях к увеличению их чувствительности. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что в условиях хронического облучения

животных в природной среде в течение нескольких поколений действует стабилизирующий отбор, направленный на элиминацию клеток, имеющих выраженные повреждения генетического материала и повышение эффективности репарации ДНК, что, в условиях проведенного исследования, проявлялось в зависимости вида используемой нагрузки. Использование для детекции и оценки степени повреждения ДНК клеток ЩЖ доступных и информативных методов, таких как «ДНК-комет», способствует более широкому их применению для раннего обнаружения напряженности в отдельных звеньях эндокринной системы и, таким образом, развитию прогностических направлений эколого-генетического мониторинга.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИБ Коми НЦ УрО РАН «Механизмы биогенной миграции радионуклидов и закономерности возникновения отдаленных последствий индуцированных у растений и животных в условиях хронического радиационного и химического воздействия» (№ АААА-А18-118011190102-7).

ЛИТЕРАТУРА

1. Раскоша О.В., Ермакова О.В., Павлов А.В.,

Кораблева Т.В. Морфометрические и цитогенетические исследования фолликулярного эпителия щитовидной железы мелких млекопитающих при хроническом облучении в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55. № 1. С. 63 – 70.

2. Филиппов Э.В. Использование метода «ДНК-комет» для детекции и оценки степени повреждений ДНК клеток организмов растений, животных и человека, вызванных факторами окружающей среды (обзор) // Наука и образование. 2014. № 2. С. 72 – 78.

3. Раскоша О.В. Оценка стабильности генома в клетках щитовидной железы мышей после хронического воздействия ионизирующего излучения в малой дозе, и у их потомков // Успехи современного естествознания. 2016. № 4. С. 48 – 52.

4. Тестов Б.В., Таскаев А.И. Накопление естественных радионуклидов в организме животных на участках с повышенной радиоактивностью // Техногенные элементы и животный организм. Свердловск. 1986. С. 23 – 26.

5. Vorobtsova I.E., Kitaev T.V. Urethane-induced lung adenomas in the first-generation progeny of irradiated male mice // Carcinogenesis. 1988.V. 9. P. 1931 – 1934.

6. Singh N.P. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells // Exs. Cell Res. 2000. V. 256. № 1. P. 328 – 337.

7. Воробьева Н.Ю., Осипов А.Н., Пелевина И.И. Чувствительность лимфоцитов периферической крови летчиков и космонавтов к воздействию γ -излучения; индукция двунитевых разрывов ДНК // Бюл. эксперим. биол. мед. 2007. Т. 144. № 10. С. 404 – 407.

8. Тронов В.А. Репарация ДНК и апоптоз // Цитология. 1999. Т. 41. № 5. С. 405 – 410.

9. Ильенко А.И., Крапивко Т.П. Экология животных в радиационном биогеоценозе. – М. 1989. – 224 с.

10. Ермакова О.В., Раскоша О.В. Состояние щитовидной железы полевок-экономок с радиоактивных территорий после дополнительных воздействий // Известия Самарского научного центра РАН. 2012. Т. 14. № 1(8). С. 1891 – 1893.

Korableva T.V. Morfometricheskiiya i tsitogeneticheskiiya issledovaniya follikul'yarnogo epiteliya shchitovidnoy zhelezy melkikh mlekopitayushchikh pri khronicheskom obluchenii v malykh dozakh // Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya, 2015. T. 55. pp. 63–70. (in Russ.).

2. Filippov E.V. Ispolzovaniya metoda "DNK-komet" dlya detektsii i otsenki stepeni povrezhdeniy DNK kletok organizmov rasteniy, zhivotnykh i cheloveka, vyzvannykh faktorami okruzhayushchey sredy (obzor) // Nauka i obrazovaniya, 2014. pp. 72–78. (in Russ.).

3. Raskosha O.V. Otsenka stabilnosti genoma v kletkakh shchitovidnoy zhelezy myshey posle khronicheskogo vozdeystviya ioniziruyushchego izlucheniya v maloy doze, i u ikh potomkov // Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya, 2016. pp. 48–52. (in Russ.).

4. Testov B.V., Taskayav A.I. Nakopleniya estestvennykh radionuklidov v organizme zhivotnykh na uchastkakh s povyshennoy radioaktivnostyu // Tekhnogennyya elementy i zhivotnyy organizm. Sverdlovsk, 1986. pp. 23–26. (in Russ.).

5. Vorobtsova I.E., Kitaev T.V. Urethane-induced lung adenomas in the first-generation progeny of irradiated male mice // Carcinogenesis, 1988. V. 9. P. 1931 – 1934. (in Russ.).

6. Singh N.P. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells // Exs. Cell Res., 2000. V. 256. № 1. pp. 328 – 337.

7. Vorobyava N.Yu., Osipov A.N., Pelevina I.I. Chuvstvitel'nost limfotsitov perifericheskoy krovi letchikov i kosmonavtov k vozdeystviyu γ -izlucheniya; induksiya dvunitevykh razryvov DNK // Byul. eksperim. biol. med., 2007. T. 144. pp 404–407. (in Russ.).


8. Tronov V.A. Reparatsiya DNK i apoptoz // Tsitologiya, 1999. T. 41. pp. 405–410. (in Russ.).

9. Ilyanko A.I., Krapivko T.P. Ekologiya zhivotnykh v radiatsionnom biogeotsenoze. M., 1989. 224 p. (in Russ.).

10. Ermakova O.V., Raskosha O.V. Sostoyaniya shchitovidnoy zhelezy polevok-ekonomok s radioaktivnykh territoriy posle dopolnitelnykh vozdeystviy // Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN. 2012. T. 14. (8). pp. 1891–1893. (in Russ.).

References

1. Raskosha O.V., Ermakova O.V., Pavlov A.V.,


**ESTIMATION OF STABILITY OF THYROID GLAND CELLS OF TUNDRA VOLES
LIVING IN DIFFERENT RADIOECOLOGICAL CONDITIONS AFTER ADDITIONAL
EXPOSURE, USING THE “DNA-COMET” ASSAY**

© **O.V. Raskosha**

Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS,
28, ulitsa Kommunisticheskaya, 167982, Syktyvkar, Russian Federation

The study was to assess the level of cytogenetic disorders using a neutral version of the "DNA-comet" assay in thyroid gland cells of the animals subjected to chronic exposure to ionizing radiation in low doses under natural conditions (50-1200 μ R/h). The use of additional chemical load tests (paraquat, 2 mg/kg body weight) and radiation (acute irradiation, a dose of 3 Gy) of nature made it possible to detect differences in the response of the genome of thyroid cells in the field of animals that live under normal and elevated background radiation; chronic exposure of animals leads to high resistance of thyrocytes to provocative actions of these factors. After urethane intoxication (1 mg/g body weight) in the cells of the thyroid gland of control and irradiated animals similar cytogenetic abnormalities were detected – increase in the number of cells with high DNA fragmentation (2.5 and 4.5 times in animals from the control and radioactively contaminated site, respectively).

Key words: chronic effect, ionizing radiation, small doses, additional effects, tundra voles, thyroid gland, “DNA comet” assay.

УДК 577.1

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-12-17

ВЛИЯНИЕ НИТРОПРУССИДА НАТРИЯ НА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L. ПРИ ДОБАВЛЕНИИ В ПИТАТЕЛЬНУЮ СРЕДУ КАДМИЯ

© С.Р. Рахматуллина

Изучено влияние нитропрусида натрия на соотношение дыхательных путей, активность антиоксидантных ферментов каталазы и пероксидазы и содержание малонового диальдегида в побегах и корнях пшеницы *Triticum aestivum* L. сорт Казахстанская 10 при добавлении в питательную среду кадмия. Доля альтернативного пути дыхания в корнях пшеницы в присутствии нитропрусида натрия составляла 49%. Нитропруssid натрия на среде с кадмием изменял долю альтернативного пути дыхания, что составляло 46%, вероятно SNP смягчает токсическое действие, оказываемое кадмием. Активация АП является одним из механизмов поддержания гомеостаза подверженных кадмиевому стрессу клеток. Соли тяжелых металлов являются мощным индуктором окислительного стресса. В ответ на окислительный стресс возрастает активность антиоксидантных ферментов каталазы, пероксидазы, что приводит к нейтрализации свободных радикалов и пероксидов. Активация пероксидазной системы при Cd-стрессе является адаптивной реакцией, которую связывают с защитой растения от окислительного стресса. Выявлено, что обработка растений пшеницы нитропруссидом натрия на среде с кадмием приводила к увеличению активности пероксидазы в побегах на 6,26%, а активность каталазы увеличивалась в корнях на 17,33% по сравнению с растениями, выращенными на кадмии. Выявлено, что в побегах и корнях происходит накопление МДА в присутствии ионов кадмия, что свидетельствует об окислительном стрессе в этих частях растения. В варианте с кадмием содержание МДА увеличивается на 35,5% в побегах и на 32,9% в корнях, по сравнению с контролем. Установлено, что обработка растений пшеницы нитропруссидом натрия приводила к снижению содержания малонового диальдегида в побегах на 24,76% и корнях на 51,16%, по сравнению с вариантом на кадмии. В нашей работе нитропруssid натрия снижает уровень МДА, способствуя, тем самым, улучшению антиоксидантного баланса в клетках исследуемых растений и уменьшению в них процессов перекисного окисления липидов.

Ключевые слова: тяжелые металлы, кадмий, нитропруssid натрия, альтернативная оксидаза, антиоксидантные ферменты, перекисное окисление липидов.

Введение. Производственная деятельность человека и урбанизация его жизни приводят к увеличению загрязнения окружающей среды соединениями тяжелых металлов (ТМ). Накопление тяжелых металлов в организмах растений, животных и человека может вызывать нарушения их жизнедеятельности. Проблема устойчивости живых организмов к неблагоприятным факторам является одной из приоритетных в современной биологии. Известно, что ТМ увели-

чивают проницаемость мембран, изменяют процессы вакуолизации цитоплазмы, нарушают транспорт ассимилятов и минеральное питание, изменяют водный и гормональный статус организма, ингибируют процесс фотосинтеза; снижают интенсивность дыхания [1]. Избыток солей ТМ в растениях вызывает состояние окислительного стресса, сопровождающееся образованием активных форм кислорода (АФК) и перекисным окислением липидов (ПОЛ) [2].

Сильным стресс-фактором и природным токсикантом является кадмий (Cd). Известно, что кадмий снижает интенсивность фотосинтеза, что связано с нарушением ультраструктуры хлоропластов, ингибированием синтеза хлорофилла, пластохинона и каротиноидов, нарушением транспорта электронов, ингибированием ферментов цикла Кальвина и недостатком CO₂ вследствие закрывания устьиц; может быть причиной повреждения светособирающего комплекса и фотосистем; воздействует на сукцинатдегидрогеназный комплекс, малатдегидрогеназу и изоцитратдегидрогеназу [1]; угнетает рост и развитие растений; нарушает водный обмен растений. Из литературных данных известно, что обработка проростков пшеницы *Triticum aestivum* и фасоли *Phaseolus aureus* солью кадмия приводит к повышению уровня пролина.

Влияние ТМ на растительный организм изучается в комплексе с регуляторами роста и протекторными веществами, в том числе и с нитропруссидом натрия (SNP), который активно воздействует на морфофизиологические и биохимические процессы в растениях. Сообщается, что одним из антиоксидантных агентов в ответ на биотический и абиотический стрессы выступает NO [2]. Оксид азота – сигнальная молекула, выполняющая различные физиологические функции в растениях: участвует в процессах дыхания, движения устьиц, прорастании семян, росте корня и листьев, созревании плодов, старении [2]; в регуляции метаболизма активных форм кислорода, программируемой смерти клеток; в синтезе фитоалексинов, сверхчувствительной реакции. Имеются данные, что NO способствует утилизации АФК и защите растений от окислительных повреждений. Изучение защитного действия нитропруссиды натрия на растения при Cd-стрессе является актуальным. Целью работы было исследование влияния нитропруссиды натрия на морфофизиологические и биохимические показатели у растений пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Казахстанская 10 в норме и при воздействии кадмия.

Материалы и методы исследований. Объектом исследования были растения пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорт Казахстанская 10). Для

изучения влияния 40 мкМ раствора нитропруссиды натрия применяли предпосевную обработку семян в течение 24 часов. Семена проращивали в термостате при температуре 28°C. Через сутки после замачивания семена с одинаково развитыми корнями переносили на стеклянные плотки на дистиллированную воду. На 3 сут (с момента замачивания семян) в сосудах с растениями воду заменяли раствором Хогланда – Арнона (0,5 н). Питательная смесь была составлена по прописи Хогланда-Арнона с добавлением цитрата железа (0,1 мг/л). Растения выращивали при освещении люминесцентными лампами ЛД-20 и лампами накаливания («УЛЗ», Россия), освещенность 1,752*10⁻⁹Лк (120 Вт/м²), светопериод 16 ч, средняя температура воздуха 24±2°C. На 9 сутки растения подвергались воздействию соли кадмия. Ингибиторный анализ проводили на 14 – суточных растениях. Для подавления работы цитохромоксидазного пути дыхания использовали NaN₃ (2 мМ, рН 4.5). Ингибирование альтернативной оксидазы проводили с помощью салицилгидроксамовой кислоты (СГК, 15 мМ, рН 4.5). Растворы ингибиторов готовили в фосфатном буфере [2]. Определение активности гваяколпероксидазы и каталазы проводили по известной методике [3; 4]. Содержание продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой.

Измерения проводили в 4-кратной биологической и 3-кратной аналитической повторности.

Результаты и обсуждение.

Альтернативный и цитохромный пути дыхания.

Установлено, что под влиянием нитропруссиды натрия в корнях пшеницы возрастает доля альтернативного пути дыхания (АП), которая составляет 49% (Рис. 1). Выявлено, что на среде с кадмием нитропруссид натрия изменял долю альтернативного пути дыхания в корнях, которая составляла 46% (Рис. 1). В побегах наблюдали увеличение доли цитохромного пути дыхания как под действием только нитропруссиды натрия, что составляло 77%, так и под действием нитропруссиды натрия на среде с кадмием, что

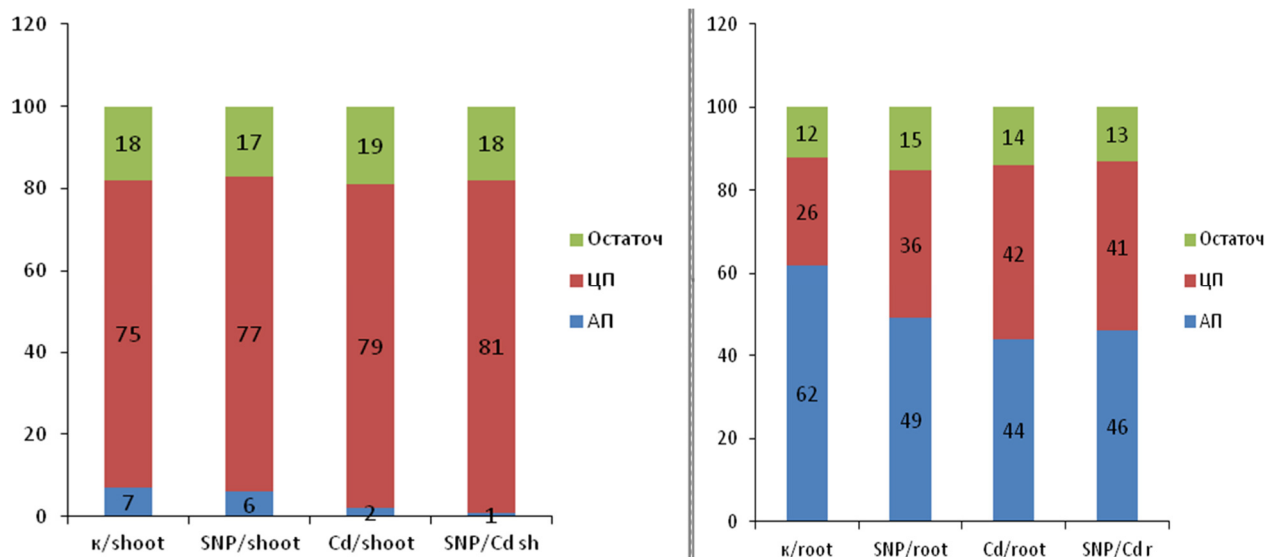


Рис. 1. Влияние нитропрусида натрия на альтернативное цианидрезистентное дыхание (O_2 мг/сырой массы) побегов (shoot) и корней (root) растений пшеницы в норме и при добавлении в среду кадмия. К – контроль; SNP – нитропруссид натрия; Cd – кадмий; SNP/Cd – нитропруссид натрия/кадмий

составляло 81% (Рис. 1). Значительное повышение доли альтернативного пути дыхания в корнях растений по-видимому, обусловлено необходимостью поддержания интенсивной работы ЦТК. Известно, что органические кислоты ЦТК способны связывать ТМ с последующей изоляцией их в вакуоли [5]. Предполагается, что Cd^{2+} ингибирует транспорт электронов и протонов в митохондриях, что может вызывать нарушение функционирования электронно-транспортной цепи. Активация АП является одним из механизмов поддержания гомеостаза подверженных кадмиевому стрессу клеток. Известно, что АО препятствует генерации АФК в ЭТЦ митохондрий за счет быстрого сброса электронов на кислород и снижения степени восстановленности пула убихинонов [6].

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что SNP смягчает токсическое действие, оказываемое кадмием.

Пероксидаза и каталаза.

Установлено, что обработка растений пшеницы нитропруссидом натрия (на среде с кадмием) приводила к увеличению активности пероксидазы в побегах (на 6,26%) и снижению активности данного фермента в корнях, по сравнению с растениями, выращенными на кадмии (Рис. 2.). SNP на среде с кадмием приводила к

увеличению активности каталазы в корнях (на 17,33%) (Рис. 3.). Этот факт согласуется с литературными данными, поскольку известно, что соли тяжелых металлов являются мощным индуктором окислительного стресса, в том числе кадмий, не являющийся элементом, участвующим в нормальном метаболизме растений и в небольших концентрациях вызывающий токсический эффект [7].

Активация пероксидазной системы при Cd-стрессе является адаптивной реакцией, которую связывают с защитой растения от окислительного стресса. Помимо этого, активация гваяколовых пероксидаз способствует развитию процессов суберинизации и лигнификации. Известно, что NO может функционировать как антиоксидант, связывающий АФК, такой, как супероксид-анион радикал, тем самым снижая повреждение клеток [2], NO может заметно активировать каталазу. Имеются сведения о смягчении действия на растения ионов токсичных металлов при обработке донорами NO (например, нитропруссидом натрия).

Малоновый диальдегид.

О степени окислительного стресса судили по накоплению малонового диальдегида (МДА), который является цитотоксическим продуктом перекисного окисления липидов и индикатором последующего повреждения тканей.

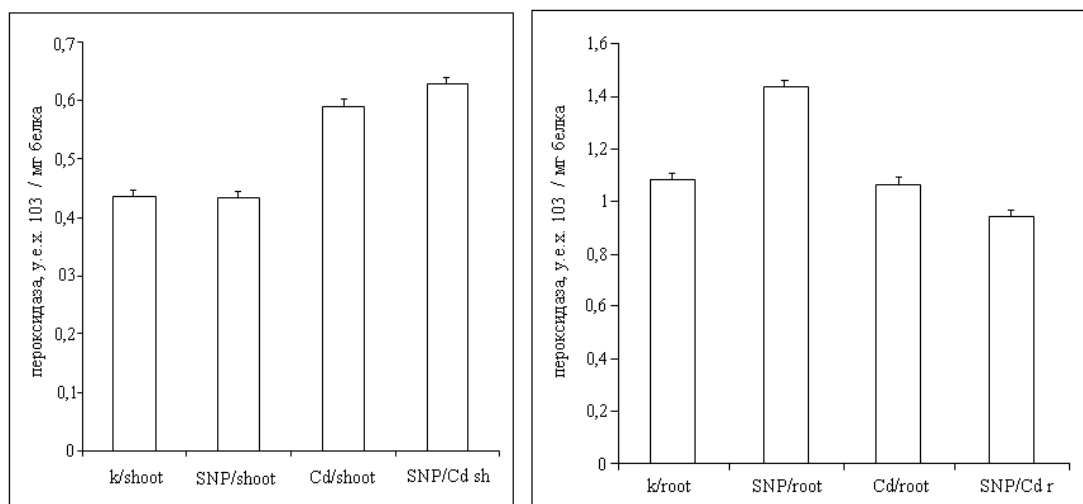


Рис. 2. Влияние нитропруссидов натрия на активность пероксидазы в побегах (shoot) и корнях (root) растений пшеницы в норме и при добавлении в среду кадмия. К – контроль; SNP – нитропруssid натрия; Cd – кадмий; SNP/Cd – нитропруssid натрия/кадмий

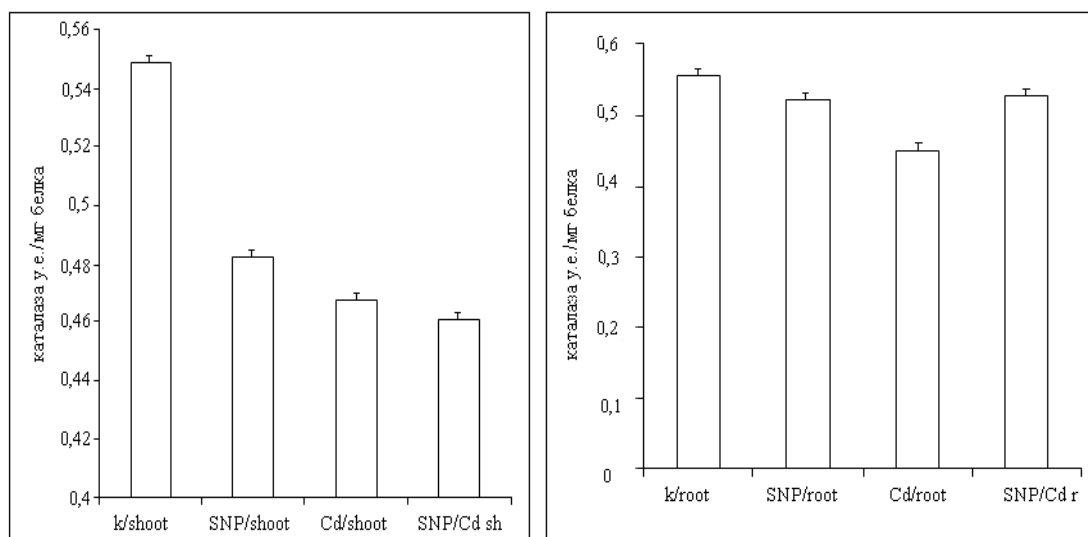


Рис. 3. Влияние нитропруссидов натрия на активность каталазы в побегах (shoot) и корнях (root) растений пшеницы в норме и при добавлении в среду кадмия. К – контроль; SNP – нитропруssid натрия; Cd – кадмий; SNP/Cd – нитропруssid натрия/кадмий

Выявлено, что в побегах и корнях происходит накопление МДА в присутствии ионов кадмия (Рис. 4), что свидетельствует об окислительном стрессе в этих частях растения. Как видно из рис. 4, в варианте с кадмием содержание МДА увеличивается (на 35,5%) в побегах и (на 32,9%) в корнях, по сравнению с контролем. Установлено, что интенсивность ПОЛ в растениях обработанных нитропруссидом натрия (на кадмии) ниже, в сравнении с растениями обработанными кадмием. Так, обработка нитропруссидом натрия (на кадмии) приводит к снижению

содержания МДА в побегах (на 24,76%) и корнях (на 51,16%), по сравнению с вариантом на кадмии. Накопление МДА под действием кадмия свидетельствует об окислительном стрессе клеток побегов и корней и нарушении в них про-/антиоксидантного равновесия. Известно, что присутствие ионов кадмия вызывает усиление перекисного окисления липидов [8]. В литературе имеются данные, что обработка семян пшеницы нитропруссидом натрия снижает содержание МДА. Ранее было показано, что нитропруssid натрия предотвращал токсическое действие

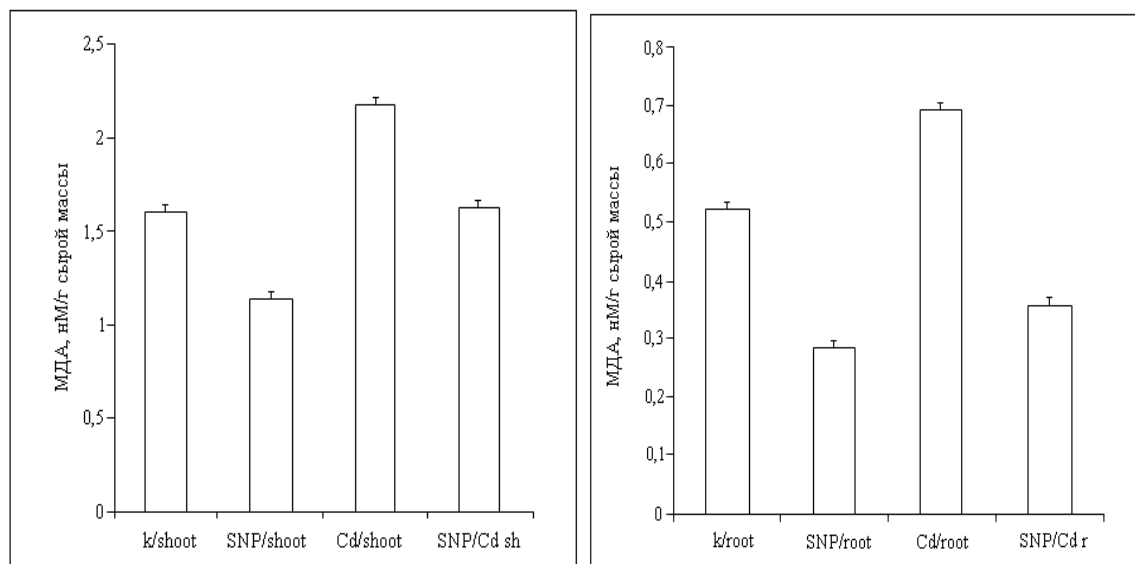


Рис. 4. Влияние нитропруссид натрия на содержание малонового диальдегида (МДА) в побегах (shoot) и корнях (root) растений пшеницы в норме и при добавлении в среду кадмия. К – контроль; SNP – нитропруссид натрия; Cd – кадмий; SNP/Cd – нитропруссид натрия/кадмий

Cd у подсолнечника [9]; люпина; риса [10]. В нашей работе нитропруссид натрия снижал уровень МДА, способствуя, тем самым, улучшению антиоксидантного баланса в клетках исследуемых растений и уменьшению в них процессов перекисного окисления липидов.

Заключение. Таким образом, можно предположить, что применение нитропруссид натрия у пшеницы снижает негативное действие, которое оказывает кадмий и тем самым может предотвращать токсическое действие этого тяжелого металла. Следует отметить, что SNP при кадмиевом стрессе индуцировал антиоксидантную систему, т.е. выступал в роли антиоксидантного агента, способного к утилизации АФК и защите растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гармаш Е.В., Головки Т.К. Влияние кадмия на рост и дыхание ячменя при двух температурных режимах выращивания // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 3. С. 382 – 387.
2. Гильванова И.Р., Еникеев А.Р., Степанов С.Ю., Рахманкулова З.Ф. Участие салициловой кислоты и оксида азота в защитных реакциях растений пшеницы при действии тяжелых металлов // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 1. С. 1 – 6.

3. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агрпроимиздат, 1987. С. 41-43.

4. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Методы определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16-19.

5. Losch R., Kohl K.I. Plant Respiration under the Influence of Heavy Metals // Heavy Metal Stress in Plants. From Molecules to Ecosystem / Eds Prasad M.N.V., Hagemeyer J. Berlin: Springer-Verlag. 1999. P. 139 – 156.

6. Fiorani F., Umbach A.L., Siedow J.N. The Alternative Oxidase of Plant Mitochondria Is Involved in the Acclimation of Shoot Growth at Low Temperature. A Study of Arabidopsis AOX1a Transgenic Plants // Plant Physiol. 2005. V. 139. P. 1795 – 1805.

7. Hatata M.M., Abdel-Aal E.A. Oxidative Stress and Antioxidant Defense Mechanism in Response to Cadmium Treatments // American-Eurasian J. Agric. and Environ. Sci. 2008. V. 4. P. 655 – 669.

8. Pilon-Smits E.A.H., Zhu Y.L., Sears T., Terry N. // Physiologia Plantarum. 2000. V. 110. P. 455.

9. Groppa M.D., Rosales E.P., Iannone M.F., Benavides M.P. Nitric Oxide, Polyamines and Cd-Induced Phytotoxicity in Wheat Roots // Phytochemistry. 2008. V. 69. P. 2609 – 2615.

10. Wang Y.-S., Yang Z.-M. Nitric Oxide Reduces Aluminum Toxicity by Preventing Oxidative Stress in the Roots of Cassia tora L. // Plant. Cell. Physiol. 2005. V. 46. P. 1915 – 1923.



**SODIUM NITROPRUSSIDUM'S INFLUENCE ON MORPHOPHYSIOLOGICAL
AND BIOCHEMICAL INDICATORS OF *TRITICUM AESTIVUM* L. WHEATSPROUTS
WHILE ADDING IT INTO NUTRIENT CADMIUM MEDIUM**

© S.R. Rakhmatullina

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

Sodium nitroprussidum's influence on a ratio of airways, activity of antioxidant enzymes (catalases and peroxidases) and malonicdialdehyde content in sprouts and roots of Kazakhstan 10 *Triticum aestivum* L. grade of wheat while adding it into nutrient cadmium medium was studied. The share of an alternative breath way in wheat roots in sodium nitroprussidum presence made 49%. Sodium nitroprussidum in cadmium medium changed a share of an alternative breath way that made 46%. It is revealed that processing wheat plants by sodium nitroprussidum in cadmium medium led to increase in activity of peroxidase in sprouts (for 6,26%), and the activity of a catalase increased in roots (by 17,33%) in comparison with the plants which were grown up on cadmium. It is established that processing wheat plants by sodium nitroprussidum led to decrease in malonicdialdehyde content in sprouts (for 24,76%) and in roots (for 51,16%), in comparison with option on cadmium.

Key words: heavy metals, cadmium, Sodium nitroprussidum, alternative oxydase, antioxidant enzymes, peroxide oxidation of lipids.

УДК 581.2:632.7

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-18-24

УСТОЙЧИВОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПШЕНИЦЫ К ОБЫКНОВЕННОЙ ЗЛАКОВОЙ ТЛЕ *SCHIZAPHIS GRAMINUM* ROND

© С.Д. Румянцев, С.В. Веселова, Е.А. Черепанова, И.В. Максимов

Изучен редокс-статус растений пшеницы трех видов *Triticum aestivum* L., *T. monococcum* L. и *T. timopheevii* Zhuk., заселенных обыкновенной злаковой тлей *Schizaphis graminum* Rond. Предполагается, что для понимания механизмов формирования устойчивости растений к колюще-сосущим насекомым важно различать быстрые ответы, проявляющиеся у растений в течение первых 5 дней, и долгосрочные ответы, обнаруживающиеся после 10 дней инфицирования вредителем. Обнаружено, что в быстрой реакции растений на заселение тлей перекись водорода выполняет важную сигнальную функцию запуска защитного ответа. При долгосрочном ответе растений на инфицирование вредителем важны процессы детоксикации активных форм кислорода, в которых принимают участие пероксидаза и каталаза. Тесты на антибиоз и выносливость показали, что толерантными по отношению к *S. graminum* были *T. aestivum* сорт Омская 35, образец *T. timopheevii* к-58666 и образец *T. monococcum* к-39471, последний из которых оказался наиболее устойчивым. Толерантные образцы отличались высоким содержанием перекиси водорода и пониженной активностью каталазы при быстром ответе, повышенной активностью пероксидазы на протяжении всего эксперимента и скачком повышения активности каталазы при долгосрочном ответе. Выдвигается предположение о том, что активность пероксидазы может являться легко тестируемым маркерным признаком устойчивости растений к тлям.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., *T. monococcum* L., *T. timopheevii* Zhuk., *Schizaphis graminum* Rond., толерантность, активные формы кислорода, про-/антиоксидантная система.

Введение.

Интенсификация сельского хозяйства привела к существенному увеличению вредоносности тлей на зерновых культурах. Повышение устойчивости растений за счет расширения генетического разнообразия возделываемых сортов с помощью интрогрессии генов и введения набора генов, контролирующих различные механизмы, один из наиболее экологически безопасных способов ограничивающих вредоносность тлей [1]. Однако для этого необходимо

накопление информации о механизмах устойчивости. Генофонд *Triticum aestivum* L. относительно беден устойчивыми формами, поэтому возникает необходимость изучать дикорастущие виды пшеницы. Показано, что *T. monococcum* L. и *T. timopheevii* Zhuk. обладают комплексной устойчивостью к целому ряду вредителей и болезней [1, 2]. Несмотря на большую иммунологическую ценность *T. monococcum* и *T. timopheevii* в геном пшеницы интрогрессировано ограниченное число генов.

РУМЯНЦЕВ Сергей Дмитриевич, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: Rumyantsev-serg@mail.ru

ВЕСЕЛОВА Светлана Викторовна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: veselova75@rambler.ru

ЧЕРЕПАНОВА Екатерина Александровна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: k_cherapanova@mail.ru

МАКСИМОВ Игорь Владимирович, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: phyto@anrb.ru

Устойчивость растений – одна из основных причин, лимитирующих вредоносность тлей. По общепринятой классификации Р. Пайнтера выделяют 3 типа устойчивости: неpreferredность, или антиксеноз (отвергание растения при возможности выбора), антибиоз (неблагоприятное воздействие на жизнеспособность фитофага при питании – увеличение смертности, снижение плодовитости насекомых) и толерантность (выносливость) [3]. К сожалению, легко тестируемые маркерные признаки устойчивости растений к тлям практически отсутствуют. При этом сведения о взаимосвязи между типами устойчивости довольно противоречивы и требуют дальнейшего изучения.

Толерантность – уникальная категория устойчивости растений к насекомым, которую обычно связывают с сильно выраженной компенсаторной реакцией растений и неспецифичными по отношению к вредителям защитными ответами [3, 4]. Однако механизмы, характеризующие толерантность растений к насекомым, до конца не изучены. На сегодняшний день в современной литературе описывают механизмы толерантности, связанные с повышением активности фотосинтеза, увеличением ветвления корней, скорости роста новых меристем, поглощения питательных веществ и механизмами детоксикации излишних количеств активных форм кислорода (АФК) [4].

Считается, что АФК являются главным сигналом растения на стрессовые факторы окружающей среды, а редокс-статус растения, заселенного тлей, является одним из важных показателей толерантности сорта [4, 5]. Окислительный взрыв при инфицировании тлями считается типичной реакцией формирования устойчивости растений к вредителю, однако часто приводит к смерти клетки [4]. Детоксикация излишних количеств АФК и поддержание гомеостаза между генерацией и утилизацией АФК считается отличительной чертой толерантных растений [4], обеспечивающих, таким образом, как защитный ответ, так и высокую скорость фотосинтеза для компенсации потерь питательных веществ при кормлении насекомых флоэмным соком [4, 6]. Показано, что в этих процессах участвует ряд про-/антиоксидантных ферментов, в том числе пероксидазы и каталазы [5, 6, 7]. Каталазы явля-

ются основными ферментами, утилизирующими H_2O_2 , как в процессах развития, так и под воздействием стрессовых факторов [8]. Активация апопластных пероксидаз может играть решающую роль в развитии устойчивости растений к тлям за счет детоксикации больших количеств АФК через синтез токсичных фенольных соединений и лигнина [4, 5, 7]. Пероксидазы (ПО) индуцируются во многих растениях в ответ на атаку насекомыми и являются важным компонентом непосредственной реакции растений на повреждение, так как регулируют ряд процессов напрямую или косвенно связанных с устойчивостью растений к насекомым [7]. Поэтому мы предполагаем, что активность ПО может являться легко тестируемым маркерным признаком устойчивости растений к тлям.

В связи с этим, целью настоящей работы являлось изучение редокс-статуса растений пшеницы трех видов *Triticum aestivum*, *T. monococtum* и *T. timopheevii*, заселенных обыкновенной злаковой тлей (*Schizaphis graminum* Rond.), а также обнаружение связи между активностью про-/антиоксидантных ферментов – пероксидазы и каталазы – и показателями толерантности растений пшеницы (антибиозом и выносливостью) к вредителю.

Материалы и методы исследований.

Объекты исследования. Обыкновенную злаковую тлю (*Schizaphis graminum* Rond.) для экспериментов размножали на молодых проростках мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Салават Юлаев, выращенных в изолированных сосудах с прожаренной при 180 °С почвой в климатической камере КС-200 СПУ (“Смоленский СКТБ СПУ”, Россия) с 16-ти часовым световым периодом при температуре 20/24°C (ночь/день), интенсивность света 146 Вт/м² (лампы Osram L 36W/77). В экспериментах использовали три сорта мягкой яровой пшеницы *T. aestivum* – Жница, Салават Юлаев (СЮ), Омская 35 (Ом35). Также объектами исследований служили один образец *T. monococtum* к-39471 и один образец *T. timopheevii* к-58666, из ГНУ Всероссийского НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (Санкт-Петербург).

Биохимические параметры. Для экспериментов трехсуточные проростки пшеницы,

выращенные в изолированных пластиковых сосудах на водной культуре (10% раствор Хогланда-Арнона) в условиях, описанных выше, заселялись тлями. Для этого одинаковое количество тлей разных возрастов стряхивали в каждый сосуд с растениями так, чтобы нагрузка на одно растение составляла 10 особей тлей [9]. Затем сосуды накрывались пластиковыми изоляторами, затянутыми пористым нетканым материалом. Измерение генерации перекиси водорода (H_2O_2) и активности ферментов пероксидазы (КФ 1.11.1.7) и каталазы (КФ 1.11.1.6) через 1, 3, 6 и 10 суток после заселения проростков пшеницы *S. graminum* проводили, как описано ранее [10].

Тест на антибиоз. На трехсуточные всходы под изоляторы подсаживали личинок первого возраста из расчета 1 особь на растение. Через 14 дней подсчитывали абсолютное количество живых тлей, а также число погибших взрослых особей и личинок [9]. Смертность выражали в % от общего количества тлей. Коэффициент размножения рассчитывали по формуле: $K = \text{средняя плодовитость самки за время опыта} / \text{продолжительность опыта в днях}$ [9].

Тест на выносливость растений. В возрасте 3-х суток измеряли длину проростков от уровня плотика до кончика листа, а затем каждое растение заселяли 20-ю бескрылыми самками и изолировали. Постоянную численность тлей поддерживали путем удаления через каждые 48 ч отрождающихся личинок в течение двух недель. В конце эксперимента проводили повторное измерение высоты первого и второго листьев растений незаселенных и заселенных тлями, и результаты сравнивали с первоначальным измерением [9]. Выносливость выражали в виде % ингибирования роста листа по сравнению с незараженным контролем.

Статическая обработка. Все эксперименты повторяли 3 раза и проводили в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях (общее $n = 9$), кроме тестов на антибиоз и выносливость, где эксперименты включали в себя не менее 10 биологических повторов (общее $n = 30$). На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам. Достоверность различий между вариантами

опыта оценивали по t -критерию Стьюдента при доверительном уровне $p \leq 0,99$.

Результаты и обсуждение. Среди насекомых-вредителей, наносящих значительный ущерб сельскому хозяйству, на долю отряда Полужесткокрылые (*Hemiptera*), куда относится обыкновенная злаковая тля *S. graminum*, приходится очень много экономически важных вредителей, отличительной особенностью которых является колюще-сосущий тип питания [4, 5]. В данной работе было исследовано два типа устойчивости растений к тлям – антибиоз и выносливость. Тест на антибиоз показал, что тли кормившиеся на сортах Жница и СЮ показали наименьшую смертность и самый высокий коэффициент размножения (табл. 1), т. е. данные сорта были восприимчивы к обыкновенной злаковой тле. Смертность тлей, заселенных на сорт Ом35 и образец *T. timopheevii* к-58666, была примерно в 3-4 раза выше, а коэффициент размножения – в 4-5 раз ниже, чем у тлей, кормившихся на восприимчивых сортах (табл. 1). Однако больше всего на жизнеспособность тлей повлиял образец *T. monosocum* к-39471, так как у тлей, заселенных на него была обнаружена самая высокая смертность и самый низкий коэффициент размножения тлей (табл. 1). Таким образом, сорт Ом35 и образец *T. timopheevii* к-58666 оказались среднеустойчивыми, а образец *T. monosocum* к-39471 – самым устойчивым среди изученных сортов и образцов, что совпадает с данными литературы об устойчивости многочисленных образцов *T. monosocum* к разным видам тлей [1].

Оценку толерантности сортов обычно проводят с помощью теста на выносливость при сильном заселении растений насекомыми [9]. В наших экспериментах установлена низкая выносливость сортов Жница и СЮ по отношению к *S. graminum*, проявляющаяся в сильном ингибировании роста 1-ого и 2-ого листьев (табл. 1). Сорт Ом35 и образец *T. timopheevii* к-58666 показали среднюю выносливость к обыкновенной злаковой тле (табл. 1). Наиболее толерантным оказался образец *T. monosocum* к-39471, так как заселение тлями не ингибировало рост 1-ого листа, и торможение роста 2-ого листа было минимальным (табл. 1).

Показатели смертности и размножения обыкновенной злаковой тли *S. graminum* и показатели выносливости растений пшеницы трех видов *Triticum aestivum*, *T. monocoocum* и *T. timopheevii*, инфицированных данным вредителем

Показатели	Виды пшеницы				
	Triticum aestivum			T. timopheevii	T. monocoocum
	Жница	СЮ	Ом35	к-58666	к-39471
Смертность тлей, %	7,7±1,2 ^a	5,7±1,1 ^a	20,1±3,4 ^b	21,9±2,1 ^b	39,6±4,0 ^c
Коэффициент размножения тлей	2,93±0,26 ^a	2,22±0,78 ^a	0,51±0,14 ^b	0,50±0,16 ^b	0,17±0,01 ^c
Ингибирование роста 1-ого листа, %	25,5±4,6 ^a	25,8±6,1 ^a	8,5±3,3 ^b	12,3±6,6 ^b	0,1±2,4 ^c
Ингибирование роста 2-ого листа, %	46,2±3,7 ^a	45,0±3,7 ^a	19,5±4,8 ^b	22,6±4,2 ^b	7,6±2,8 ^c

Примечание. В одной строке разными буквами отмечены величины, различающиеся при $p \leq 0,99$.

В нашей работе были также изучены механизмы, формирующие толерантность вида или сорта. Для понимания механизмов формирования устойчивости растений к колюще-сосущим насекомым важно различать быстрые ответы, проявляющиеся у растений в течение первых 5 дней, и долгосрочные ответы, обнаруживающиеся после 10 дней инфицирования вредителем [4]. Кроме того, в период с 5-го по 10-ый день заселения вредителем в растениях происходят основные физиологические изменения, которые не всегда совпадают с реакцией быстрого ответа [4]. Быстрые ответы устойчивых растений характеризуются усилением генерации АФК и активацией базального иммунитета. При этом защитная роль повышенной генерации АФК в растениях в ответ на заселение тлями заключается как в их сигнальной функции, запускающей системную устойчивость [5], так и в прямом повреждающем действии высоких концентраций H_2O_2 на тлей, приводящем к подавлению выживаемости вредителя [4, 5, 7]. При долгосрочных ответах индуцированные ранним ответом защитные системы растения запускают систему детоксикации АФК и восстановления роста [4].

Изучение редокс-статуса растений пшеницы в наших экспериментах показало, что заселение восприимчивых сортов Жница и СЮ тлями приводило к уменьшению содержания H_2O_2 на начальных этапах инфицирования – первые трое суток (рис. 1а). Напротив, у устойчивых растений пшеницы Ом35 и образца

T. timopheevii к-58666 было обнаружено повышение содержания H_2O_2 в этот период инфицирования (рис. 1а). У толерантного к *S. graminum* образца *T. monocoocum* к-39471 было обнаружено резкое накопление H_2O_2 к 1-ым суткам после заселения тлей и снижение генерации H_2O_2 к 3-им суткам инфицирования (рис. 1а). Также как в наших экспериментах окислительный взрыв в растениях, инфицированных тлей, был обнаружен только у устойчивых, но не у восприимчивых форм растений [5, 6].

В наших экспериментах у устойчивых к *S. graminum* растений пшеницы Ом35, образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monocoocum* к-39471 на фоне повышенной генерации H_2O_2 обнаружено увеличение активности ПО (рис. 2а) и снижение активности каталазы (рис. 3а). Напротив, у восприимчивых сортов пшеницы Жница и СЮ на фоне уменьшения содержания H_2O_2 обнаружено повышение активности каталазы (рис. 3а) и не обнаружено увеличения активности ПО (рис. 2а). Во многих исследованиях показано, что разные виды злаковых тлей индуцируют резкое повышение активности ПО именно при питании на устойчивых фенотипах [3]. А низкая активность каталазы или подавление транскрипционной активности гена каталазы на ранних стадиях инфицирования у устойчивых генотипов способствовали окислительному взрыву и развитию устойчивости [6]. Таким образом, наши результаты подтверждают важную роль генерации H_2O_2 и повышения активности ПО, а также

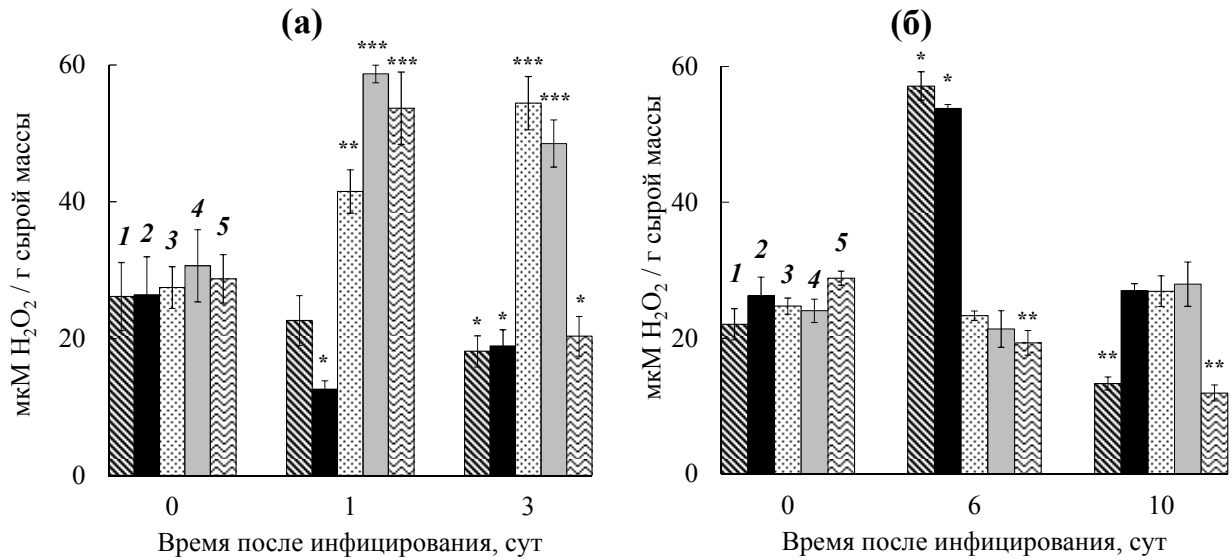


Рис. 1. Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на изменение содержания H₂O₂ в листьях трех видов пшеницы на разных стадиях инфицирования – (а) – быстрая реакция, (б) – долгосрочная реакция: 1 - *T. aestivum* сорт Жница; 2 - *T. aestivum* сорт Салават Юлаев; 3 - *T. aestivum* сорт Омская 35; 4 - образец *T. timopheevii* к-58666; 5 - образец *T. monococcum* к-39471. Звездочки показывают статистически достоверные отличия от контрольной группы, а разное количество звездочек означает статистически достоверные различия между вариантами при $p \leq 0,99$

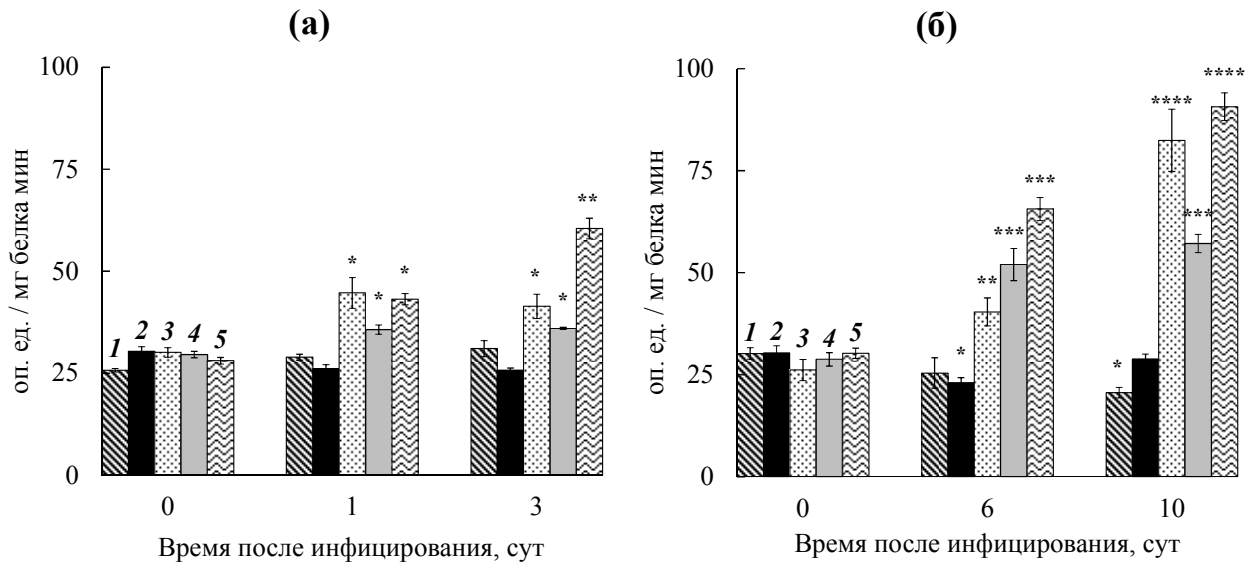


Рис. 2. Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на изменение активности пероксидазы в листьях трех видов пшеницы на разных стадиях инфицирования – (а) – быстрая реакция, (б) – долгосрочная реакция. Обозначения как на рис. 1. Звездочки показывают статистически достоверные отличия от контрольной группы, а разное количество звездочек означает статистически достоверные различия между вариантами при $p \leq 0,99$

отрицательную роль каталазы в развитии устойчивости растений пшеницы к злаковой тле на раннем этапе инфицирования.

Окислительный взрыв индуцирует иммун-

ный ответ растения, однако излишнее количество АФК ингибирует фотосинтез, тормозит ростовые процессы и может привести к повреждениям в клетке, поэтому у толерантных растений

запускается механизм детоксикации АФК, в котором участвуют антиоксидантные ферменты – ПО и каталаза [4, 8]. В наших экспериментах у устойчивых растений пшеницы Ом35, образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monocossum* к-39471 на 6-е сутки после заселения тлей, когда в растениях активируется иммунный ответ, и происходят основные физиологические изменения [4], обнаружено снижение содержания H_2O_2 (рис. 1б) по сравнению с быстрой реакцией (рис. 1а) на фоне пониженной активности каталазы (рис. 3б) и повышенной активности ПО (рис. 2б). Стоит обратить внимание, что у толерантного образца *T. monocossum* к-39471 такие результаты были обнаружены уже на 3-и сутки инфицирования (рис. 1а, рис. 2а, рис. 3а). Эти результаты могут говорить о вовлечении H_2O_2 и ПО в синтез токсичных фенольных соединений и реорганизацию клеточных стенок растений за счет лигнификации, что может быть причиной снижения жизнеспособности вредителя [4, 5, 7], которое было обнаружено у устойчивых образцов в наших экспериментах (табл. 1). В этот же период инфицирования у восприимчивых сортов Жница и СЮ не было обнаружено повышения активности ПО (рис. 2б). Однако на фоне нормальной или пониженной активности каталазы

(рис. 3б) на 6-е сутки после заселения тлей резко увеличивалось содержание H_2O_2 (рис. 1б), что могло привести к повреждениям и ингибированию роста листьев, которое было обнаружено у восприимчивых сортов (табл. 1). На 10-е сутки после заселения тлей, когда в растениях начинаются восстановительные процессы, у толерантных растений пшеницы Ом35, образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monocossum* к-39471 на фоне нормального или сниженного содержания H_2O_2 и повышенной активности ПО наблюдали скачек повышения активности каталазы (рис. 3б), также как в растениях табака через 15 суток после инфицирования табачной белокрылкой (*Bemisia tabaci*) [8]. Эти результаты могут свидетельствовать о процессах детоксикации АФК и восстановлении роста [4]. Так в наших экспериментах у устойчивых растений пшеницы рост 1-ого и 2-ого листьев либо не ингибировался, либо торможение роста было минимальным (табл. 1). У восприимчивых сортов Жница и СЮ на 10-е сутки инфицирования тлей все исследованные показатели снижались или оставались на уровне контрольных растений (рис. 1б, рис. 2б, рис. 3б), что может говорить об отсутствии ответной реакции растений и начала процессов старения и отмирания [4].

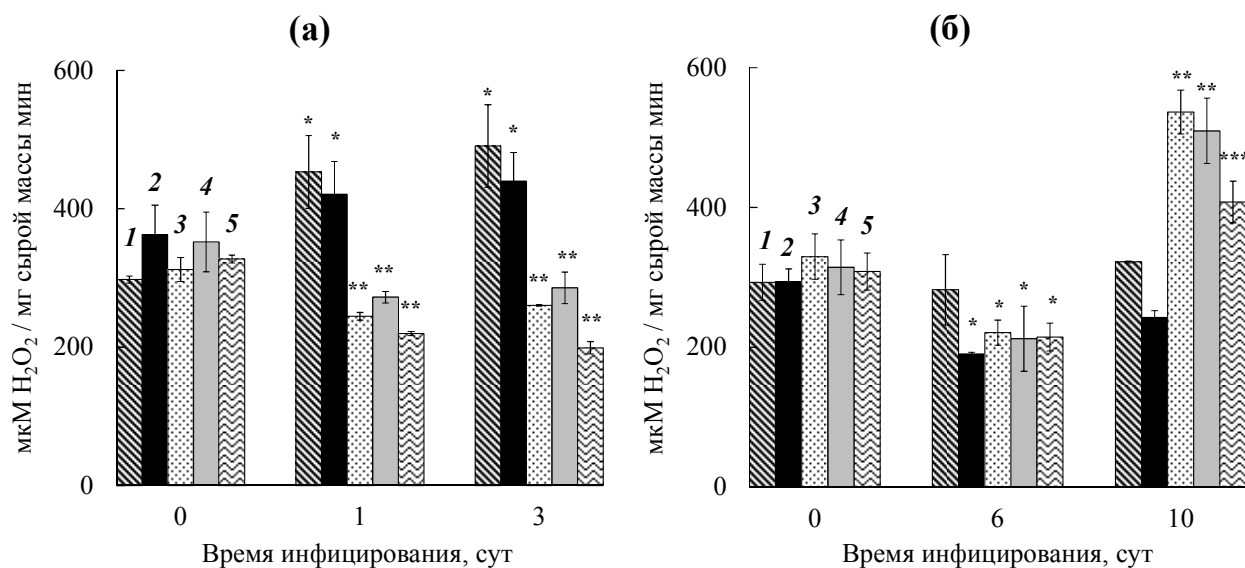


Рис. 3. Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на изменение активности каталазы в листьях трех видов пшеницы на разных стадиях инфицирования – (а) – быстрая реакция, (б) – долгосрочная реакция. Обозначения как на рис. 1. Звездочки показывают статистически достоверные отличия от контрольной группы, а разное количество звездочек означает статистически достоверные различия между вариантами при $p \leq 0,99$

Таким образом, наши результаты показывают, что в быстрой реакции растений на заселение тлей (до 5 дней) H_2O_2 выполняет важную сигнальную функцию запуска защитного ответа. При долгосрочном ответе растений на инфицирование вредителем (10 дней) важны процессы детоксикации АФК, в которых принимают участие ПО и каталаза. У наиболее толерантного к *S. graminum* из изученных видов пшеницы *T. monococcum* к-39471 обнаружена самая высокая активность ПО на протяжении всего эксперимента, а активность каталазы регулировалась в зависимости от стадии инфицирования. Мы предполагаем, что активность ПО может являться легко тестируемым маркерным признаком устойчивости растений к тлям.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме № 0246-2018-0035 с использованием оборудования ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

ЛИТЕРАТУРА

1. Radchenko E.E. N.I. Vavilov's theory on natural immunity of plants to harmful organisms and breeding of cereal crops for aphid resistance // *Agricultural biology*. 2012. № 5. P. 54-63.
2. Дорофеев В.Ф., Удачин Р.А., Семенова Л.В. Пшеницы мира // Под ред. В.Ф. Дорофеева. – Л.: ВО

Агропромиздат, 1987. – 560 с.

3. Radchenko E.E. Aphid resistance in barley and oat (review) // *Agricultural biology*. 2012. № 3. P. 19-31.
4. Koch K.G., Chapman K., Louis J., Heng-Moss T., Sarath G. Plant tolerance: a unique approach to control hemipteran pests // *Front. Plant Sci*. 2016. V. 7. P. 1363.
5. Morkunas I., Mai V.C., Gabrys B. Phytohormonal signaling in plant responses to aphid feeding // *Acta Physiol. Plant*. 2011. V. 33. P. 2057–2073.
6. Zhu-Salzman K., Salzman R.A., Ahn J.-E., Koiwa H. Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid // *Plant Physiol*. 2004. V. 134. P. 420–431.
7. War A.R., Paulraj M.G., Ahmad T., Buhroo A.A., Hussain B., Ignacimuthu S., Sharma H.C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores // *Plant Signal. Behav*. 2012. V. 7. № 10. P. 1306-1320.
8. Zhao H., Sun X., Xue M., Zhang X., Li Q. Antioxidant enzyme responses induced by whiteflies in tobacco plants in defense against aphids: catalase may play a dominant role // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 10. e0165454.
9. Радченко Е.Е. Злаковые тли // Изучение генетических ресурсов зерновых культур по устойчивости к вредным организмам / Под ред. Е.Е. Радченко. М.: Россельхозакадемия, 2008. С. 214 – 257.
10. 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.

THE RESISTANCE OF DIFFERENT WHEAT SPECIES TO GREENBUG APHID *SCHIZAPHIS GRAMINUM* ROND

© S.D. Rumyantsev, S.V. Veselova, E.A. Cherepanova, I.V. Maksimov

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

The redox status of three wheat species *Triticum aestivum* L., *T. monococcum* L. and *T. timopheevii* Zhuk., infected by greenbug aphids *Schizaphis graminum* Rond. was studied. It is suggested, that the formation of resistance to piercing-sucking insects depends on the integration of both short-term (arbitrarily <5 days) and longer term (>10 days) responses. It is shown that hydrogen peroxide performs an important signaling function in triggering defense reaction in the short-term plants response to insect feeding. The processes of reactive oxygen species detoxification are important in the long-term response of plants to pest infestation. Peroxidase and catalase are involved in these processes. Analysis of antibiosis and tolerance (persistence) showed that *T. aestivum* Omsk 35, *T. timopheevii* k-58666 and *T. monococcum* k-39471 were tolerant to *S. graminum*. *T. monococcum* k-39471 was the most resistant species. The high content of hydrogen peroxide and the low catalase activity in the short-term response, high peroxidase activity throughout the experiment, and the leap of the catalase activity in the long-term response were detected in tolerant plants. We have suggested that peroxidase activity could be easily tested marker of plant resistance to aphids.

Key words: *Triticum aestivum* L., *T. monococcum* L., *T. timopheevii* Zhuk., *Schizaphis graminum* Rond., tolerance, reactive oxygen species, pro- and antioxidant system.

**ВЛИЯНИЕ ОКСИДА СЕРЫ (VI) НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ
У ЛИШАЙНИКА *PHYSICIA STELLARIS* (L.) NYL. ГОРОДА
СТЕРЛИТАМАК И ЕГО ОКРЕСТНОСТЕЙ**

© З.Р. Саитова, Р.Г. Фархутдинов, В.В. Федяев, М.И. Гарипова,
И.А. Шпирная, А.А. Ямалеева

Лишайники вида *Physcia stellaris* (L.) Nyl собирали в парках г. Стерлитамак Республики Башкортостан и лесах окрестностей города на удалении до 30 км. На основании данных "розы ветров" г. Стерлитамака были установлены районы, направления господствующих ветров и преимущественного поступления загрязняющих веществ (север и северо-восток). Определение содержания серного ангидрида в талломах лишайников показало, что в образцах собранных в городе, а также в северном и северо-северо-восточном направлении было максимальное содержание оксида серы. Каталазная активность была наиболее высокой у лишайников в местах с высоким уровнем содержания оксида серы (VI) (SO₃). Это позволит предполагать, что каталаза задействована в процессах инактивации негативных процессов, происходящих под действием оксида серы. Определение гемагглютинирующей активности (ГАА) лектинов показало увеличение величины данного показателя в образцах собранных в городе и в северо-северо-восточном направлении, что позволяет предполагать участие лектинов в процессах адаптации лишайников к неблагоприятным факторам среды. Лишайники, выросшие в условиях города, характеризовались наименьшим уровнем поглощения кислорода в процессе дыхания. Было обнаружено, что в условиях воздействия повышенных концентраций токсических соединений происходило повышение содержания пролина в талломах лишайников. Таким образом, установлено, что у лишайников с высоким уровнем содержания SO₃ в талломе наблюдается изменение активности физиолого-биохимических процессов направленных на снижение негативного действия серного ангидрида.

Ключевые слова: *Physcia stellaris* (L.)Nyl, SO₃, лектины, дыхание, каталаза, пролин.

Введение. Лишайники изучаются очень давно и активно в роли индикаторов состояния окружающей среды. Также известно, что степень угнетения ростовых показателей лишайников является маркером уровня антропогенной нагрузки [1]. Изучение морфологического состояния лишайников (уменьшение размеров,

биомассы, площади, количества лопастей и апотециев) является первым признаком, которое свидетельствует о воздействии на лишайники загрязняющих веществ [2]. Для изучения механизмов адаптации к условиям местообитания лишайников необходимо исследование активности физиолого-биохимических процессов [3, 4].

САИТОВА Зилия Равилевна, Башкирский государственный университет, e-mail: fleurzily@yandex.ru

ФАРХУТДИНОВ Рашит Габдулхаевич – д.б.н., Башкирский государственный университет, e-mail: frg2@mail.ru

ФЕДЯЕВ Вадим Валентинович – к.б.н., Башкирский государственный университет, e-mail: vadim.fedyaev@gmail.com

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

ШПИРНАЯ Ирина Андреевна – к.б.н., Башкирский государственный университет, e-mail: i-shia@yandex.ru

ЯМАЛЕЕВА Анна Александровна – д.б.н., Башкирский государственный университет, e-mail: frg2@mail.ru

В ходе проведения предварительного описания лишенофлоры г. Стерлитамака и окружающих его лесов ранее нами было установлено, что эпифитный лишайник вида *Physcia stellaris* (L.) Nyl широко представлен на всех исследуемых пробных площадках [5]. Известно, что ряд предприятий г. Стерлитамак выбрасывает в атмосферу различные соединения серы в пылевидной и аэрозольной форме [6] и накопление серы в талломах лишайников оказывает негативное влияние на рост и развитие лишайников [7].

Целью исследования являлось установление активности физиолого-биохимических процессов в адаптации лишайников вида *P. stellaris* к воздействию соединений серы.

Объект и методы исследования. Объектом исследования был выбран устойчивый к антропогенному воздействию лишайник *Physcia stellaris*(L.) Nyl [8]. Данный вид лишайника в природных условиях произрастает на коре с рН<7, богатой минеральными веществами, т.е. относится к ацидофильным и нейтрофильным видам[8].

Исследования проводились в период 2015-2017 гг. на территории города Стерлитамак и на удалении от города до 30±5 км по направлению основных господствующих ветров. Количество пробных площадок в каждом месте сбора материала составляло 5. При определении пробной площадки (10×10 м) учитывалось следующее: схожесть древесных пород, плотность лесопосадки, близость дорог и водоемов приуроченность к рельефу, коэффициент встречаемости *P. stellaris* на исследуемой территории [5].

Лишайники собирали в генеративном возрасте в сухую погоду на одноствольных деревьях липы мелколистной (*Tilia cordata* Mill.) [5]. Собранный растительный материал сушили при комнатной температуре (22–26°C) до воздушно-сухого состояния (10–12% воды) для прекращения активности физиологических процессов и выравнивания состояния образцов, собранных в разных условиях произрастания.

Для определения физиолого-биохимических показателей проводилась регидратация лишайников, в процессе которой восстанавливалась активность гормональной системы и ферментов [4], для этого лишайники помеща-

лись в климатическую камеру на 14 ч при температуре 10±2 °С и влажности воздуха 80 – 90 % [4]. Для определения активности фермента каталазы проводили регидратацию 0,2 г сухого образца, далее образец гомогенизировали, дважды центрифугировали при 10тыс об/мин при 4°C. Каталазную активность определяли по остаточному количеству перекиси водорода, образующей комплекс с молибдатом аммония [9]. Скорость дыхания измеряли методом открытой манометрии [10], содержание свободного пролина определяли по методу Bates [11], содержание лектинов- по методике предложенной А.А. Ямалеевой [12].

Рентгенофлуоресцентный анализ высушенных образцов лишайников на содержание в них SO₃ проводился на энергодисперсионном рентгенофлуоресцентном спектрометре типа EDX (Schimadzu, Japan).

Все эксперименты проводили не менее чем в трех биологических повторностях, физиолого-биохимические анализы – в пяти повторностях для каждого варианта. На рисунках приведены средние арифметические и их ошибки. Статистическую обработку полученных данных и построение графиков выполняли в программе Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждение. По данным, предоставленным «Башкирским управлением по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды», в городе Стерлитамак в период 2013-2017 гг. преобладали ветра юго-юго-западного, южного и северного направлений (рис. 1).

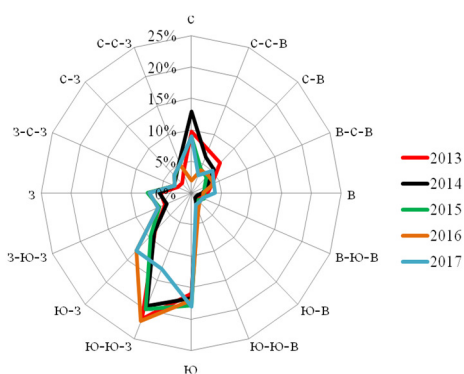


Рис. 1. Роза ветров в 2015–2017 гг. в г. Стерлитамак

Т а б л и ц а 1

Характеристика лишайникового покрова в г. Стерлитамак и в направлениях доминирующего движения ветра и содержание SO_3 в талломах лишайников *P. stellaris*

Параметр	Город	С	ССВ	Ю	ЮЮЗ
Общее видовое богатство, шт. [13]	6	11	10	8	14
Плотность популяций, экз./ствол	38±11,1	46,6±7,5	34,2±9,1	39,2±6,1	60,3±6,5
Содержание SO_3 , % массы	1,81±0,15	1,78±0,1	1,88±0,12	1,63±0,04	1,25±0,05

Как видно из рисунка 1 основное движение воздушных масс в течение периода наблюдений происходило в основном в направлении: северо-северо-восток (ССВ), север (С) и юг (Ю). Основное поступление воздушных масс было из юго-юго-запад (ЮЮЗ). Следовательно, перенос газовых и аэрозольных выбросов от стационарных источников загрязнения и от транспортных средств города Стерлитамак осуществляется в направлениях (ССВ), север (С) и юг (Ю). (рис. 1).

Наиболее распространённым в лишеноиндикации является анализ видового разнообразия, насыщенности и плотности популяции лишайников. Нами ранее было установлено, что видовое богатство лишайников исследованных площадок колеблется от 6 до 14 видов, наименьшее число видов было обнаружено непосредственно в г. Стерлитамаке в Ю направлении, а наибольшее в ЮЮЗ направлении [13]. Во всех исследуемых пробных точках встречались популяции *P. stellaris*. Как видно из рис. 1 из ЮЮЗ направления поступали доминирующие ветра и там соответственно находится зона относительного низкого загрязнения воздуха. Плотность популяции *P. stellaris*, снижена на территории города, на С, ССВ и Ю направлении от г. Стерлитамака, что говорит о влиянии окружающей среды на лишайники данных популяций (табл. 1).

Лишайники поглощают аэрозоли и газы всей поверхностью талломов, что также повышает их чувствительность к загрязнению. Основным звеном антиоксидантной защиты растений являются ферменты (например, каталаза), снижающие содержание перекиси водорода и обеспечивающих адаптивную гибкость организма [3, 4].

При определении уровня активности фермента каталазы было установлено, что у лишайников росших на территории города активность фермента была в 2,4 раза выше, чем в пробах собранных в Ю и С направлениях и почти в 4 раза чем в ЮЮЗ направлении (таб. 2). Как видно из таб. 1, в образцах из г. Стерлитамак и ССВ направлении происходило наибольшее накопление оксида серы (VI), что могло привести к повышению уровня активности фермента каталазы и соответственно, при более низком уровне содержания SO_3 в талломах, мы наблюдали минимальные значения активности фермента у лишайников, росших в ЮЮЗ направлении. Эти данные свидетельствуют об активном участии каталазы в работе антиоксидантной системы лишайников *P. stellaris* г. Стерлитамака направленной на адаптацию к повышенному содержанию SO_3 в талломах лишайников.

Изучение работы антиоксидантных ферментативных систем лишайников выявило определенную скоординированность работы ферментов по инактивации поллютантов поступающих в лишайники в наиболее загрязненных районах города и его окрестностей [3].

Определение содержания лектинов в талломах лишайников росших в условиях города и ССВ направления показало более высокий уровень гемагглютинирующей активности (таб. 2). Известно, что при воздействии неблагоприятных условий наблюдается значительное увеличение лектиновой активности, что связывают со стабилизирующей, адаптогенной ролью лектинов [12]. Следовательно, увеличение содержания лектинов у лишайников, росших в неблаго-

Уровень каталазной и гемагглютинирующей активности (ГАА) лектинов, скорость дыхания и содержание пролина в лишайниках *P. stellaris* в г. Стерлитамак и его окрестностей

№	Наименование места сбора материала	Каталазная активность, мкат/мл	ГАА лектинов, ГАЕ	Скорость дыхания, мкл O ₂ / г × час	Содержание пролина, мг/г сухой массы
1.	Город	15,3±0,13	8	373,76±40,58	4,26±0,15
2.	С	6,4±0,06	4	760,92±47,89	4,13±0,43
3.	ССВ	10,4±0,09	8	814,49±41,39	3,82±0,25
4.	Ю	6,3±0,04	4	782,83±38,15	3,76±0,33
5.	ЮЮЗ	3,9±0,06	4	549,08±25,97	2,89±0,13

приятных условиях, связано с их ролью в формировании одного из механизмов повышения устойчивости симбиотического организма.

Известно, что по мере повышения уровня загрязненности можно наблюдать увеличение дыхательной способности лишайников, которая иногда превышает контрольный уровень в 2–3 раза [15].

Однако измерение скорости дыхания показало, что лишайники, выросшие в условиях города, характеризовались наименьшим уровнем поглощения кислорода, в то время как образцы, собранные на ЮЮЗ показывали более высокую скорость дыхания (табл. 2). Можно предположить, что в условиях города лишайники подвергались воздействию комплекса повреждающих факторов (в том числе и SO₃), приводивших к ингибированию суммарного дыхания. Образцы собранные в направлениях С, ССВ и Ю, как видно из таблицы 2, обладали наиболее высокой скоростью потребления кислорода, что свидетельствует о меньшем влиянии ингибирующего фактора.

По данным литературы, на воздействие различных поллютантов лишайники реагируют накоплением свободного пролина, что, таким образом, может служить одним из индикаторов стресса [12]. Нами также установлен разный уровень содержания пролина в талломах лишайников, произрастающих в условиях воздействия повышенных концентраций SO₃. Наименьший уровень накопления пролина обнаружен в образцах собранных на ЮЮЗ, наиболее высокий – в городе (табл. 2).

Таким образом, рост лишайников *P. stellaris* которые содержат в талломе разные концентрации SO₃ сопровождается изменениями в активности физиолого-биохимических процессов, которые направлены на адаптацию к неблагоприятным факторам среды. Оценка только морфометрических показателей недостаточна при проведении лишеноиндикации и её необходимо дополнять сравнительной оценкой активности физиолого-биохимических процессов протекающих во время роста лишайников в условиях действия различных природных и антропогенных факторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мейсурова А.Ф., Нотов А.А. Содержание металлов в лишайниках на особо охраняемых природных территориях, сопряженных с урбоэкосистемами // Журнал прикладной спектроскопии. 2016. – Т. 83, № 5. – С. 794–802.
2. Михайлова И.Н., Микрюков В.С., Фролов И.В. Состояние сообществ эпифитных лишайников в условиях антропогенных нагрузок: влияние методов учета обилия на информативность показателей // Экология. - 2015. - № 6. - С. 427–433.
3. Beckett R.P., Ntombela N., Scott E., Gurjanov O.P., Minibayeva F.V., Liers C. Role of laccases and peroxidases in saprotrophic activities in the lichen *Usnea undulata*. // Fungal Ecology. - 2015. - V. 14. - P. 71-78;
4. Фархутдинов Р.Г., Саитова З.Р., Шпирная И.А., Зайцев Д.Ю., Шарипова Г.В. Гормональный и антиоксидантный статус популяций *Physcia stellaris* (L.) произрастающих в разных природных зонах Республики Башкортостан // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2018. № 42. С. 176–191.

5. Михайлова В.А., Саитова З.Р., Фархутдинов Р.Г. Особенности видового состава лишенобиоты Башкортостана // Вестник Башкирского университета. - 2013. - Т. 18, № 2. - С. 392 – 394.

6. Зейферт Д.В., Бикбулатов И.Х., Рудаков К.М., Григорьева И.Н. Растительные сообщества и почвенная мезофауна территорий химических предприятий в степной зоне Башкирского Предуралья. – Уфа: УГНТУ, 2000. 166 с.

7. Battal, P., Aslan, A., Turker, M., Uzun, Y. Effect of the air pollutant sulfur dioxide on phytohormone levels in some lichens. // Fresenius Environmental Bulletin. 2004, V. 13, I. 5, PP. 436–440.

8. Отнюкова Т.Н., Жижаяев А.М., Кутафьева Н.П., Дутбаева А.Т. Макромицеты как биоиндикаторы загрязнения окружающей среды территории г. Красноярска и его окрестностей // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2012. № 11. С. 101 – 113.

9. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.С. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16–19.

10. Рахманкулова З.Ф., Федяев В.В., Подашевка

О.А., Усманов И.Ю. Альтернативные пути дыхания и вторичный метаболизм у растений с разными типами адаптивных стратегий при дефиците элементов минерального питания // Физиология растений. - 2003. - Т. 50, № 2. - С. 231-237.

11. Рахманкулова З.Ф., Шуйская Е.В., Щербатов А.В., Федяев В.В., Биктимерова Г.Я., Хафизова Р.Р., Усманов И.Ю. Содержание пролина и флавоноидов в побегах галофитов, произрастающих на территории Южного Урала // Физиология растений. 2015. Т. 62, №1. С. 79–88

12. Ямалеева А.А. Лектины растений и их биологическая роль. Уфа. Изд-во Башкир.ун-та, 2001. 204 с.

13. Саитова З.Р., Фархутдинов Р.Г. Сравнительная оценка изменчивости структуры популяции *Physcia stellaris* (L.) Nyl., произрастающих в г. Стерлитамак и на прилегающих территориях. Известия Уфимского научного центра РАН. 2017. № 3-1. С. 193-197.

14. Домнина Е.А., Шапиро И.А., Быков О.Д. Изменение фотосинтеза и дыхания лишайников в районе Кирowo-Чепецкого химического комбината // Ботанический журнал. - 2007. - Т. 92. - № 4. - С. 515-523.



EFFECT OF SULFUR OXIDE (VI) ON THE PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL PROCESSES OF THE *PHYSICIA STELLARIS* (L.) NULL. CITIES OF STERLITAMAK AND ITS VICINITIES

© Z.R. Saitova, R.G. Farkhutdinov, V.V. Fedyaev, M.I. Garipova,
I.A. Shpirnaya, A.A. Yamaleeva

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

Lichens of the species *Physcia stellaris* (L.) Nyl were gathered in the parks of Sterlitamak city (Republic of Bashkortostan) and in forests of outskirts of the city at a distance of up to 30 km. Based on data of the "wind rose" in Sterlitamak, the areas, directions of prevailing winds and the predominant releasing of pollutants (north and north-east) were established. Detection of sulfuric anhydride content in lichen thallus showed that in the samples collected in the city, as well as in the north and north-north-east direction, the maximum content of sulfur oxide was. Catalase activity was highest in lichens in places with high levels of sulfur oxide (VI) (SO₃). This will suggest that catalase is involved in the processes of inactivation of negative processes occurring under the action of sulfur oxide. Measurement of hemagglutinating activity (GAA) of lectins showed its increase in the value of this indicator in samples collected in the city and in the north-north-east direction, which allows to assume the participation of lectins in the adaptation of lichens to unfavorable environmental factors. Lichens grown in urban conditions were characterized by the lowest level of respiration oxygen consumption. It was found that under conditions of exposure to elevated concentrations of toxic compounds, the proline content increased in the lichensthallus. Thus, it has been established that lichens with a high level of SO₃ content in the thallus exhibit a change in the activity of physiological and biochemical processes aimed at reducing the negative effect of sulfuric anhydride.

Key words: *Physciastellaris* (L.) Nyl, SO₃, lectins, respiration, proline.

УДК 581.1

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-30-35

ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ НИЗКОЧАСТОТНОГО ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И ГИПЕРТЕРМИИ НА УРОВЕНЬ ГИДРОПЕРОКСИДОВ И РОСТОВЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ГОРОХА

© Ю.В. Синицына, Я.В. Середнева, Е.А. Кальясова, А.П. Веселов

Целью работы было исследование влияния низкочастотного переменного магнитного поля, гипертермии и их комбинирования на содержание суммы органических и неорганических гидроперекисей, продукцию H_2O_2 , активность каталазы в листьях и на рост побегов гороха. Было показано, что гипертермия ($42^\circ C$) относительно контроля ($23^\circ C$) вызывала повышение содержания гидроперекисей на 25 - 40% (15- и 30-минутная обработка соответственно), пероксида водорода на 20 - 25%, увеличивала активность каталазы на 32% после 30-минутной экспозиции. Переменное магнитное поле с характеристиками 15Гц 1,5мТл относительно контроля (нормальные условия: наличие только геомагнитного поля 47 - 50 мкТл) снижало содержание гидроперекисей на 18-22% (30- и 120-минутная обработка соответственно), пероксида водорода на 12-20% и вызывало тенденцию к снижению активности каталазы, то есть в целом оказывало противоположный гипертермии эффект на данные показатели. Если гипертермия резко угнетала рост побегов гороха (снижала его в 9 раз относительно контрольных растений), то переменное магнитное поле на этот показатель не влияло. Последующая экспозиция в переменном магнитном поле растений, уже подвергнутых действию гипертермии, не приводила к изменению содержания гидроперекисей и активности каталазы по сравнению с выдерживанием в условиях геомагнитного поля. Напротив, предваряющая гипертермию обработка переменным магнитным полем предотвращала повышение содержания гидроперекисей и продукцию пероксида водорода, что сопровождалось снижением активности каталазы и ослаблением ингибирующего эффекта гипертермии на рост (прирост надземной части хотя и был ниже контрольного на 70%, в то же время превышал прирост гипертермированных растений в 2 раза). Такую картину ответа можно интерпретировать как защитное действие переменного магнитного поля по отношению к последующей гипертермии. Полученные результаты свидетельствуют о преадаптирующем действии низкочастотного переменного магнитного поля, запускающем включение в растительных клетках защитных механизмов, способствующих их адаптации к условиям гипертермии.

Ключевые слова: переменное магнитное поле, гипертермия, растения, каталаза, гидроперекиси, прирост побегов.

Введение. Защита агрокультур от воздействия неблагоприятных факторов внешней среды, таких как гипертермия – одна из задач сельского хозяйства. В качестве одного из методов такой

защиты может использоваться экспонирование растений в магнитном поле. Воздействие магнитного поля применяется в сельском хозяйстве для улучшения ряда физиологических показателей

СИНИЦЫНА Юлия Витальевна – к.б.н., Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: jsin@inbox.ru

СЕРЕДНЕВА Яна Вадимовна – к.б.н., Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: seredneva.yana@mail.ru

КАЛЪЯСОВА Екатерина Андреевна – к.б.н., Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: katelyn@bk.ru

ВЕСЕЛОВ Александр Павлович – д.б.н., Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: veselov-ap@ya.ru

растений – увеличения прорастания семян, всхожести, количества и массы плодов [1], но практически не применяется в качестве адаптирующего фактора. Вместе с тем, при изучении комбинированного влияния магнитных полей и негативных факторов внешней среды было показано, что магнитные поля могут как нивелировать отрицательные эффекты ряда факторов [2, 3], так и усугублять их [4]. Выяснение эффекта низкоинтенсивного магнитного поля в сочетании с воздействием гипертермии позволит разработать экспериментальные подходы для снижения негативного влияния повышенной температуры на растения.

Объект и методы исследования. Для экспериментов использовались растения гороха посевного *Pisum sativum* L. сорта «Альбумен», выращенные в климатической камере KBM-240 (Binder, Германия), при температуре +23°C и 16 – часовом световом периоде, освещённость составляла 121 мкмоль фотонов /с·м².

Для генерации магнитного поля использовалась магнитотерапевтическая установка VL-2 (ElectroBiology Inc., США), создававшая переменное (импульсное) магнитное поле (ПеМП) со значением магнитной индукции 1,5 мТл, частотой магнитного поля в соленоиде 15 Гц. Длительность экспозиции 15, 30 мин и 2 ч. Величина геомагнитного поля во время проведения экспериментов составляла 47-50 мкТл. Комнатная температура поддерживалась в значении +23°C.

Температуру и длительность гипертермической обработки (ГТ) подбирали для каждого изучаемого параметра так, чтобы она максимально влияла на показатель, не будучи при этом летальной для объекта (+42°C при определении содержания пероксидов и активности каталазы; +47°C при оценке ростового показателя).

При изучении комбинированного воздействия двух факторов растения экспонировались в ПеМП, затем помещались в условия гипертермии, либо в обратном порядке.

Выделение суспензии хлоропластов проводили согласно Arnon et al., [5]. Определение суммарного содержания гидроперекисей проводили в хлоропластах по Gay and Gebicki [6] с модифи-

кациями. Дополнительно определяли продукцию H₂O₂ тканями листьев гороха путём инкубации высечек в FOX реактиве. Определение содержания липидов проводили по Камышникову В.С. [7].

Активность каталазы определяли в гомогенате листьев по Patterson et al. [8]. Определение содержания общего белка проводили по методу Лоури [9].

При исследовании ростовых характеристик измеряли длину побега у 9-дневных растений. Затем растения подвергались действию гипертермии, ПеМП, либо их комбинации, и растения помещались на 4 дня в климатическую камеру. Разница между итоговыми и исходными значениями длины побега обозначалась как прирост растения.

Эксперименты были выполнены не менее чем в 5 биологических повторностях и 3 биохимических. Определяли среднее значение результатов, ошибка среднего и статистическую значимость различий по критерию Стьюдента или по критерию Крускала-Уоллиса. На рисунках значком «*» обозначены статистически значимые различия с контролем по критерию Крускала-Уоллиса.

Результаты и их обсуждение. Усиление продукции активных форм кислорода клетками растений является универсальным звеном ответа на воздействие неблагоприятных факторов внешней среды. Взаимодействие активных форм кислорода с клеточными структурами приводит к накоплению продуктов пероксидации, в частности, органических гидроперекисей.

В наших экспериментах 15-минутная гипертермия увеличивала суммарное содержание гидроперекисей на 40 %, а 30-минутная вызывала рост содержания пероксида водорода на 22% (рис. 1).

Как видно из рис. 2. в отличие от гипертермии, ПеМП вызывало не увеличение, а снижение содержания как суммарных гидроперекисей (после 120-минутной обработки полем), так и пероксида водорода (после 30-минутного воздействия), что позволяет сделать заключение об его антиоксидантном действии.

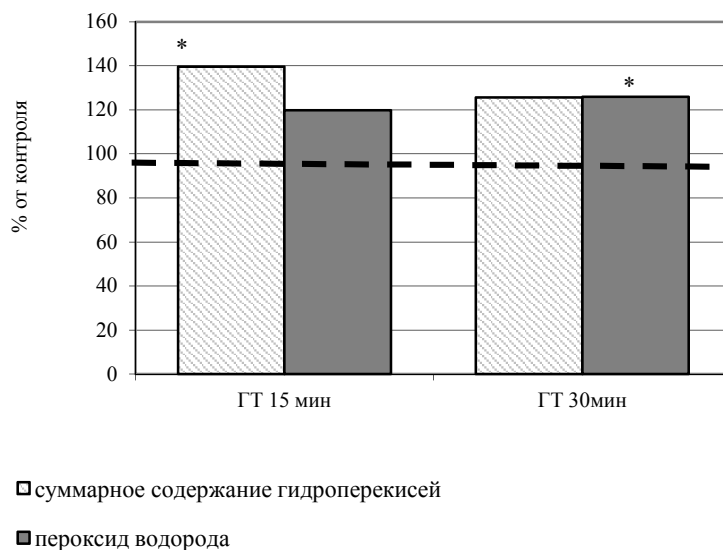


Рис. 1. Содержание суммы гидроперекисей и пероксида водорода в растениях гороха после воздействия гипертермии различной длительности (ГТ – гипертермия)

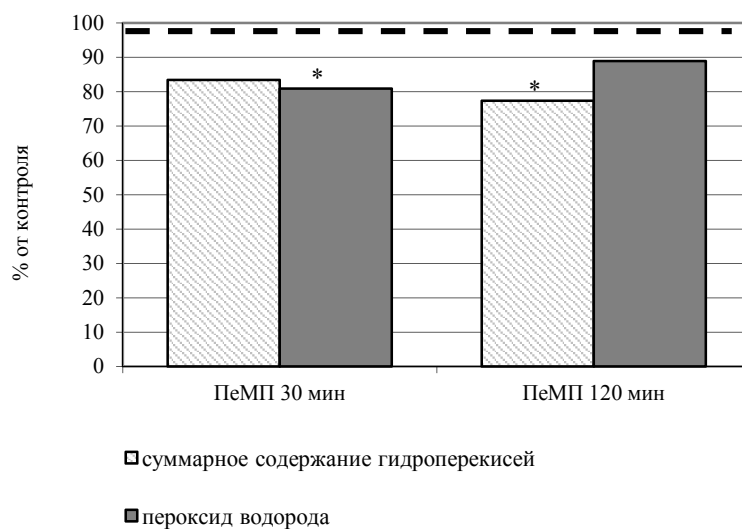


Рис. 2. Содержание суммы гидроперекисей и пероксида водорода в растениях гороха после воздействия переменного магнитного поля различной длительности (ПеМП – переменное магнитное поле)

Проверялась возможность предадаптирующего, либо корректирующего действия магнитного поля по отношению к гипертермии (рис.3.). Было показано, что через 2 часа выдержки обработанных гипертермией растений в ПеМП суммарное содержание гидроперекисей снижалось и приближалось к контрольным значениям (вариант «ГТ+ ПеМП 2ч» на рисунке). Поскольку такой же результат был получен при 2-часовой экспозиции гипертермированных растений в нормальных условиях в

отсутствии ПеМП (вариант «ГТ + н.у. 2ч»), можно сделать вывод об отсутствии корректирующего действия исследуемого ПеМП, если растения помещались в ПеМП после высокотемпературной обработки.

Однако было выявлено термопротекторное действие ПеМП при его применении до воздействия повышенной температуры: двухчасовая предобработка магнитным полем не только предотвращала повышение суммарного содержания гидроперекисей под действием гипертермии,

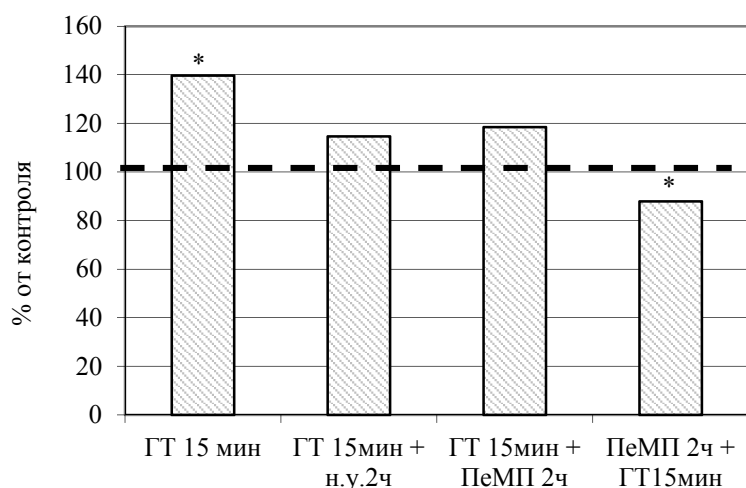


Рис. 3. Содержание суммы гидроперекисей в растениях гороха после комбинированной обработки гипертермией и переменным магнитным полем (ГТ – гипертермия, ПеМП – переменное магнитное поле, н.у. – нормальные условия: геомагнитное поле и комнатная температура)

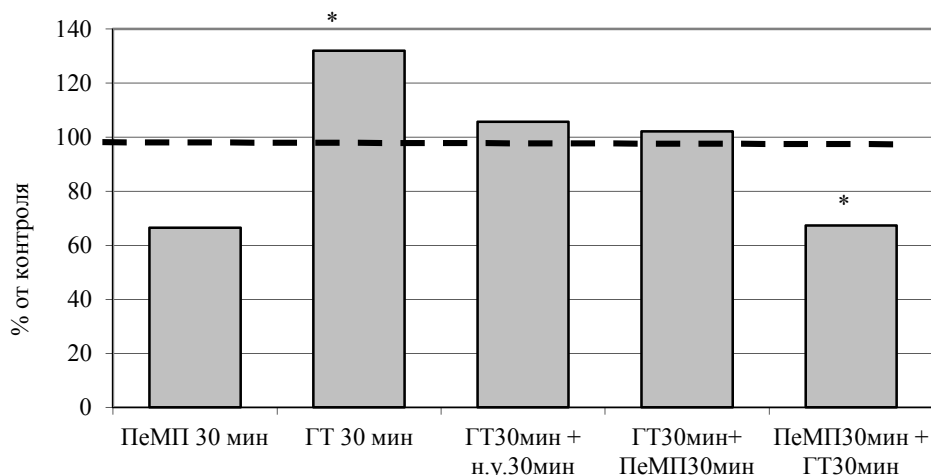


Рис. 4. Активность каталазы в растениях гороха после комбинированной обработки гипертермией и переменным магнитным полем (ГТ – гипертермия, ПеМП – переменное магнитное поле, н.у. – нормальные условия: геомагнитное поле и комнатная температура)

но и вызывала значимое его снижение – до 88% относительно контроля. Таким образом, при предварительной обработке переменное магнитное поле оказывало стабилизирующее действие на окислительный потенциал растительного организма, снижая количество гидроперекисей в хлоропластах и генерацию H_2O_2 клетками листьев и предотвращая их повышение при последующей гипертермии.

Каталаза разлагает перекись водорода на воду и молекулярный кислород, является индуцибельным ферментом - увеличение количества

субстрата ведёт к повышению её активности. Так как обработка ПеМП приводила к снижению продукции H_2O_2 , то можно ожидать, что активность каталазы в этом случае, по крайней мере, не будет увеличена. Это подтвердилось в серии экспериментов при экспозиции растений в переменном магнитном поле различной длительности, причем наибольшее снижение активности данного фермента наблюдалось после 30-минутной обработки (рис 4). Эта экспозиция в дальнейшем использовалась как компонент комбинированного воздействия с гипертермией.

30-минутная обработка ГТ приводила к повышению активности каталазы на 32 % относительно контроля. Последующее выдерживание гипертермированных растений как в ПеМП, так и в нормальных условиях одинаково уменьшало активность каталазы до контрольного уровня. Предваряющая гипертермию обработка ПеМП приводила к снижению активности каталазы гипертермированных растений на 33 % относительно контроля. Таким образом, исследуемое магнитное поле не влияло на растения, уже подвергнутые стрессующему фактору (гипертермии), но оказывало протекторное действие, если его предваряло.

Некоторыми исследователями наблюдалось, что выброс активных форм кислорода, в том числе пероксида водорода, в условиях стресса влияет на работу фитогормонов, что приводит к усилению ветвления корней и замедлению роста побегов [10]. В таком случае, изменения уровня продукции пероксидов, зарегистрированные в наших экспериментах, должны были отразиться на ростовых характеристиках растений. Оказалось, что 30- и 120- минутная обработки переменным магнитным полем не влияли на прирост надземной части растений гороха. Как у контрольных, так и обработанных ПеМП растений прирост за 4 дня составлял в среднем $10,9 \pm 0,3$ см. Под воздействием гипертермии скорость роста побегов значительно уменьшалась, прирост надземной части составлял всего $1,6 \pm 0,3$ см. Предварительное выдерживание растений в ПеМП уменьшало ингибирующее влияние гипертермии: прирост надземной части составлял $3,8 \pm 0,4$ см для 30-минутной экспозиции в ПеМП и $6,6 \pm 0,4$ см – для 120-минутной. Такую картину ответа можно интерпретировать как защитное действие переменного магнитного поля по отношению к последующей гипертермии.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о преадаптирующем действии низкочастотного переменного магнитного поля, которое запускало включение в растительных клетках защитных механизмов, что способствовало их адаптации к условиям последующей гипертермии при комбинированном воздействии. Как следствие, уменьшались неблагоприятные эффекты гипертермии на продукцию

пероксидов и рост растений. Мы предполагаем, что переменное магнитное поле может выступать как слабый стимулирующий фактор, приводя к включению защитных механизмов, эффективно тормозящих генерацию активных форм кислорода при последующем воздействии негативных факторов, например, гипертермии, что предотвращает развитие в клетках стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Radhakrishnan R., Kumari B.D.R. Pulsed magnetic field: A contemporary approach offers to enhance plant growth and yield of soybean // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2012. Vol. 51. P. 139-144.
2. Baghel L., Kataria S., Guruprasad K. N. Static magnetic field treatment of seeds improves carbon and nitrogen metabolism under salinity stress in soybean // *Bioelectromagnetics*. 2016. Vol. 37. Iss. 7. P. 455-470.
3. Kataria S., Baghel L., Guruprasad K.N. Pretreatment of seeds with static magnetic field improves germination and early growth characteristics under salt stress in maize and soybean // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2017. Vol. 10. P. 83-90.
4. Jouni F.J. Abdolmaleki P., Ghanati F. Oxidative stress in broad bean (*Vicia faba* L.) induced by static magnetic field under natural radioactivity // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2012. Vol. 741. Iss. 1-2. P. 116-121.
5. Arnon D. I. Photosynthesis by isolated chloroplasts IV. General concept and comparison of three photochemical reactions / D.I Arnon, M. B. Allen, F. R. Whatley // *Biochimica et Biophysica Acta* – 1956 – Vol. 20 – P. 449-461.
6. Gay C., Gebicki J.M.A. Critical Evaluation of the Effect of Sorbitol on the Ferric-Xylenol Orange Hydroperoxide Assay // *Analytical Biochemistry*. 2000. Vol. 284. P. 217-220.
7. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической диагностике. - Минск, 2000. – 896 с.
8. Patterson, B.D. An inhibitor of catalase induced by cold chilling-sensitive plants / B.D. Patterson, L. A. Payne, Y. Chen, D.Graham // *Plant Physiology*. – 1984. – Vol. 76. – P. 1014-1018.
9. Lowry, O.N. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent / O.N. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Tarr, R.I. Randall // *Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – Vol. 193. - №1. – P. 265-275.
10. Pasternak T., Potters G., Caubergs R., Jansen M.A.K. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level // *Journal of Experimental Botany*. – 2005. – Vol. 56. – Iss. 418. –P. 1991-2001.

References

1. Radhakrishnan R., Kumari B.D.R. Pulsed magnetic field: A contemporary approach offers to enhance plant growth and yield of soybean // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2012. Vol. 51. P. 139-144.
2. Baghel L., Kataria S., Guruprasad K. N. Static magnetic field treatment of seeds improves carbon and nitrogen metabolism under salinity stress in soybean // *Bioelectromagnetics*. 2016. Vol. 37. Iss. 7. P. 455-470.
3. Kataria S., Baghel L., Guruprasad K.N. Pre-treatment of seeds with static magnetic field improves germination and early growth characteristics under salt stress in maize and soybean // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2017. Vol. 10. P. 83-90.
4. Jouni F.J., Abdolmaleki P., Ghanati F. Oxidative stress in broad bean (*Vicia faba* L.) induced by static magnetic field under natural radioactivity // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2012. Vol. 741. Iss. 1-2. P. 116-121.
5. Arnon D. I. Photosynthesis by isolated chloroplasts IV. General concept and comparison of three photochemical reactions / D.I. Arnon, M. B. Allen, F. R. Whatley // *Biochimica et Biophysica Acta* – 1956 – Vol. 20 – P. 449-461.
6. Gay C., Gebicki J.M.A. Critical Evaluation of the Effect of Sorbitol on the Ferric±Xylenol Orange Hydroperoxide Assay // *Analytical Biochemistry*. 2000. Vol. 284. P. 217-220.
7. Kamyshnikov V.S. *Spravochnik po kliniko-biokhimicheskoy diagnostike (Manual on clinical and biochemical diagnostics)*. - Minsk, 2000. – 896 p.
8. Patterson, B.D. An inhibitor of catalase induced by cold chilling-sensitive plants / B.D. Patterson, L. A. Payne, Y. Chen, D.Graham // *Plant Physiology*. – 1984. – Vol. 76. – P. 1014-1018.
9. Lowry, O.N. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent / O.N. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Tarr, R.I. Randall // *Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – Vol. 193. - №1. – P. 265-275.
10. Pasternak T., Potters G., Caubergs R., Jansen M.A.K. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level // *Journal of Experimental Botany*. – 2005. – Vol. 56. – Iss. 418. –P. 1991-2001.

INFLUENCE OF COMBINED ACTION OF LOW-FREQUENCY ALTERNATING MAGNETIC FIELD AND HYPERTHERMIA ON THE LEVEL OF HYDROPEROXIDES AND GROWTH REACTIONS OF PEA PLANTS

© Yu.V. Sinitsyna, Ya.V. Seredneva, E.A. Kal'yasova, A.P. Veselov

Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod
Gagarina st., 23, ulitsa Gagarina, 603950, Nizhni Novgorod, Russian Federation

The aim of the work was to investigate the influence of a low-frequency alternating magnetic field, hyperthermia and their combination on the content of the sum of organic and inorganic hydroperoxides, on the production of H₂O₂, the catalase activity in leaves and on the growth of pea shoots. It was shown that hyperthermia 42°C caused an increase in the content of hydroperoxides by 25-40% (15- and 30-minute treatment, respectively), hydrogen peroxide by 20-25%, catalase activity by 32% (after a 30-minute exposure) relative to control 23°C. Relative to the control (normal conditions: the presence of only the geomagnetic field 47-50 μT) the alternating magnetic field 15 Hz, 1.5 mT reduced the content of hydroperoxides by 18-22% (30- and 120-minute processing, respectively), hydrogen peroxide by 12-20% and caused a tendency to decrease catalase activity, that is, as a whole, had the opposite effect on these parameters. Hyperthermia severely inhibited the growth of pea shoots (reduced it 9-fold relative to control plants) but the alternating magnetic field did not affect this index. If irradiation in an alternating magnetic field was after hyperthermia, it did not change the content of hydroperoxides and catalase activity in comparison with the residence under normal conditions (only the geomagnetic field). In contrast, if irradiation in an alternating magnetic field was before hyperthermia, it prevented an increase of the hydroperoxides content and the hydrogen peroxide production and was accompanied by a decrease of the catalase activity and a weakening of the hyperthermia inhibitory effect on growth (although the shoot growth was below the control one by 70%, at the same time, exceeded the growth of the hyperthermed plants in 2 times). The resulting response can be interpreted as the protective effect of an alternating magnetic field with respect to subsequent hyperthermia. The obtained results testify to the preadaptive role of the low-frequency alternating magnetic field, which triggers the protective mechanisms in plant cells that facilitate their adaptation to the conditions of hyperthermia.

Key words: alternating magnetic field, hyperthermia, plants, catalase, hydroperoxides, shoot growth.

УДК 616-001.16: 577.15

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-36-42

ОЦЕНКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА КРОВИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУРСЕ ИНГАЛЯЦИЙ ОКСИДА АЗОТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© А.Г. Соловьева, Н.В. Диденко, К.Л. Беляева

В работе представлены результаты исследования особенностей метаболических процессов крови животных, подвергнутых длительному ингаляционно-наружному воздействию оксида азота в концентрациях 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm. Эксперимент выполнен на крысах линии Wistar. Ингаляции NO осуществляли ежедневно по 10 минут в течение 30 дней. Синтез газовой смеси производили с помощью экспериментального аппарата для генерации NO, разработанного в Российском федеральном ядерном центре - Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной физики (г. Саров). Состояние энергетического и окислительного метаболизма крови оценивали через 30 суток и спустя восстановительный период после отмены окислительных нагрузок NO (60 суток). В крови определяли содержание глюкозы и лактата, активность каталазы, альдегиддегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, рассчитывали коэффициент баланса энергетических реакций. Показано, что длительное применение NO в концентрациях 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm вызвало повышение уровня глюкозы и лактата. Ингаляции оксида азота в концентрации 100 ppm способствовали увеличению удельной активности каталазы, которое следует рассматривать как адаптивное изменение в ответ на хроническое действие NO. Показано, что NO во всех исследуемых концентрациях на 30 сутки после применения обладал токсическими свойствами, проявляющимися в снижении активности альдегиддегидрогеназы. Максимальный токсический эффект выявлен при использовании NO в концентрации 100 ppm, при которой наряду с уменьшением удельной активности альдегиддегидрогеназы отмечено наибольшее ингибирование каталитических свойств лактатдегидрогеназы. В восстановительном периоде после отмены окислительных нагрузок (60 суток) в крови сохранились признаки гипергликемии. При использовании NO в концентрации 20 ppm отмечено снижение уровня глюкозы и лактата в эритроцитах, повышение коэффициента баланса энергетических реакций. В отдаленные сроки (спустя 60 суток) после применения NO отмечено повышение детоксикационных (альдегиддегидрогеназа) и антиоксидантных резервов (каталаза) крови. Менее травмирующий эффект на исследуемые параметры энергетического метаболизма оказал NO в концентрации 20 ppm.

Ключевые слова: оксид азота, кровь, лактат, глюкоза, альдегиддегидрогеназа, каталаза, лактатдегидрогеназа.

Введение. В настоящее время большое внимание уделяется изучению роли оксида азота (NO) и возможности его использования. Известно, что NO приводит к релаксации кровеносных сосудов и гладкомышечной ткани, обладает нейромодулирующей, противоопухолевой, антиоксидантной и детоксикационной активностью, регулирует синтез и секрецию гормонов, активность тромбоцитов [1, 2].

В течение многих лет в клинической практике применяют вводимые в организм экзогенно такие доноры NO, как нитроглицерин и его аналоги [1]. Наряду с этим, широкое распространение получает ингаляционная терапия NO, которая была с успехом применена в эксперименте и клинике для лечения легочной гипертензии новорожденных, при респираторном дистрессе, идиопатической легочной гипертензии, вызываемой

СОЛОВЬЕВА Анна Геннадьевна – к.б.н., «ПИМУ» Минздрава России, e-mail: sannag5@mail.ru

ДИДЕНКО Наталья Владимировна, «ПИМУ» Минздрава России, e-mail: Natalika-nv@mail.ru

БЕЛЯЕВА Ксения Леонидовна, «ПИМУ» Минздрава России, e-mail: skoln94@mail.ru

заболеваниями сердца, при предоперационной подготовке [2, 3]. При проведении ингаляций NO обычно используют концентрации от 10 до 40 ppm, время ингаляции при каждой процедуре не превышает 10 минут. При использовании высоких доз ингаляционного NO (> 100 ppm) возможно повышение уровня токсичных метаболитов NO [4]. Поэтому ингаляция оксида азота – процедура, которая при передозировке NO может привести к развитию тяжелых осложнений [1]. Токсический эффект NO обусловлен тем, что его применение инициирует свободно-радикальное окисление, активирует процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран, в результате развивается окислительный стресс [5].

В связи с вышеизложенным, очевидна необходимость определения терапевтических доз ингаляционного NO, а также изучения характера их длительного воздействия на организм. Цель данной работы – исследование влияния NO в концентрациях 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm на энергетический и окислительный метаболизм крови интактных крыс при его длительном ингаляционно-наружном применении.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на белых крысах-самцах линии Wistar. Все животные содержались в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, согласно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». Условия работы с животными соответствовали правилам Европейской Конвенции ET/S 129, 1986 и директивам 86/609 ESC.

Из 38 крыс массой 200-250 г. сформировали 7 групп: 1 – контроль (интактные здоровые животные, n=8); 2, 3, 4 – опытные (по n=5 в каждой), крысы которой были подвергнуты воздействию NO с концентрацией 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm соответственно в течение 30 дней; 5, 6 и 7 – опытные (по n=5 в каждой), животные которой на протяжении 30 суток ингалировались NO с концентрацией 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm соответственно и затем 30 суток не подвергались никаким манипуляциям. Крыс 2, 3 и 4 групп выводили из эксперимента на 30-е сутки

путем декапитации под комбинированным наркозом (Золетил (60 мг/кг) + Ксила(6 мг/кг)), животных 5, 6, 7 групп – на 60-е сутки. Ингаляционно-наружное воздействие NO на животных осуществляли в эксикаторе ежедневно по 10 минут в течение 30 дней. Синтез газовой смеси производили с помощью экспериментального аппарата для генерации NO, разработанного в Российском федеральном ядерном центре, Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной физики (г. Саров) [6].

Для исследований использовали кровь, стабилизированную цитратом натрия (1:9). Концентрацию глюкозы и лактата измеряли на приборе Super GL ambulance (Германия) в плазме и эритроцитах крови. В гемолизате эритроцитов определяли активность каталазы [7], альдегиддегидрогеназы (АлДГ) [8] и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Активность ЛДГ в прямой реакции (ЛДГпр) оценивали с использованием в качестве субстрата 50 мМ лактат натрия, в обратной реакции (ЛДГобр) – с использованием 23 мМ пирувата натрия [9]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури в модификации [10]. Для выявления нарушений энергетического метаболизма рассчитывали коэффициент баланса энергетических реакций (КБЭР): $КБЭР = (ЛДГпр/ЛДГобр) / (ЛДГобр/ЛДГпр) \times 100$ [9]. Активность оксидоредуктаз, количество белка определяли на спектрофотометре Power Wave XS (Bio-Tek, USA). Результаты исследований обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0. Значимость различий между показателями определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Показано, что 30-дневное ингаляционно-наружное применение NO у животных 2, 3 и 4 групп привело к росту уровня глюкозы в плазме и эритроцитах крови по сравнению с показателями интактных крыс. На протяжении восстановительного периода после отмены окислительных нагрузок (60 суток) в плазме отмечено повышение концентрации глюкозы при использовании 20 ppm NO (на 9% ($p=0,879$)) и 50 ppm NO (на 23% ($p=0,026$)) по сравнению с параметром крыс 2 и

Концентрация глюкозы и лактата в крови крыс при хроническом воздействии оксида азота

Показатель		Глюкоза, ммоль/л		Лактат, ммоль/л	
		плазма	эритроциты	плазма	Эритроциты
Контроль		7,16±0,09	0,79±0,11	1,78±0,14	0,93±0,05
20 ppm NO	30 сутки	15,28±0,39*	2,89±0,25*	4,01±0,26*	3,35±0,21*
	60 сутки	16,48±0,42*	2,11±0,13*/**	5,23±0,31*/**	1,62±0,11*/**
50 ppm NO	30 сутки	13,07±0,12*	1,95±0,12*	2,08±0,12	2,43±0,23*
	60 сутки	16,09±0,16*/**	1,94±0,09*	1,70±0,08**	1,34±0,08*/**
100 ppm NO	30 сутки	13,53±0,21*	1,69±0,06*	1,75±0,06	1,25±0,07*
	60 сутки	13,23±0,11*	2,01±0,11*/**	1,33±0,10*/**	2,11±0,22*/**

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** - различия статистически значимы по сравнению с 30 сутками ($p < 0,05$).

3 группы соответственно, что превысило значение здоровых животных в 5 группе в 2,3 раза ($p=0,001$), в 6 группе – в 2,2 раза ($p=0,001$), в 7 группе – в 1,8 раза ($p=0,003$). В эритроцитах крови животных 7 группы уровень глюкозы также вырос на 19% ($p=0,022$) по сравнению с показателем крыс 4 группы, при этом в 5 группе концентрация глюкозы уменьшилась на 27% ($p=0,013$) по сравнению со значением крыс 2 группы (табл. 1). Однако у животных 5, 6 и 7 групп содержание глюкозы в эритроцитах превышало показатель здоровых животных при использовании 20 ppm NO в 2,7 раза ($p < 0,001$), при 50 ppm – в 2,5 раза ($p=0,002$), при 100 ppm – в 2,5 раза ($p < 0,001$). Выявленную гипергликемию можно рассматривать как энергетическое подкрепление со стороны крови на длительное применение NO в результате активации процессов гликолиза, глюконеогенеза и гликогенолиза. Рост уровня глюкозы под влиянием NO, вероятно, обусловлен угнетением глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, участвующей в утилизации глюкозы, и повышением секреции глюкокортикоидов, которые стимулируют печеночный глюконеогенез с увеличением образования глюкозы из неуглеводистых продуктов – аминокислот и жирных кислот. Снижение распада глюкозы может привести к накоплению лактата.

Установлено, что применение газообразного NO на протяжении 30 суток привело к повышению содержания лактата в плазме крови лишь при концентрации 20 ppm в 2,25 раза

($p=0,007$) по сравнению с интактными животными. У крыс 5 группы концентрация лактата в плазме возросла на 30% ($p=0,015$) по сравнению с показателем крыс 2 группы. У животных 6 и 7 групп отмечено снижение уровня лактата в плазме на 18% ($p=0,034$) и 24% ($p=0,027$) соответственно по сравнению с концентрацией лактата животных 3 и 4 групп. Ингаляционно-наружное использование NO в течение 30 суток вызвало увеличение уровня молочной кислоты в эритроцитах при всех используемых концентрациях NO (табл. 1), в результате уменьшается pH крови и снижается концентрация бикарбоната, приводя к развитию метаболического ацидоза. На протяжении восстановительного периода после отмены окислительных нагрузок NO (60 суток) в эритроцитах отмечено снижение уровня лактата при использовании 20 ppm NO (в 2 раза ($p=0,005$)) и 50 ppm NO (в 1,8 раза ($p=0,016$)) по сравнению с параметром крыс 2 и 3 группы соответственно, что, однако, превысило показатель здоровых животных в 5 группе на 76% ($p=0,001$), в 6 группе – на 44% ($p=0,008$). При использовании 100 ppm NO концентрация лактата в эритроцитах крови крыс 7 группы оказалась выше значений лактата животных контрольной и 4 группы в 2,3 раза и 1,7 раза.

Исследование активности ЛДГ, катализирующей обратимое превращение лактата в пируват, показало, что воздействие NO на протяжении 30 суток в концентрации 20 ppm имело тенденцию к снижению активности ЛДГ пр на

Активность лактатдегидрогеназы и коэффициент баланса энергетических реакций в эритроцитах крови крыс при хроническом воздействии оксида азота

Показатель		ЛДГпр, нмоль-НАДН/мин×мг белка	ЛДГобр, нмоль-НАДН/мин×мг белка	КБЭР
Контроль		73,45±3,21	91,97±4,01	63,82±1,72
20 ppm NO	30 сутки	70,71±4,08	101,01±5,98	48,99±2,32*
	60 сутки	93,74±3,81*/**	84,79±1,95**	122,21±3,82*/**
50 ppm NO	30 сутки	38,58±1,56*	75,83±4,12*	25,89±3,03*
	60 сутки	75,83±3,42**	60,46±2,61*/**	157,34±2,99*/**
100 ppm NO	30 сутки	58,42±1,67*	40,98±3,05*	203,42±5,64*
	60 сутки	48,73±1,87*/**	64,43±2,04*/**	57,19±1,09**

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** - различия статистически значимы по сравнению с 30 сутками ($p < 0,05$).

4% и повышению ЛДГобр на 10% по сравнению с интактными животными (табл. 2). У животных 3 и 4 групп выявлено снижение активности ЛДГпр и ЛДГобр по сравнению с контролем. В отдаленные сроки (60 суток) после применения NO отмечено повышение активности ЛДГпр и снижение ЛДГобр при использовании 20ppm – на 33% ($p=0,016$) и 16% ($p=0,031$) соответственно, при 50 ppm – на 97% ($p < 0,001$) и 20% ($p=0,037$) по сравнению с показателями крыс 2 и 3 групп, что способствует уменьшению концентрации лактата в эритроцитах. В 7 группе удельная активность ЛДГпр уменьшилась на 17% ($p=0,040$), активность ЛДГобр возросла на 57% ($p=0,008$) по сравнению с активностью ЛДГ 4 группы, вызывая повышение лактата.

КБЭР при воздействии NO в течение 30 суток в концентрации 20 ppm оказался ниже КБЭР здоровых крыс на 23% ($p=0,035$), что свидетельствует о нарушении энергетического метаболизма (табл. 2). КБЭР снизился на 59% под воздействием 50 ppm NO ($p=0,001$) по сравнению с контролем. Уменьшение КБЭР способствует увеличению лактата в эритроцитах, который образуется преимущественно М-формой ЛДГ (ЛДГобр). У животных 5 и 6 группы КБЭР вырос при 20 ppm NO (в 2,5 раза ($p=0,001$)) и 50 ppm NO (в 6 раз ($p < 0,001$)) по сравнению с КБЭР крыс 2 и 3 группы соответственно, превысив значение КБЭР здоровых животных в 5 группе в 1,9 раза ($p=0,007$), в 6 группе – в 2,5 раза ($p=0,001$).

Выявлено, что при хроническом воздействии 100 ppm NO (30 суток) КБЭР оказался выше показателя здоровых животных в 3,2 раза ($p=0,001$), что может привести к повышению содержания пировиноградной кислоты, которая образуется преимущественно Н-ЛДГ формой (ЛДГпр). Важная роль пирувата заключается в конверсии его в ацетил-коэнзим-А в митохондриях, который затем метаболизируется в цикле Кребса с последующим окислительным фосфорилированием с образованием основного источника энергии – аденозинтрифосфата [9]. У животных 7 опытной группы КБЭР уменьшился в 3,5 раза ($p=0,002$) по сравнению с КБЭР крыс 4 группы, достигнув значения контрольных животных.

Восстановление пирувата в лактат сопровождается одновременным окислением алкоголя в ацетальдегид при помощи НАДН, который действует как переносчик водорода. В ходе проведенного исследования выявлено снижение активности АлДГ у животных 2, 3 и 4 группы на 25% ($p=0,041$), 30% ($p=0,023$) и 24% ($p=0,012$) соответственно по сравнению с контролем (рис. 1). Снижение активности АлДГ может привести к срыву всей системы детоксикации, вызывая уменьшение защиты эритроцитов от окислительного действия эндотоксинов. У животных 5, 6 и 7 группы отмечено повышение удельной активности АлДГ и по сравнению с активностью фермента 2, 3, 4 групп соответственно, и по сравнению с контролем: при 20 ppm – в 3,3 раза

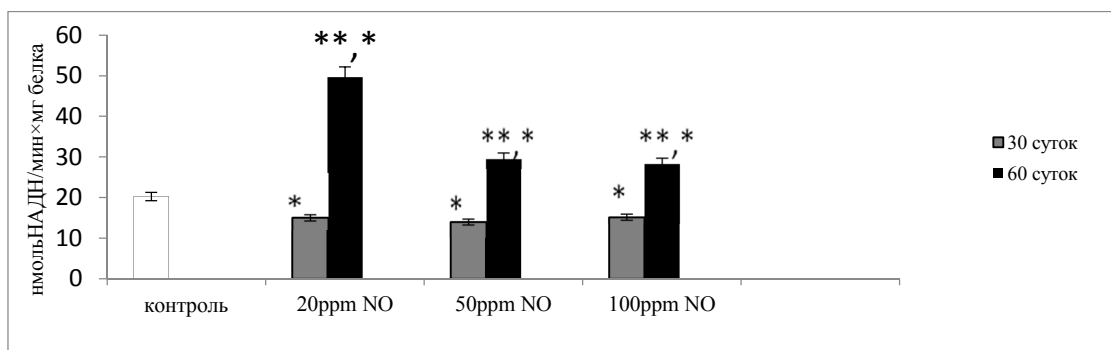


Рис. 1. Активность альдегиддегидрогеназы в эритроцитах крови крыс при хроническом воздействии оксида азота. Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** - различия статистически значимы по сравнению с 30 сутками ($p < 0,05$)

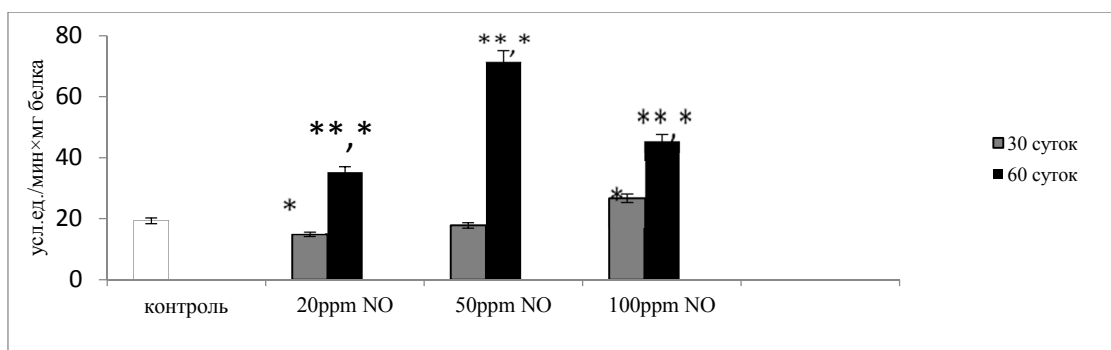


Рис. 2. Активность каталазы в эритроцитах крови крыс при хроническом воздействии оксида азота. Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** - различия статистически значимы по сравнению с 30 сутками ($p < 0,05$)

($p < 0,001$) и 2,5 раза ($p < 0,001$), при 50 ppm – в 2 раза ($p = 0,002$) и 1,5 раза ($p = 0,021$), при 100 ppm – в 1,8 раза ($p = 0,004$) и 1,4 раза ($p = 0,031$).

Увеличение альдегидов может происходить также вследствие повышения активности каталазы, участвующей в окислении эндогенных спиртов. Обладая пероксидазной активностью, каталаза защищает клеточные мембраны от действия свободных радикалов. Снижение активности каталазы у крыс 2 группы (на 23%, $p = 0,015$) свидетельствует об уменьшении антиоксидантных ресурсов эритроцитов. Под влиянием 100 ppm NO показано адаптивное повышение активности каталазы на 40% ($p = 0,012$) по сравнению с контролем, обеспечивая защиту клеточных структур от разрушительного действия перекиси водорода, но также может привести к накоплению высокотоксичных метаболитов (рис. 2).

У животных 5, 6 и 7 группы отмечено повышение удельной активности каталазы и по сравнению с активностью фермента 2, 3, 4 групп соответственно, и по сравнению с контролем:

при 20 ppm – в 2,4 раза ($p = 0,007$) и 1,8 раза ($p = 0,033$), при 50 ppm – в 4 раза ($p < 0,001$) и 3,7 раза ($p < 0,001$), при 100 ppm – в 1,7 раза ($p = 0,016$) и 2,4 раза ($p = 0,026$) (рис. 2).

Таким образом, после отмены ингаляций NO наблюдалось восстановление ряда биохимических показателей крови. Менее травмирующий эффект на исследуемые параметры энергетического метаболизма оказал NO в концентрации 20 ppm.

Выводы. 1. В условиях хронического эксперимента подтвержден дозозависимый эффект действия NO.

2. При ингаляционно-наружном применении NO на протяжении 30 суток в концентрациях 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm выявлено снижение активности АлДГ, повышение концентрации глюкозы и лактата в плазме и эритроцитах. Ингаляции NO в концентрации 100 ppm способствовали увеличению активности каталазы. Максимальный токсический эффект выявлен при использовании NO в концентрации 100 ppm,

при которой наряду с уменьшением удельной активности АлДГ отмечено наибольшее ингибирование ЛДГ.

3. В восстановительном периоде после отмены окислительных нагрузок (60 суток) в крови сохранились признаки гипергликемии, но отмечено повышение детоксикационных (АлДГ) и антиоксидантных резервов крови. При использовании NO в концентрации 20 ppm отмечено снижение уровня глюкозы и лактата в эритроцитах, повышение КБЭР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малахов В.А., Завгородняя А.Н., Лычко В.С., Джанелидзе Т.Т., Волох Ф.А. Проблема оксиду азоту в неврологии. Видавництво СумДПУ им. А.С.Макаренка, Суми, 2009. 242 с.

2. Breatnach C.R., Flanagan F., James A., Corcoran J.D., Franklin O., El-Khuffash A. The Use of Inhaled Nitric Oxide in a Tertiary Neonatal Intensive Care Unit // *Ir. Med J.* 2015. Vol. 108, № 9. P. 275-278.

3. Grasmann H, Gonska T, Avolio J, Klingel M, Tullis E, Ratjen F. Effect of ivacaftor therapy on exhaled nitric oxide in patients with cystic fibrosis // *J. Cyst. Fibros.* 2015. Vol. 14, № 6. P. 727-732.

4. Terpolilli N.A., Kim S.W., Thal S.C., Kuebler W.M., Plesnila N. Inhaled nitric oxide reduces secondary brain damage after traumatic brain injury in mice // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2013. Vol. 33, № 2. P. 311-318.

5. Pierini D., Bryan N.S. Nitric oxide availability as a marker of oxidative stress // *Methods Mol. Biol.* 2015. № 1208. P. 63-71.

6. Способ получения газовой смеси, содержащей окись азота: пат. 2593297. Рос. Федерация. № 2014154213/05, заявл. 29.12.2014; опубл. 10.08.2016. Бюл. № 22. 3 с.

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

8. Кершенгольц Б.М., Ильина Л.П. Биологические аспекты алкогольных патологий и наркоманий. Издательство ЯГУ, Якутск, 1998. 150с.

9. Соловьева А.Г., Зимин Ю.В. Новый способ

оценки динамики метаболизма крови у больных с термической травмой // *Современные технологии в медицине*, 2012. № 2. С. 116 – 117.

10. Waterborg J.H., Matthews H.R. The Lowry method for protein quantitation // *Methods Mol. Biol.* 1994. Vol. 32, №1, P. 1-4.

References

1. Malahov V.A., Zavgorodnjaja A.N., Lychko V.S., Dzhanelidze T.T., Voloh F.A. Problema oksidu azotu v nevrologii. Vidavnicтво SumDPU im. A.S. Makarenka, Sumi, 2009. 242 s.

2. Breatnach C.R., Flanagan F., James A., Corcoran J.D., Franklin O., El-Khuffash A. The Use of Inhaled Nitric Oxide in a Tertiary Neonatal Intensive Care Unit // *Ir. Med J.* 2015. Vol. 108, № 9. P. 275-278.

3. Grasmann H, Gonska T, Avolio J, Klingel M, Tullis E, Ratjen F. Effect of ivacaftor therapy on exhaled nitric oxide in patients with cystic fibrosis // *J. Cyst. Fibros.* 2015. Vol. 14, № 6. P. 727-732.

4. Terpolilli N.A., Kim S.W., Thal S.C., Kuebler W.M., Plesnila N. Inhaled nitric oxide reduces secondary brain damage after traumatic brain injury in mice // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2013. Vol. 33, № 2. P. 311-318.

5. Pierini D., Bryan N.S. Nitric oxide availability as a marker of oxidative stress // *Methods Mol. Biol.* 2015. № 1208. P. 63-71.

6. Способ получения газовой смеси, содержащей окись азота: пат. 2593297. Рос. Федерация. № 2014154213/05, заявл. 29.12.2014; опубл. 10.08.2016. Бюл. № 22. 3 с.

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

8. Кершенгольц Б.М., Ильина Л.П. Биологические аспекты алкогольных патологий и наркоманий. Издательство ЯГУ, Якутск, 1998. 150с.

9. Solovyova A.G., Zimin Yu.V. A New Estimation Method of Blood Metabolism Dynamics of Patients with Heat Injuries // *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2012. № 2. P. 116 – 117.

10. Waterborg J.H., Matthews H.R. The Lowry method for protein quantitation // *Methods Mol. Biol.* 1994. Vol. 32, №1, P. 1-4.



THE EVALUATION OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF RATS BLOOD DURING LONG INHALATION APPLICATION OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF NITRIC OXIDE

© A.G. Soloveva, N.V. Didenko, K.L. Belyaeva

«Privolzhsky Research Medical University»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
10/1, Minin and Pozharsky Square, 603005, Nizhny Novgorod, Russian Federation

The metabolic characteristics of blood of animals subjected to prolonged inhalation external exposure of nitric oxide at concentrations of 20 ppm, 50 ppm and 100 ppm were investigated. The experiment was made on Wistar rats. Inhalation of NO was carried out for 30 days. The state of energy metabolism of blood was evaluated after 30 days and after the recovery period after the abolition of oxidative loads of NO (60 days). In the blood the content of glucose and lactate, the activity of catalase, aldehyde dehydrogenase and lactate dehydrogenase were determined. It was shown that prolonged use of NO at concentrations of 20 ppm, 50 ppm and 100 ppm caused an increase of glucose and lactate. Inhalation of nitric oxide at a concentration of 100ppm contributed to the increase of the specific activity of catalase, which should be seen as an adaptive change in response to chronic action NO. It was shown that inhalation-external application of NO for 30 days in all studied concentrations had toxic properties, led to the decrease in the activity of aldehyde dehydrogenase. Maximum toxic effect was detected when using a NO in concentration of 100 ppm. In case of 100 ppm NO the decrease of the specific activity of aldehyde dehydrogenase and inhibition of catalytic properties of lactate dehydrogenase was marked. During the recovery period after the abolition of oxidative stress (60 days) in the blood signs of hyperglycemia were preserved. When using NO in concentrations of 20 ppm a reduction of glucose and lactate in erythrocytes, the increase of the coefficient of balance of energy reactions were marked. In long-term (after 60 days) after the application of NO detoxification (aldehyde dehydrogenase) and antioxidant reserves of blood (catalase) were increased. NO at a concentration of 20ppm had minimum traumatic effect on the studied parameters of energy metabolism.

Key words: nitric oxide, blood, lactate, glucose, aldehyde dehydrogenase, catalase, lactate dehydrogenase.

УДК 581: 633.11

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-43-51

**ФОТОМОРФОГЕНЕЗ ЭМБРИОГЕННЫХ КАЛЛУСОВ ПШЕНИЦЫ
В УСЛОВИЯХ ЭДАФИЧЕСКИХ СТРЕССОВ**

© Н.В. Терлецкая, В.Ю. Ступко, А.Б. Искакова, Н.В. Зобова, Н.А. Гаевский

Проведен анализ процессов фотоморфогенеза у каллусов различных по уровню пloidности видов озимой пшеницы *T. monococcum* L. (Aⁿ), *T. polonicum* L. var. *villosum* (AⁿB) и *Triticum aestivum* L. (AⁿBD), полученных из незрелых и зрелых зародышей при двух уровнях ауксина. Фотосинтетическая активность каллусных тканей исследована в динамике культивирования *in vitro* на среде для пролиферации как в оптимальных условиях, так и в условиях эдафических стрессов (засоление – NaCl, 0,63% и засуха – полиэтиленгликоль 6000, 16% вес/объем). Данные, зарегистрированные в режиме записи «световой кривой» при плотности потока фотонов возбуждающего света 20 мкмоль×м⁻²×с⁻¹, были включены в анализ таких фотосинтетических параметров, как эффективный квантовый выход фотосинтеза фотосистемы II Y(II), квантовый выход нерегулируемого рассеяния энергии Y(NO) и квантовый выход регулируемого рассеяния энергии Y(NPQ). Проведены морфометрические и цитологические исследования каллусных культур. Выявлены видоспецифические различия по окраске и плотности тканей каллусов, сформировавшихся на первом этапе. Каллусы, полученные из незрелых зародышей, активно фотосинтезировали уже на момент пассирования на среду для пролиферации. В оптимальных условиях на этапе пролиферации каллусов отмечали активное образование хлорофилл содержащих областей (ХСО), и наличие двух пиков фотосинтетической активности каллусов на 7-е и 15-е сутки, схожее с таковым у яровых форм мягкой пшеницы, исследованных нами ранее. Цитологический анализ тканей каллусов показал, что стрессовое воздействие на этапе пролиферации приводит к процессам плазмолиза, дегенерации фотоморфогенных тканей и разрушению ХСО, прежде всего, в каллусах менее устойчивых к стрессу форм. В целом, наиболее активные процессы фотоморфогенеза в стрессовых условиях отмечены у каллусов, характеризовавшихся относительно небольшим увеличением биомассы клеточных колоний. Показано, что с учетом сниженного уровня индукции каллусогенеза и фотосинтетической активности, большого разброса ее значений у каллусов, полученных из зрелых эмбрионов, для цели получения фотосинтетической активной каллусной культуры у большинства исследованных видов более пригодны незрелые эмбрионы.

Ключевые слова: виды пшеницы, эдафические стрессы, фотоморфогенез, каллусы, световая кривая.

ТЕРЛЕЦКАЯ Нина Владимировна – к.б.н., Институт биологии и биотехнологии КН МОН РК,
e-mail: teni02@mail.ru

СТУПКО Валентина Юрьевна – к.с.-х.н., Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», e-mail: stupko@list.ru

ИСКАКОВА Ажар Батырбековна – к.б.н., Институт биологии и биотехнологии растений КН МОН РК, e-mail: i_azhar@mail.ru

ЗОБОВА Наталья Васильевна – д.с.-х.н., Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», e-mail: zobovnat@mail.ru

ГАЕВСКИЙ Николай Александрович – д.б.н., Сибирский федеральный университет,
e-mail: nikgna@gmail.com

Каллусные культуры уже многие годы являются удобным модельным объектом для исследования ряда физиологических процессов, происходящих в клетках растений, в том числе – и под действием различных стрессоров. В ряде исследований показана универсальность начального этапа всех путей морфогенеза *in vitro*, включающих эмбриоидогенез, органогенез (геммогенез, ризогенез, гемморизогенез) и гистогенез [1, 2]. Однако единых правил определения внешних факторов культивирования, способствующих формированию и развитию специализированных систем клеток, до сих пор не существует, как не существует единой методики оптимизации параметров культивирования растительных клеток. Получение культуры растительных клеток, осуществляющей питание и поддерживающей рост исключительно за счет углерода воздуха, является непростой задачей. Большинство содержащих хлорофилл клеток на среде без углеводов обнаруживают низкую скорость роста или культивируются лишь в течение короткого периода времени, хотя формируют хлоропласты и проявляют фотосинтетическую активность [3]. Число работ, посвященных изучению физиологии фотосинтезирующих клеток картофеля и пшеницы *in vitro*, не велико [4–7].

Поскольку эмбриогенез представителей семейства *Poaceae* – это фотоморфофизиологический процесс, выяснение того, как стрессовые условия влияют на процесс фотоморфогенеза *in vitro* носит как прикладное значение, в плане разработки новых тестовых методик оценки стрессоустойчивости в лабораторных условиях, так и фундаментальное – выявление цитофизиологических условий формирования фотоавтотрофных каллусов зародышевого происхождения, тотипотентные клетки которых способны развиваться по различным путям морфогенеза *in vitro*. Фотосинтетические возможности растительных клеток определяются структурной и биохимической организацией фотосинтетического аппарата. Как *in vivo*, так и *in vitro* клетки на свету, синтезируя хлорофилл, могут приобрести и способность к фотосинтетическому усвоению углерода, то есть к осуществлению характерного для интактного растения фотоавтотрофного способа питания [8]. В связи с этим исследование становления *in vitro* фотосинтетической

функции, т.е. фотоавтотрофности, при различной комбинации факторов культивирования является необходимым для понимания природы реакций фотосинтетического аппарата изолированных тканей на стрессоры. Знание этих механизмов позволит более полно охарактеризовать связь фотосинтетических параметров *in vivo* и *in vitro*. Поэтому целью данной работы был анализ процессов фотоморфогенеза у каллусов различных видов пшеницы, индуцированных из незрелых и зрелых эмбрионов, и влияния на фотоморфогенез таких эдафических стрессов как засуха и избыточное засоление.

Материал и методы исследования. Материалом для исследований служили виды пшениц: *T. monococcum* L.(A^u), *T. polonicum* L. var. *villosum* (A^uB) и *Triticum aestivum* L. (A^uBD) – сорт Саратовская 29. Выбор этих видов обусловлен их различиями по уровню пloidности, геномному составу, степени их засухо- и солеустойчивости.

Каллусы получены из незрелых и зрелых зародышей на двух вариантах среды для индукции, различающихся по концентрации 2,4-Д (2.0 и 4.0 мг/л для незрелых, 4.0 и 6.0 мг/л для зрелых зародышей). После 30-дневного культивирования каллусов *in vitro* осуществляли фиксацию уровней флуорисценции каллусных тканей: сразу после пассирования их на среду для пролиферации и затем на третьи, седьмые и пятнадцатые сутки культивирования как в оптимальных условиях, так и в условиях эдафических стрессов (засоление – NaCl, 0.63% и засуха – полиэтиленгликоль 6000, 16% вес/объем). Использовали ПАМ-флуориметр IMAGING-PAM M-Series MAXI Version (HeinzWalzGmbH, Германия) в режиме записи световой кривой фотосинтеза (СКФ): плотность потока фотонов (ППФ) возбуждающего света от 20 до 395 мкмоль×м²×с⁻¹; экспозиция между импульсами 30 сек. Для удобства анализа динамики показателей фотосинтетической активности (ФА), Y(II) – эффективного квантового выхода фотосинтеза фотосистемы II, Y(NO) – квантового выхода нерегулируемого рассеяния энергии и Y(NPQ) – квантового выхода регулируемого рассеяния энергии, были выбраны значения, полученные при плотности потока фотонов 20 мкмоль×м²×с⁻¹.

Характеристики культуры незрелых зародышей различных видов пшеницы

Виды	Концентрация 2,4-Д, мг/л									
	2.0					4.0				
	доля образцов			размеры, мм		доля образцов			размеры, мм	
	с индукцией каллусогенеза	с индукцией побегообразования	с ХСО	диаметра каллуса	длины побега	с индукцией каллусогенеза	с индукцией побегообразования	с ХСО	диаметра каллуса	длины побега
<i>T. monococcum</i> (A ^u)	1.00	0.50	0.0 0	5.50 ± 0.28	3.62 ± 0.33	1.00	0.37	0.4 4	5.41 ± 0.32	6.50 ± 0.81*
<i>T. polonicum</i> (A ^u B)	1.00	0.84	0.9 4	4.93 ± 0.13 ^a	13.86 ± 1.94	-	-	-	-	-
<i>T. aestivum</i> (A ^u BD)	1.00	0.82	0.8 8	5.75 ± 0.10	58.72 ± 3.82 ^b	1.00	0.26	0.4 4	5.61 ± 0.12	8.65 ± 2.93*

Примечание. Достоверные отличия между видами а – P<0.05, б – P<0.01. достоверные отличия между уровнями 2,4-Д * - P<0.01

Цитологические исследования каллусных тканей проводили на давленных временных препаратах. Материал фиксировали в свежеприготовленном реактиве Кларка (3 части 96% этилового спирта: 1 часть ледяной уксусной кислоты), где и хранили в течение 12-24 часов. Цитологические препараты изучали с помощью микроскопа «Micros» (Австрия), фотографировали с использованием видеокамеры YONGXINOPTICS CAMV200 и компьютерной программы YONGXINOPTICS ScopePhoto версии 2.4 при увеличении объектива х40.

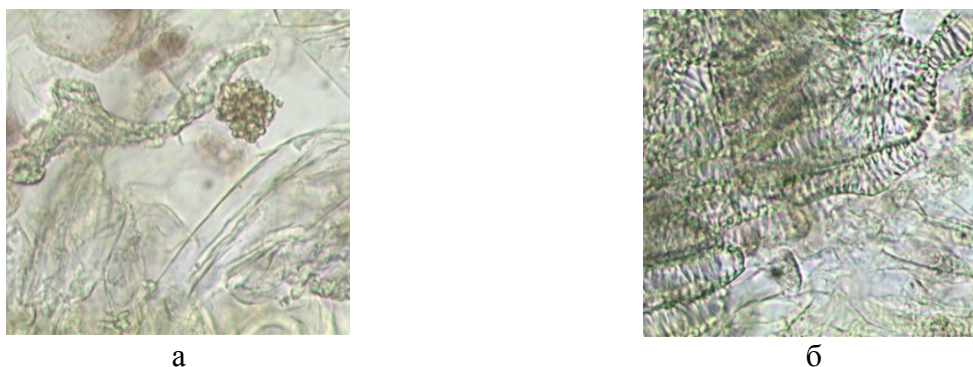
Статистическая обработка результатов сделана с использованием программы «Statistica 6.0». Для всех показателей рассчитывали среднюю величину и стандартную ошибку, достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Незрелые зародыши исследуемых видов пшеницы оказались весьма отзывчивы на воздействие 2,4-Д. Частота каллусогенеза составила 100% вне зависимости от концентрации гормона в среде для индукции (таблица 1).

Однако, видовая принадлежность сказалась на окраске и плотности тканей, сформировавшихся на первом этапе каллусов. К моменту пассирования на среды для пролиферации, имитирующие эдафический стресс, каллусы *T. aestivum* имели плотную структуру и бело-зеленую окраску. Каллусы *T. polonicum* отличались рыхлой водянистой структурой и желто-зеленой окраской. Образцы, полученные из незрелых зародышей *T. monococcum*, имели мягкую, водянистую консистенцию и белую окраску.

Частота побегообразования на среде для индукции с содержанием 2,4-Д 2.0 мг/л у *T. aestivum* и *T. polonicum* составила более 80%, у *T. monococcum* – лишь 50%. При этом у *T. aestivum* наблюдалось не только активное образование побегов, но и их активный рост – средняя длина которых составила 58 мм. У *T. monococcum* побеги имели значительно меньший размер.

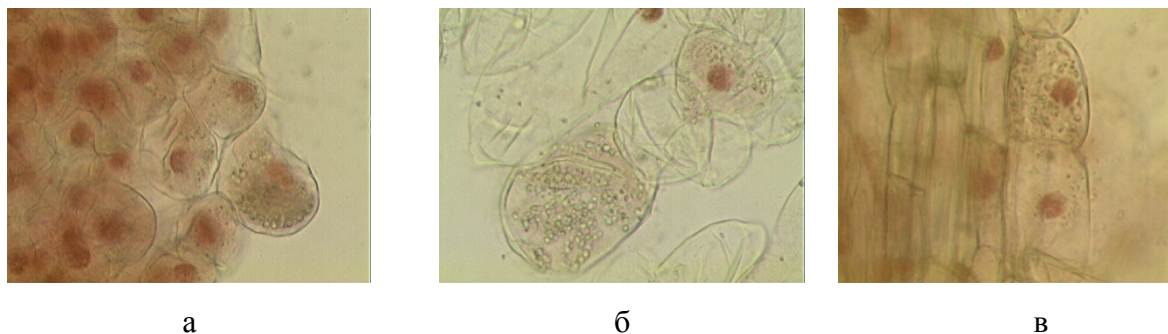
На среде с увеличенной вдвое концентрацией 2,4-Д у *T. aestivum* почти в четыре раза снизился уровень побегообразования, наряду с уменьшением длины побегов в 6 раз. У *T. monococcum* длина побегов увеличилась, а



а

б

Рис. 1. Хлорофиллсодержащие области и формирование трахееподобных структур и проводящих пучков в каллусных клетках пшеницы. а – зона формирования хлоропластов, б – зеленая зона формирования трахееподобных структур, ув. х 40



а

б

в

Рис. 2. Хлоропласты в клетках каллуса пшеницы. а – меристематические клетки, б – вакуолизованные клетки, в – структурированные клетки зоны гистогенеза, ув. х 40

доля образцов, имевших побеги, изменилась незначительно. Средний размер каллуса не зависел от концентрации фитогормона.

Процесс гистогенеза, приводящий к побегообразованию, сопровождался массовым образованием хлорофиллсодержащих областей (ХСО) и трахееподобных структур – кольчатых или спиральных образований, приобретающих зеленый окрас под воздействием света (рисунок 1).

Структура и форма хлоропластов в зонах соматического эмбриогенеза были аналогичны таковым в клетках мезофилла листа. Однако, в отличие от интактных растений, в клетках которых отмечается, как правило, пристеночное расположение хлоропластов, в каллусных клетках преобладало хаотичное расположение хлоропластов. Они обнаружены как в меристематических, так и в крупных вакуолизованных клетках (рисунок 2).

Каллусы, полученные из незрелых зародышей, активно фотосинтезировали (рисунки 3–5). При этом выявлены существенные межвидовые различия в уровнях ФА.

В отсутствие давления стрессоров на среде оптимального состава увеличение ФА каллусной культуры происходило к третьим суткам с момента пассирования у *T. polonicum* (рис. 3а) и *T. aestivum* (рис. 4а). После чего наблюдался спад эффективности фотосинтетических реакций, а к пятнадцатым суткам – вновь подъем. В графиках динамики ФА каллусов, культивируемых на стрессовых фонах, подобные пики отсутствовали. Стабильное снижение $Y(II)$ *T. polonicum* (рис. 3а) вероятно связано с большей чувствительностью ФСII каллусов данного вида к воздействию стрессора. Это также выражалось в увеличении $Y(NPQ)$ в условиях засоления и $Y(NO)$ при обоих видах стрессора. В тоже время у *T. aestivum* видимым свидетельством снижения эффективности работы фотосинтетического аппарата под действием засоления можно считать лишь увеличение $Y(NO)$, более значительное снижение $Y(NPQ)$ к 7 суткам (рис. 4а).

Отсутствие подобной динамики на графиках ФА (рис. 5) у *T. monococtum* объясняется

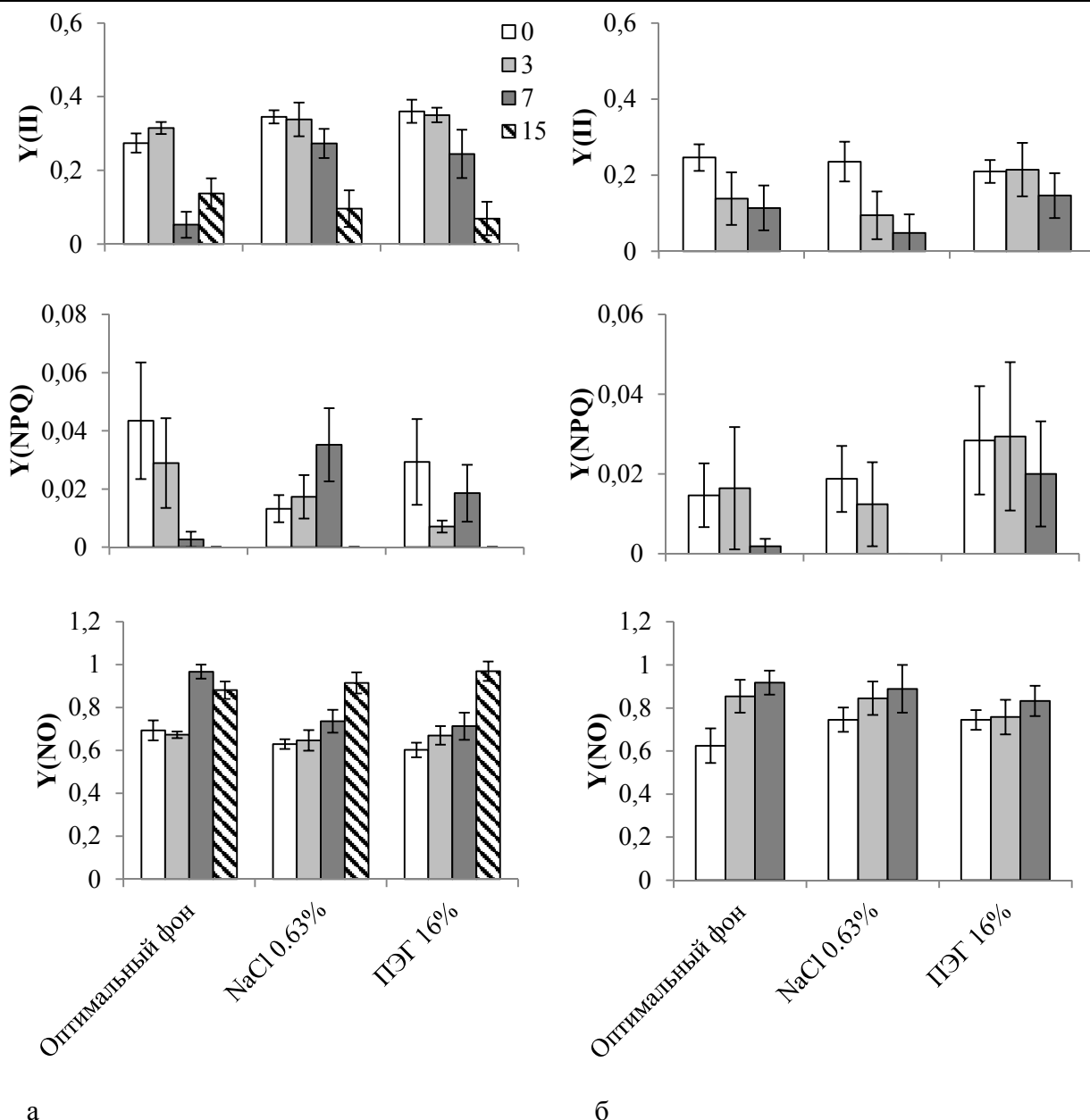


Рис. 3. Показатели ФА ФСП каллусной культуры незрелых (а) и зрелых (б) зародышей *T. polonicum* на оптимальном и стрессовых фонах (Y(II), Y(NPQ), Y(NO), отн. ед.) в день пассирования (0), на 3-и, 7-е и 15-е сутки культивирования (при ППФ ФАР 20 мкмоль \times м⁻² \times с⁻¹)

низкой регенерационной активностью у каллусов данного вида во всех описанных выше условиях культивирования, выразившейся в отсутствии или малом количестве визуально заметных ХСО (табл. 1). Это, наряду с общей низкой ФА и высокой вариабельностью данных, не позволило выявить чётких закономерностей в динамике ФА данного вида.

Цитологический анализ тканей каллусов, сформированных в условиях осмотического стресса, выявил наличие дегенерационных

процессов фотоморфогенных тканей: сначала ярко выраженный плазмолиз вакуолизированных клеток, определяющих биомассу каллусов и снижение числа этих клеток в структуре каллусной ткани, а затем – плазмолиз меристематически активных клеток, а также разрушение ХСО и трахеоподобных структур, прежде всего, у менее устойчивых форм (рис. 6).

Таким образом, почти все каллусы тетраплоида *T. polonicum* и гексаплоида *T. aestivum*, полученные из незрелых зародышей, имели ХСО,

и активно регенерировали – доля образцов с побегообразованием составила 82-84%. Характер динамики ФА этих двух видов повторил и подтвердил тенденции, отмеченные нами ранее в работах с яровой пшеницей [9]. Подтверждено наличие двух пиков ФА каллусных культур, схожее с таковым у яровых форм мягкой пшеницы, исследованных нами ранее. Вполне вероятно, что и у яровых форм второй пик связан, не с повышением ФА уже имеющихся ХСО, а с перераспределением ФА в увеличивающихся по площади ХСО. Увеличение же среднего $Y(II)$ на третьи сутки связано как с ростом площади ХСО, так и с реальным увеличением их ФА. Каллусы диплоидного вида *T. topocossut* визуально заметных ХСО не образовывали, данные

по ФА образцов этого вида имели большую вариабельность, что не позволило сделать более точных выводов о динамике их ФА.

Использование в качестве эксплантов зрелых зародышей пшеницы привело к формированию каллусов, отличающихся от описанных выше, как по структуре, так и по динамике ФА. Все каллусы имели водянистую мягкую структуру. У видов *T. polonicum* и *T. aestivum* уровень индукции каллуса был близок к 100% (табл. 2). При этом у вида *T. polonicum* отмечен высокий уровень побегообразования. У вида *T. aestivum* побегообразование наблюдали редко. Однако скорость роста побегов этих двух видов была одинаковой. Наблюдалось активное образование ХСО.

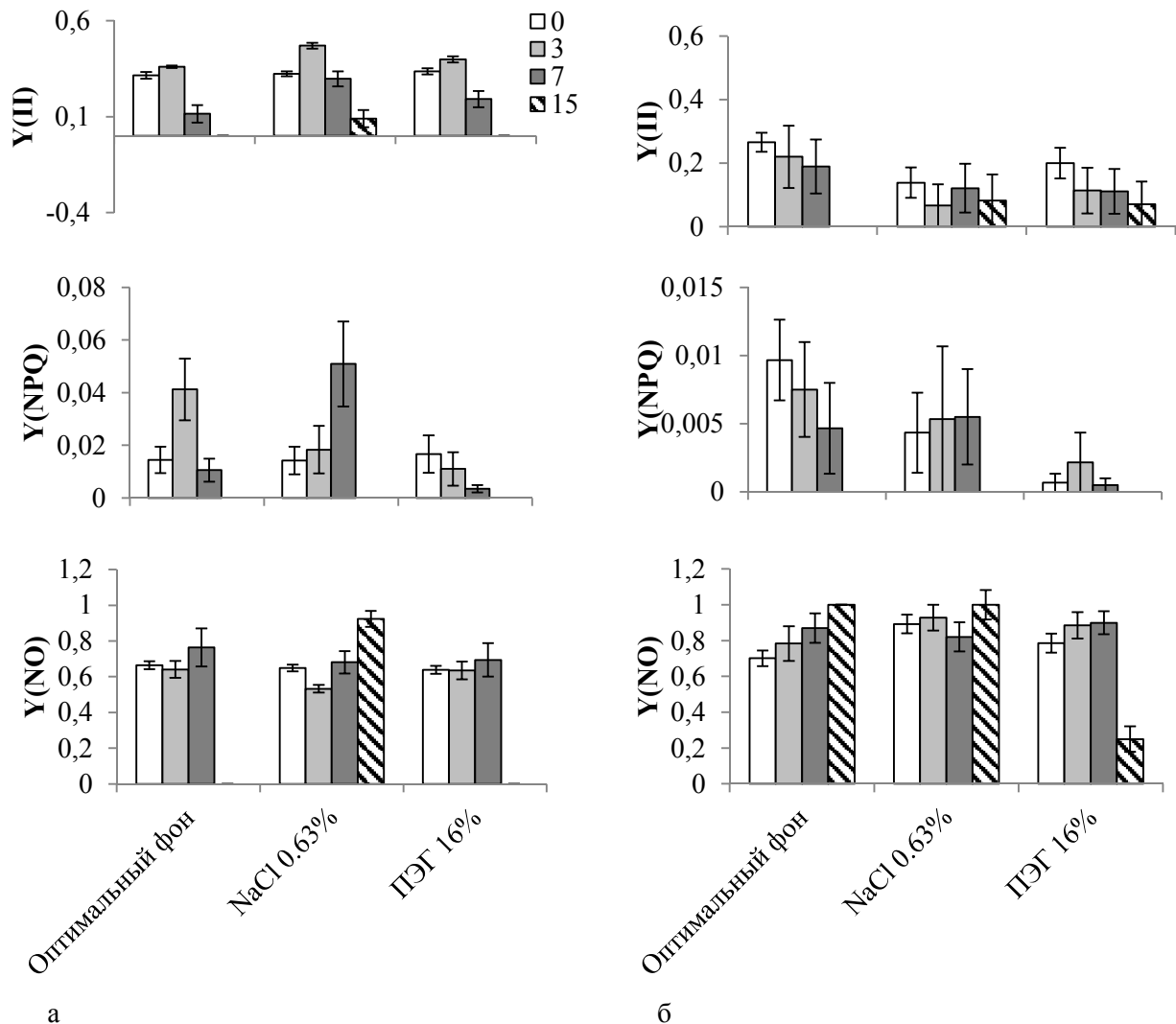


Рис. 4. Показатели ФА ФСП каллусной культуры незрелых (а) и зрелых (б) зародышей *T. aestivum* на оптимальном и стрессовых фонах ($Y(II)$, $Y(NPQ)$, $Y(NO)$ отн. ед.) в день пассирования (0), на 3-и, 7-е и 15-е сутки культивирования (при ППФ ФАР $20 \text{ мкмоль} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$)

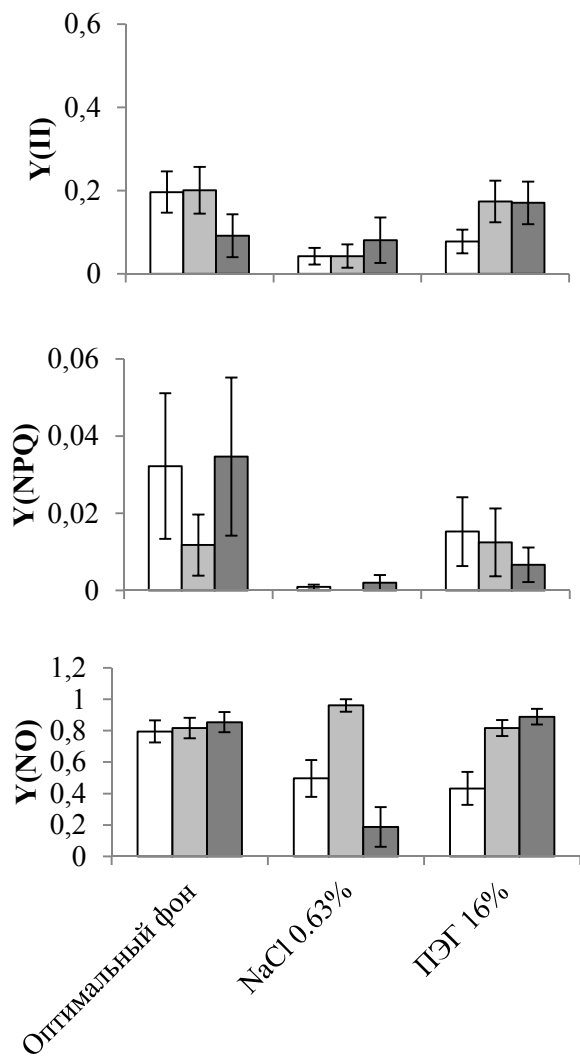


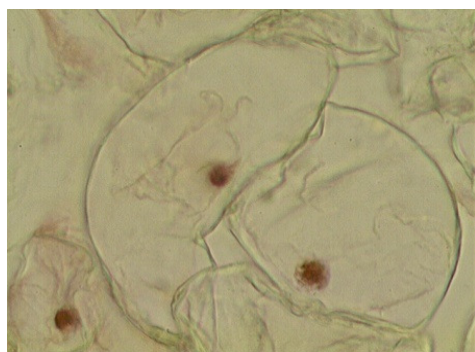
Рис. 5. Показатели ФА ФСII каллусной культуры незрелых зародышей *T. monosocum* на оптимальном и стрессовых фонах (Y(II), Y(NPQ), Y(NO) отн. ед.) в день пассирования (0), на 3-и и 7-е сутки культивирования (при ППФ ФАР $\text{мкмоль} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$)

Доля индуцированных каллусов у *T. monosocum* в сравнении с культурой незрелых зародышей уменьшилась более чем в три раза. Увеличение концентрации 2,4-Д до 6 мг/л позволило значительно повысить этот показатель. Каллусы данного вида не образовывали ХСО.

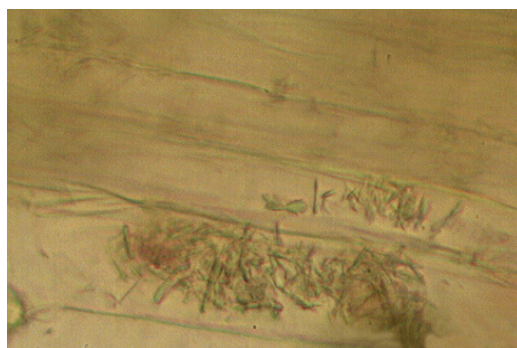
Уровни фотосинтетической активности каллусов, полученных из зрелых зародышей, имели большой разброс значений. В целом, у всех видов со временем наблюдалось снижение ФА (рисунки 3б - 4б). У вида *T. aestivum* Y(NO) возрастало со временем, а о характере изменений Y(II) из-за большого разброса значений сделать заключения не представляется возможным. По виду *T. monosocum* полученные данные настолько малочисленны, что не поддаются анализу, фотосинтез зафиксирован лишь у единичных образцов.

Характер изменений ФА *T. polonicum*, по нашему мнению, – следствие старения и деградации исследованных каллусов. Эффективность их фотохимических реакций снижалась в ходе эксперимента на всех средах, в том числе и на оптимальном фоне, а нерегулируемый сброс световой энергии увеличивался, что не позволило вычлнить эффект от стрессовых фонов. При этом отмечались низкие значения Y(NPQ). В приложении к ФА интактного растения такие данные говорят о стрессированности организма. Подобная картина, полученная на оптимальном фоне, может говорить об отсутствии активного роста ХСО.

Таким образом, для создания фотосинтезирующих каллусных культур исследованных ви-



а



б

Рис. 6. Процессы дегенерации фотоморфогенной каллусной ткани пшеницы в стрессовых условиях: а – плазмолиз в крупных вакуолизированных клетках, б – разрушение ХСО в клетках каллуса *T. polonicum*. ув. х 40

Характеристики каллусной культуры зрелых зародышей различных видов пшеницы

Виды	Концентрация 2,4-Д, мг/л									
	4.0					6.0				
	доля образцов			размеры, мм		доля образцов			размеры, мм	
	с индукцией каллусогенеза	с индукцией побегообразов	с ХСО	диаметра каллуса	длины побега	с индукцией каллусогенеза	с индукцией побегообразов	с ХСО	диаметра каллуса	длины побега
<i>T. monococcum</i> (A ^u)	0.27 ^б	0.00	0.00 ^б	4.25 ± 1.65	-	0.84*	0.25*	0.00	4.78 ± 0.22	2.25 ± 0.41*
<i>T. polonicum</i> (A ^u B)	0.93	0.18	0.54	5.80 ± 0.24	9.33 ± 1.95	-	-	-	-	-
<i>T. aestivum</i> (A ^u BD)	0.96	0.06	0.58	5.17 ± 0.22	10.00 ± 2.89	-	-	-	-	-

дов пшеницы наиболее подходят незрелые зародыши. Помимо определенных трудностей с введением в культуру зрелых зародышей – трудо- и времязатратность – каллусы, получаемые на их основе, по всей видимости имеют дефекты в функционировании фотосинтетического аппарата и не подходят для исследований по изучению влияния стрессоров на ФА растительных тканей в культуре *in vitro*. На оптимальном фоне отмечено активное образование хлорофилл содержащих областей (ХСО), и наличие двух пиков фотосинтетической активности каллусов. В процессе фотоморфогенеза выявлены видоспецифические различия. Стрессовое воздействие приводит к процессам дегенерации фотоморфогенных тканей и разрушению хлорофилл содержащих областей, прежде всего, в каллусах менее устойчивых форм. Наиболее активные процессы фотоморфогенеза в стрессовых условиях отмечены у каллусов, характеризовавшихся относительно небольшим увеличением биомассы клеточных колоний.

В целом же, результаты оценки ФА растительных тканей, зафиксированные в культуре *in vitro*, позволяют дать более подробный анализ динамики ФА различных видов пшеницы в нормальных и стрессовых условиях на различных уровнях растительной организации.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Катасонова А.А. Оптимизация технологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы в каллусной культуре *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: Уфа, 2004. 25 с.
- 2 Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Пути морфогенеза *in vitro* клеток андроклинного каллуса пшеницы // Физиология растений и генетика. 2013. № 5. С. 382 – 389.
- 3 Rebeille F. Photosynthesis and respiration in air-grown and CO₂-grown photoautotrophic cell suspension cultures of carnation. // Plant Sci. 1988. V. 54. P. 11 – 21.
- 4 Быков О.Д., Казакова Е.А. Фотосинтез в культуре первичного каллуса картофеля. // Фотосинтез и фотобиология; тез. междунар. конф. Пушкино, 1991. С. 106 – 107.
- 5 Кабашникова Л. Фотосинтетический аппарат и потенциал продуктивности хлебных злаков / Л.Ф. Кабашникова. Минск: Беларуская навука, 2011. 327 с.
- 6 Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Гаевский Н.А. Биофизические подходы в оценке стрессоустойчивости яровой пшеницы // Сиб. вестник с.-х. науки. 2013. №1. С. 18 – 23.
- 7 Терлецкая Н.В., Исакова А.Б., Зобова Н.В., Ступко В.Ю., Луговцова С.Ю. Фотосинтезирующая каллусная культура различных видов пшеницы и ее фотосинтетическая активность в условиях абиотических стрессов *in vitro* // Бюллетень ГНБС. 2016. № 12. С. 54 – 61.

8 Shireen A. Amin, Chnar N. Fathullah, Pakhshan M. Maoulood Morphological and Anatomical Responses of Four Wheat Cultivars to Water Stress // Zanco (Journal of Pure and Applied Science). 2015. № 3. P. 41 – 48.

9 Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Гаевский Н.А.

Влияние стрессоров на динамику фотосинтетической активности пролиферирующих каллусных культур пшеницы // Известия Калининградского государственного технического университета. 2015. №36. С. 107 – 113.

PHOTOMORPHOGENESIS OF WHEAT EMBRYOGENIC CALLI UNDER EDAPHIC STRESS CONDITIONS

© N.V. Terletskaia¹, V.Yu. Stupko², A.B. Isakova¹, N.V. Zobova², N.A. Gaevsky³

¹Institute Plant Biology and Biotechnology,
45, ulitsa Timiryazeva, 050040, Almaty, Kazakhstan

²Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture «Federal Research Center
«Krasnoyarsk Scientific Center of the SB RAS»,
66, prospekt Svobodnyy, 660062, Krasnoyarsk, Russian Federation

³Siberian Federal University,
79, prospekt Svobodnyy, 660041, Krasnoyarsk, Russian Federation

Callus photomorphogenesis processes of winter wheat species with different ploidy-level (*T. monococcum* L. (A^u), *T. polonicum* L. var. *villosum* (A^uB) и *Triticum aestivum* L. (A^uBD)) were analyzed. Calli had developed from mature and immature embryos on two types of media differed in auxin level. Photosynthetic activity (PA) of callus cultures was studied in dynamic *in vitro* on proliferation medium under optimal conditions as well, as under edaphic stress conditions (salinity – NaCl, 0,63% or drought – polyethyleneglycol 6000 16 % w/v). PA data fixed at photosynthetic photon flux density of 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in

«light curve» record mode was used for analysis of PSII effective quantum yield (Y(II)), quantum yield of non-regulated energy dissipated in PSII (Y(NO)) and quantum yield of non-photochemical quenching (Y(NPQ)) dynamics. Morphometric and cytological screenings of callus cultures were conducted. Species-specific differences in callus color and tissue density was detected on induction medium. Calli developed from immature embryos showed PA as early, as they were passaged to proliferation medium. A numerous calli with chlorophyll-containing areas (CCA) were detected under optimal conditions. Two picks in PA at 7th and 15th days were detected. The same picks were detected in our earlier work with soft spring wheat. Cytological analysis of callus tissue showed that stress conditions at proliferation stage result in plasmolysis, photomorphogenic tissue degeneration and CCA destruction primarily in calluses of less stress-tolerant species. In general, the most intensive process of photomorphogenesis under stress conditions was detected in calli which had characterized by small biomass buildup. The low levels of callus induction and PA as well, as high dispersion of PA data of calluses developed from mature embryos were described. So immature embryos are more suitable for the purpose of development of photosynthetic active callus culture of most part of species described in present article.

Key words: wheat species, edaphic stresses, photomorphogenesis, calli, light curve.

УДК 575

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-52-59

**ОСОБЕННОСТИ ПРИЦЕНТРОМЕРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА ХРОМОСОМ 1, 9, 16
В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И ЭКСТРАЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА**

© И.Л. Трофимова, Н.И. Енукашвили, Т.В. Кузнецова

Организация и функциональная значимость полиморфных областей гетерохроматина, локализованных в прицентромерных районах хромосом 1, 9, 16 и в дистальном отделе длинного плеча Y хромосомы, издавна привлекают внимание цитогенетиков человека. Особый интерес эти районы вызывают в связи с пересмотром традиционных представлений о конститутивном гетерохроматине, как о компоненте клеточного ядра, выполняющего структурные и репрессивные функции. В настоящее время обсуждается регуляторная роль транскриптов сателлитных ДНК прицентромерного гетерохроматина, в эмбриональном развитии. В обзоре суммированы данные литературы и собственные результаты, полученные авторами при комплексном цитогенетическом и молекулярном анализе особенностей транскрипции сателлитной ДНК и организации конститутивного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях человека.

Ключевые слова: цитотрофобласт хориона, конститутивный гетерохроматин, сателлитная ДНК, транскрипция, репликация, пространственная организация ядра.

Введение. В составе генома эукариот принято выделять три фракции хроматина, различающиеся по молекулярно-генетическому и функциональному статусу: конститутивный (КГХ) и факультативный гетерохроматин, эухроматин. Эухроматин включает в себя большинство транскрипционно-активных генов. Это наиболее изученная часть генома эукариот. Факультативным гетерохроматином называют временно инактивированные и конденсированные участки хромосом, которые могут обратимо переходить из гетерохроматинового в эухроматиновое состояние в зависимости от типа клетки, стадии клеточного цикла или особенностей одной из гомологичных хромосом. Самым типичным примером факультативного гетерохроматина является одна из X хромосом в клетках самок млекопитающих, которая подвергается инактивации [1].

КГХ обычно располагается в районах центромер, теломер и ядрышковых организаторов. Молекулярной основой этого типа хроматина являются различные классы повторяющейся ДНК, большую часть которой составляют классические сателлиты 1, 2 и 3. Сателлитные повторы в геноме человека имеют различную обогащенность АТ- и СG-парами оснований и специфично распределены по хромосомам. Характерными особенностями КГХ считались конденсированное состояние на протяжении практически всего клеточного цикла, репликация ДНК в поздней S фазе, формирование хромоцентров, транскрипционная инертность, специфические эпигенетические модификации ДНК и хроматина, такие как метилирование ДНК или триметилирование лизинов гистона H3 [1, 2]. КГХ приписывались в основном структурные функции, а

ТРОФИМОВА Ирина Леонидовна – к.б.н., «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Международный центр репродуктивной медицины, e-mail: il_trofimova@list.ru
ЕНУКАШВИЛИ Нателла Иосифовна – к.б.н., Институт цитологии РАН, e-mail: natellae@gmail.com

КУЗНЕЦОВА Татьяна Владимировна – д.б.н., Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта, e-mail: tkuznetzova@mail.ru

его функциональная значимость оставалась под вопросом.

В настоящее время традиционные представления о молекулярной организации и функциональной инертности КГХ подверглись существенному пересмотру. Так, в его составе обнаружены ретротранспозоны, гены и фрагменты генов [3–5]. КГХ в ряде типов клеток деконденсирован, гипометилирован, активно транскрибируется. Показано, что образующиеся некодирующие транскрипты принимают участие во многих клеточных процессах в эмбриональном и постнатальном развитии, при старении или малигнизации клеток [2, 6].

В кариотипе человека наиболее крупные блоки КГХ находятся в прицентромерных районах хромосом 1, 9, 16 и дистальном отделе длинного плеча Y хромосомы (Yqh). Открытие явления полиморфизма и гетероморфизма гомологичных районов КГХ хромосом 1, 9, 16 и Yqh положили начало серии исследований, посвященных изучению его возможной роли в нарушении репродукции у человека. Однако следует отметить, что в большинстве работ проводился анализ сопоставления частот встречаемости аномалий кариотипа у детей или плодов, бесплодия, невынашивания беременности в группах носителей выраженного гетероморфизма. В то же время, структурная организация и функциональная активность районов КГХ оставались малоизученными [7]. Между тем, клеточные патогенетические механизмы могут оказывать существенное влияние на все аспекты эмбрионального развития. Так, например, известно, что нарушения структурной целостности и эпигенетических модификаций хроматина, транскрипционной активности кодирующих и некодирующих белки последовательностей ДНК, может привести к нарушению процессов имплантации, формирования бластоцисты и гастрюляции, ошибкам морфогенеза, ранней эмбриональной гибели или к болезням импринтинга [8–12].

В этой связи особый интерес представляет изучение структурно-функциональной организации районов КГХ хромосом 1, 9, 16 и Yqh в эмбриогенезе человека. В настоящем обзоре описаны особенности КГХ хромосом 1, 9 и 16 в

образцах эмбриональных органов и ворсинчатом хорионе с мужским и женским кариотипами.

Особенности конститутивного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях человека

Степень конденсации районов прицентромерного конститутивного гетерохроматина. В большинстве типов клеток районы КГХ конденсированы в течение всего клеточного цикла, за исключением периода S-фазы, когда происходит репликация входящей в его состав ДНК [1]. Высокая степень компактизации, однако, не является облигатным свойством КГХ. Так, показана деконденсация районов 1qh и 9qh в лимфоцитах у больных синдромом ICF (Immunodeficiency, Centromeric instability, and Facial abnormalities) [13]. Более низкий уровень конденсации прицентромерных районов хромосом 1, 9, 16 наблюдается на препаратах метафазных хромосом из цитотрофобласта хориона по сравнению с клетками эмбриональных органов [7]. Деконденсация районов 1qh, 9qh и 16qh характерна для малигнизированных клеток [14, 15], а также для сперматогониев и сперматоцитов 1-го порядка [16]. Возможно, что деконденсация сопряжена не только с особой организацией, но и функциональным состоянием районов КГХ в этих клетках.

Цитохимические особенности ДНК прицентромерного конститутивного гетерохроматина выявляемые при окрашивании акридиновым оранжевым. Известно, что после солевой, щелочной и/или термической предобработки и последующей окраске препаратов метафазных хромосом акридиновым оранжевым, можно получить R- или C-рисунки дифференциального окрашивания. В отсутствие таких предобработок акридиновый оранжевый рутинно окрашивает хромосомы в желто-зеленый цвет [17, 18].

В собственных экспериментах на необработанных препаратах хромосом из цитотрофобласта хориона и эмбриональных органов мы обнаружили рисунок избирательного окрашивания районов КГХ в красный цвет [19]. DA/DAPI-подобный рисунок с красной флуоресценцией районов 1q12, 9q12, 13p11.2, 14p11.2, 15p11.2, 16q11.2, 21p11.2, 22p11.2, Yq12 стабильно

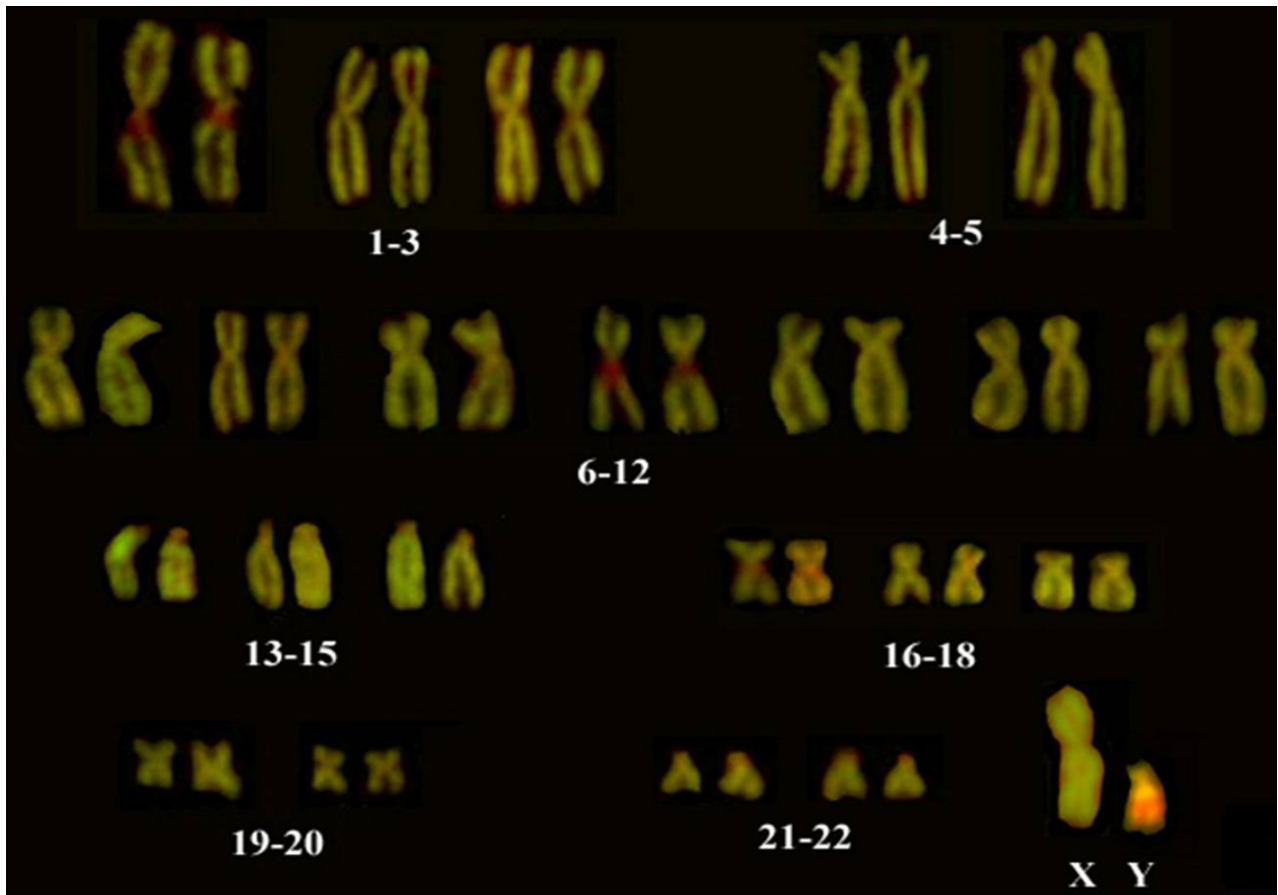


Рис. 1. Кариограмма хромосом человека, показывающая избирательную окраску районов КГХ хромосом 1, 9, 16 и Y в клетках цитотрофобласта хориона. Также определяются окрашенные акридиновым оранжевым в красный цвет короткие плечи акроцентрических хромосом групп D и G.

воспроизводился на препаратах из тканей, характеризующихся высокой естественной митотической активностью (хорион, плацента, эмбриональные органы, костный мозг, семенники), а также культур эмбриональных стволовых клеток (рис. 1). Характер окрашивания районов КГХ на метафазных пластинках из спонтанно делящихся клеток не зависел от изменений в хромосомном наборе (трисомии, в том числе трисомии 9 и дисомии Y, триплоидии, тетраплоидии, структурные перестройки хромосом - как, например, 9ph). В некоторых метафазных пластинках из клеток цитотрофобласта и, особенно из стволовых эмбриональных клеток, красная флуоресценция регистрировалась и в теломерных участках хромосом. Следует отметить также, что избирательность окраски гетерохроматиновых районов сохранялась и на хромосомах из 24-72 часовых органных культур хориона.

Красная флуоресценция отдельных районов КГХ была зарегистрирована лишь в единичных

метафазных пластинках метафазах из ФГА-стимулированных лимфоцитов. В подавляющем большинстве метафаз из лимфоцитов периферической и пуповинной крови, амниоцитов наблюдалась монотонная желто-зеленая флуоресценция красителя вдоль плеч хромосом. Подобный тип избирательного окрашивания районов КГХ на препаратах хромосом из эмбриональных и экстраэмбриональных тканей не был описан ранее.

Известно, что спектр флуоресценции акридинового оранжевого на окрашенных препаратах зависит от концентрации, фирмы-производителя красителя, буферного раствора и его pH, способа приготовления и хранения препарата. Красное окрашивание красителем районов хромосом может быть связано с химическим составом - одноцепочечными нуклеиновыми кислотами, гистоновыми и негистоновыми белками и их модификациями [18].

Результаты экспериментов по оценке влияния предобработок препаратов различными

ферментами (РНКазой А, РНКазой Н, ДНКазой I, лигазой Т4, пепсином, трипсином, протеиназой К) показали, что наибольшие изменения в окраске районов КГХ в клетках цитотрофобласта хориона и эмбриональных органов - снижение интенсивности красного окрашивания - наблюдались после обработки препаратов ДНК-лигазой Т4, РНКазой А и РНКазой Н. В некоторых метафазах из хориона, после предобработки препаратов РНКазой Н, наблюдалось отсутствие окрашивания прицентромерного гетерохроматина при равномерной желто-зеленой окраске плеч хромосомы. В то же время способ приготовления (с уксусной мацерацией и без) и флуорохромирования (разные производители и концентрации, состав буфера для красителя и его рН) препаратов хромосом из хориона и эмбриональных органов не оказывали влияния на характер окрашивания районов КГХ [20].

Таким образом, результаты комплексного исследования метафазных хромосом *in situ* с помощью протеолитических ферментов и эндонуклеаз свидетельствуют в пользу наличия устойчивых белков и фрагментов нуклеиновых кислот в КГХ хромосом 1, 9, 16 в цитотрофобласте хориона и эмбриональных клетках, а также одноцепочечных нуклеиновых кислот и дуплексов РНК-ДНК в клетках цитотрофобласта, которые наиболее характерны для хромосомы 1 [20].

Особенности репликации прицентромерного конститутивного гетерохроматина в клеточном цикле. Цитологической характеристикой КГХ является репликация входящей в его состав ДНК в поздней S-фазе. В основном, это связано, как с составом последовательностей ДНК (сателлитной ДНК), так и со специфическими гистоновыми модификациями. Поздняя репликация КГХ, характерная для терминально-дифференцированных клеток, возможно, обусловлена плотной укладкой ДНК, предотвращающей преждевременную инициацию репликации ДНК [1]. Свидетельством в пользу этого может служить практическая недоступность ДНК КГХ некоторым рестрикционным ферментам [21]. Другой возможной причиной может являться замедленная элонгация репликации КГХ по сравнению с эухроматином, так как сателлитная ДНК

может вызывать замедление прохождения вилки репликации [1].

Однако, следует отметить, что в детальных исследованиях, выполненных на эмбриональном материале, была обнаружена стадио- и хромосом-специфичность репликации районов прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 в клетках цитотрофобласта хориона. Так, на метафазных пластинках из ворсин хориона 5–7 недель беременности (н.б.) одновременно с районами 1qh, 9qh, 16qh реплицируются до 150 R-сегментов, то есть значительная часть эухроматина, тогда как в срок 12–13 н.б. их число снижается более чем в два раза. В отличие от цитотрофобласта в эмбриональных клетках районы КГХ, как правило, реплицируются асинхронно с R-сегментами [7], что типично для этого типа хроматина. Следует отметить, что репликация ДНК КГХ в начале S фазы была показана также и для других видов млекопитающих [22–24].

В собственном исследовании [25] анализ репликации районов КГХ был проведен на образцах ворсинчатого хориона и эмбриональных органов, полученных после прерывания беременности по медицинским показаниям (замершая беременность) и по социальным показаниям (контроль). Во всех проанализированных группах были выявлены необычные характеристики репликации КГХ в клеточном цикле, указывающие на его возможную недорепликацию.

Расположение в пространстве интерфазного ядра районов прицентромерного конститутивного гетерохроматина. Ген-обогащенные и рано-реплицирующиеся локусы ДНК преимущественно локализованы во внутренней части ядра, тогда как ген-бедные средне- и поздно-реплицирующиеся связаны с ядерной периферией и ассоциированы с ядрышками [26, 27]. Гетерохроматиновые районы, в особенности центромерного гетерохроматина, в интерфазном ядре представлены компактными хромоцентрами. Число и размеры хромоцентров в зависимости от стадии клеточного цикла, типа клетки и степени ее дифференцировки могут варьировать [27].

С помощью 3D FISH со специфичными зондами было изучено расположение ДНК КГХ

в ядрах клеток ворсинчатого хориона и эмбриональных органов [28]. В качестве объекта исследования был выбран сателлит 3 хромосомы 1 (HSAT3-1), поскольку он образует один из самых крупных хромосом - специфичных массивов сателлитной ДНК в геноме человека, поэтому легче наблюдать изменения его морфологических характеристик. На конфокальных изображениях оценивали расположение FISH-сигнала, соответствующего HSAT3-1 по отношению к границе ядра и хромоцентрам. Было отмечено ткане- и стадиоспецифичное распределение HSAT3-1. Большинство FISH -сигналов локализовались в хромоцентрах, в непосредственной близости от ядерной оболочки клеток эмбриональных органов (печени, позвоночника, почки). В ядрах плаценты и ворсинчатого хориона после 5-6 н.б., также наблюдалась склонность к расположению большинства FISH-сигналов в хромоцентрах и на периферии ядерной оболочки. Однако, на ранних сроках развития (4-5 н.б.) в интерфазных ядрах хориона очевидна тенденция к расположению районов КГХ к центру ядра, пограничное с хромоцентрами. Интересно, что для ядер амниоцитов человека - клеток другой плодной оболочки, показано, что КГХ хромосомы 16 занимает периферическое положение, хотя для центромерных районов этой хромосомы характерно более внутреннее положение в ядре [29].

Транскрипционная активность ДНК прицентромерного конститутивного гетерохроматина. Повторяющиеся последовательности ДНК долгое время считались транскрипционно-инертным компонентом генома. В настоящее время обнаружены специфические центромерные, прицентромерные, теломерные транскрипты КГХ у разных видов организмов, в том числе и млекопитающих, в опухолевых клетках человека, в подвергавшихся тепловому шоку клеточных культурах. Транскрипты обычно гетерогенны по размеру, транскрибируются как с одной цепи ДНК, так и с обеих, в зависимости от родительского происхождения хромосомы, тканеспецифично и нет, на определенных этапах развития организма, дифференцировки клеток или только при стрессовых условиях [2, 6].

Транскрипция сателлитной ДНК в эмбриогенезе человека остается малоизученной. В собственном исследовании [28] методом ПЦР с использованием обратной транскриптазы проводился анализ транскрипции HSAT3-1 в клетках хориона и эмбриональных органов. Полиаденилированные транскрипты HSAT3-1, транскрибируемые со смысловой цепи ДНК, были выявлены в тканях ворсинчатого хориона, начиная с наиболее ранней из проанализированных стадий – 6 н.б. и детектировалась вплоть до 10-11 н.б. В образцах хориона после 14 н.б. были обнаружены антисмысловые транскрипты HSAT3-1. В образцах плацент некодирующую РНК HSAT3-1 обнаружить не удалось.

В эмбриональных органах транскрипты HSAT3-1 были выявлены на сроке 7 н.б. Во всех проанализированных тканях кроме сердца и надпочечников, после 10 н.б. транскрипция происходит с антисмысловой цепи ДНК.

Большая часть обнаруженных транскриптов имела длину около 250-300 и 600 пар нуклеотидов. Короткие транскрипты длиной около 100 пар нуклеотидов обнаружены в сердце. В образцах хориона более поздних сроков наблюдалась большая гетерогенность транскриптов по длине.

Функция некодирующих транскриптов сателлитной ДНК, по-видимому, многогранна: это и участие в гетерохроматинизации, организации хромоцентров, адаптации клетки в ответ на стрессовое воздействие, поддержание функций кинетохора и многие другие [2, 6]. Однако цитологическую характеристику и роль транскриптов сателлитной ДНК КГХ человека еще предстоит определить. Очевидно, что все перечисленные особенности (степень конденсации, окрашивание акридиновым оранжевым, репликация, расположение в ядре и по отношению к хромоцентрам, транскрипционная активность) обусловлены необычным структурно-функциональным статусом хроматина районов КГХ в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях человека и нуждаются в дальнейших исследованиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№18-34-00279).

ЛИТЕРАТУРА

1. Craig J. Heterochromatin - many flavours, common themes // *Bioessays*. 2005. Vol. 27 (1). P. 17–28. URL: <https://doi.org/10.1002/bies.20145>
2. Erukashvily N., Ponomartsev N. Mammalian satellite DNA: a speaking dumb // *Organisation of chromosomes, advances in protein chemistry and structural biology* / Ed. by R. Donev. Burlington, 2013. P. 31–65. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410523-2.00002-X>
3. Horvath J., Schwartz S., Eichler E. The mosaic structure of human pericentromeric DNA: a strategy for characterizing complex regions of the human genome // *Genome Res*. 2000. Vol. 10. № 6. P. 839–852.
4. Dimitri P., Corradini N., Rossi F., Verni F. The paradox of functional heterochromatin // *Bioessays*. 2005. Vol. 27. №1. P. 29–41. URL: <https://doi.org/10.1002/bies.20158>
5. Corradini N., Rossi F., Giordano E., Caizzi R., Verni F., Dimitri P. *Drosophila melanogaster* as a model for studying protein-encoding genes that are resident in constitutive heterochromatin // *Heredity*. 2007. № 98. P. 3–12. DOI:10.1038/sj.hdy.6800877
6. Biscotti M., Canapa A., Forconi M., Olmo E., Barucca M. Transcription of tandemly repetitive DNA: functional roles // *Chromosome Res*. 2015. Vol. 23 (3). P. 463–477. DOI: 10.1007/s10577-015-9494-4
7. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. СПб.: Н-Л. 2007. 439 с.
8. Cox G., Burger J., Lip V., Mau U., Sperling K., Wu B., Horsthemke B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects // *Am J Hum Genet*. 2002. Vol. 71. P. 162–164. URL: <https://doi.org/10.1086/341096>
9. Benchaib M., Braun V., Lornage J., Hadj S., Salle B., Lejeune H., Guérin J. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique // *Hum Reprod*. 2003. Vol. 18 (5). P. 1023–1028.
10. DeBaun M., Niemitz E., Feinberg A. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19 // *Am J Hum Genet*. 2003. Vol. 72. P. 156–160. URL: <https://doi.org/10.1086/346031>
11. Haaf T. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development // *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006. Vol. 310. P. 13–22.
12. Pauli A., Rinn J., Schier A. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis // *Nat Rev Genet*. 2011. Vol. 12. P. 136–149. DOI: 10.1038/nrg2904
13. Dupont C., Guimiot F., Perrin L., Marey I., Smiljkovski D., Le Tessier D., Lebugle C., Baumann C., Bourdoncle P., Tabet A.-C., Aboura A., Benzacken B., Dupont J.-M. 3D position of pericentromeric heterochromatin within the nucleus of a patient with ICF syndrome // *Clin Genet*. 2011. P. 1–6. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01697.x>
14. Вайсертрейгер И.С.-Р., Подгорная О.И., Енукашвили Н.И. ДНК прицентромерных участков конститутивного гетерохроматина деметилирована и деконденсирована в клетках MRC5 и A431 // *Цитология*. 2007. Т. 49. № 1. С. 62–69.
15. Erukashvily N., Donev R., Waisertreiger I., Podgornaya O. Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cells // *Cytogenet Genome Res*. 2007. Vol. 118. № 1. P. 42–54. URL: <https://doi.org/10.1159/000106440>
16. Perez M., Miguez L., Fuster C. Heterochromatin decondensation in chromosomes from chorionic villus samples // *Prenat Diagn*. 1991. Vol. 11. № 9. P. 697–704.
17. Захаров А.Ф., Беньюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека. Атлас. М.: Медицина. 1982. 264 с.
18. Zelenin A. Acridine orange as probe for cell and molecular biology // *Fluorescent and luminescent probes for biological activity*, 2 ed. / Ed. by W.T. Mason. London, 1999. P. 117–135.
19. Кузнецова Т.В., Трофимова И.Л., Ляпунова М.С., Евдокименко Е.В., Баранов В.С. Феномен избирательной окраски полиморфных гетерохроматиновых блоков хромосом в спонтанно делящихся клетках с помощью флуорохрома акридинового оранжевого // *Генетика*. 2012. Т. 48. № 4. С. 1–6.
20. Трофимова И.Л., Ляпунова М.С., Евдокименко Е.В., Кузнецова Т.В. Влияние различных преобработок на окраску прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 флуорохромом акридиновым оранжевым // *Мед. генетика*. 2012. Т. 11. № 4 (118). С. 50–54. URL: http://www.med-gen.ru/docs/differential-pre-treatments_2012-04.pdf
21. Burkholder G. Morphological and biochemical effects of endonucleases on isolated mammalian chromosomes in vitro // *Chromosoma*. 1989. Vol. 97. P. 347–355.
22. Matsumoto L., Gerbi S. Early initiation of bovine satellite I DNA replication // *Exp Cell Biol*. 1982. Vol. 140. P. 47–54. URL: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(82\)90154-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(82)90154-9)
23. Alonso R., Cantu J. Cell cycle time and possible early DNA replication in C-band regions in the domestic pig (*Sus scrofa*) lymphocytes // *Ann Genet*. 1983. Vol. 26. № 4. P. 202–205.
24. Weidtkamp-Peters S., Rahn H., Cardoso M., Hemmerich P. Replication of centromeric heterochromatin in mouse fibroblasts takes place in early, middle, and late S phase // *Histochem Cell Biol*. 2006. Vol. 125. P. 91–102. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-005-0063-3>

25. Трофимова И.Л., Евдокименко Е.В., Кузнецова Т.В. Особенности митотической активности клеток цитотрофобласта хориона у эмбрионов первого триместра беременности // Журнал акушерства и женских болезней. 2012. Т. LX I.X. Вып. 3. С. 115–122. URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_19038895_61941659.pdf

26. Croft J., Bridger J., Boyle S., Perry P., Teague P., Bickmore W. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus // Cell Biol. 1999. Vol. 145. № 6. P. 1119–1131.

27. Fedorova E., Zink D. Nuclear architecture and gene regulation // Biochim Biophys Acta. 2008. Vol. 1783 (11). P. 2174–2184. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.07.018>

28. Кузнецова Т.В., Енукашвили Н.И., Трофимова И.Л., Горбунова А.В., Вашукова Е.С., Баранов В.С. Локализация и транскрипция прицентромерного гетерохроматина хромосомы 1 в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях человека // Мед. генетика. 2012. Т. 11. № 4 (118). С. 19–24.

29. Finch K., Fonseka G., Ioannou D., Hickson N., Barclay Z., Chatzimeletiou K., Mantzouratou A., Handyside A., Delhanty J., Griffin D. Nuclear organization in totipotent human nuclei and its relationship to chromosomal abnormality // J Cell Sci. 2008. Vol. 121 (Pt:5). № 5. P. 655–663. DOI: 10.1242/jcs.025205

References

1. Craig J. Heterochromatin - many flavours, common themes // Bioessays. 2005. Vol. 27 (1). P. 17–28. URL: <https://doi.org/10.1002/bies.20145>

2. Eukashvily N., Ponomartsev N. Mammalian satellite DNA: a speaking dumb // Organisation of chromosomes, advances in protein chemistry and structural biology / Ed. by R. Donev. Burlington, 2013. P. 31–65. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410523-2.00002-X>

3. Horvath J., Schwartz S., Eichler E. The mosaic structure of human pericentromeric DNA: a strategy for characterizing complex regions of the human genome // Genome Res. 2000. Vol. 10. № 6. P. 839–852.

4. Dimitri P., Corradini N., Rossi F., Verni F. The paradox of functional heterochromatin // Bioessays. 2005. Vol. 27. №1. P. 29–41. URL: <https://doi.org/10.1002/bies.20158>

5. Corradini N., Rossi F., Giordano E., Caizzi R., Verni F., Dimitri P. Drosophila melanogaster as a model for studying protein-encoding genes that are resident in constitutive heterochromatin // Heredity. 2007. № 98. P. 3–12. DOI:10.1038/sj.hdy.6800877

6. Biscotti M., Canapa A., Forconi M., Olmo E., Barucca M. Transcription of tandemly repetitive DNA: functional roles // Chromosome Res. 2015. Vol. 23 (3). P. 463–477. DOI: 10.1007/s10577-015-9494-4

7. Baranov V.S., Kuznetsova T.V. Cytogenetics of human embryonic development. St-P.: N-L. 2007. 439 p.

8. Cox G., Burger J., Lip V., Mau U., Sperling K., Wu B., Horsthemke B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects // Am J Hum Genet. 2002. Vol. 71. P. 162–164. URL: <https://doi.org/10.1086/341096>

9. Benchaib M., Braun V., Lornage J., Hadj S., Salle B., Lejeune H., Guérin J. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique // Hum Reprod. 2003. Vol. 18 (5). P. 1023–1028.

10. DeBaun M., Niemitz E., Feinberg A. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19 // Am J Hum Genet. 2003. Vol. 72. P. 156–160. URL: <https://doi.org/10.1086/346031>

11. Haaf T. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development // Curr Top Microbiol Immunol. 2006. Vol. 310. P. 13–22.

12. Pauli A., Rinn J., Schier A. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis // Nat Rev Genet. 2011. Vol. 12. P. 136–149. DOI: 10.1038/nrg2904

13. Dupont C., Guimiot F., Perrin L., Marey I., Smiljkovski D., Le Tessier D., Lebugle C., Baumann C., Bourdoncle P., Tabet A.-C., Aboura A., Benzacken B., Dupont J.-M. 3D position of pericentromeric heterochromatin within the nucleus of a patient with ICF syndrome // Clin Genet. 2011. P. 1–6. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01697.x>

14. Vaisertreiger I.S.-R., Podgornaya O.I., Eukashvily N.I. Pericentromeric DNA of constitutive heterochromatin are decondensed and demethylated in MRC5 and A431 cells // Tsitologiya. 2007. Vol. 49. № 1. P. 62–69.

15. Eukashvily N., Donev R., Vaisertreiger I., Podgornaya O. Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cells // Cytogenet Genome Res. 2007. Vol. 118. № 1. P. 42–54. URL: <https://doi.org/10.1159/000106440>

16. Perez M., Miguez L., Fuster C. Heterochromatin decondensation in chromosomes from chorionic villus samples // Prenat Diagn. 1991. Vol. 11. № 9. P. 697–704.

17. Zakharov A.F., Benjush V.A., Kuleshov N.P., Baranovskaya L.I. Human chromosomes (atlas). M.: Medicine. 1982. 264 p.

18. Zelenin A. Acridine orange as probe for cell and molecular biology // Fluorescent and luminescent probes for biological activity, 2 ed. / Ed. by W.T. Mason. London, 1999. P. 117–135.

19. Kuznetsova T., Trofimova I., Lyapunova M., Evdokimenko E., Baranov V. Phenomenon of selective staining

of pericentromeric heterochromatin regions in chromosomes from spontaneously dividing cells by the acridine orange fluorochrome // *Genetika*. 2012. V. 48. № 4. P. 369–375.

20. Trofimova I.L., Lyapunova M.S., Evdokimenko E.V., Baranov V.S., Kuznetzova T.V. Effects of different pretreatments on pericentromeric heterochromatin of chromosomes 1, 9 and 16 staining with acridine orange fluorochrome // *Medical Genetics*. 2012. Vol. 11. № 4 (118). P. 50–54. URL: http://www.med-gen.ru/doc/s/different-pretreatments_2012-04.pdf

21. Burkholder G. Morphological and biochemical effects of endonucleases on isolated mammalian chromosomes in vitro // *Chromosoma*. 1989. Vol. 97. P. 347–355.

22. Matsumoto L., Gerbi S. Early initiation of bovine satellite I DNA replication // *Exp Cell Biol*. 1982. Vol. 140. P. 47–54. URL: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(82\)90154-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(82)90154-9)

23. Alonso R., Cantu J. Cell cycle time and possible early DNA replication in C-band regions in the domestic pig (*Sus scrofa*) lymphocytes // *Ann Genet*. 1983. Vol. 26. № 4. P. 202–205.

24. Weidtkamp-Peters S., Rahn H., Cardoso M., Hemmerich P. Replication of centromeric heterochromatin in mouse fibroblasts takes place in early, middle, and late S phase // *Histochem Cell Biol*. 2006. Vol. 125. P. 91–102. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-005-0063-3>

25. Trofimova I.L., Evdokimenko E.V., Kuznetzova T.V. Peculiarity of mitotic activity of chorionic villi cytotrophoblast on the first trimester of pregnancy // *Journal of obstetrics and women's diseases* 2012. Vol. LX I.X. Publ. 3. P. 115–122. URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_19038895_61941659.pdf

26. Croft J., Bridger J., Boyle S., Perry P., Teague P., Bickmore W. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus // *Cell Biol*. 1999. Vol. 145. № 6. P. 1119–1131.

27. Fedorova E., Zink D. Nuclear architecture and gene regulation // *Biochim Biophys Acta*. 2008. Vol. 1783 (11). P. 2174–2184. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.07.018>

28. Kuznetzova T.V., Enuakashvily N.I., Trofimova I.L., Gorbunova A.V., Vashukova E.S., Baranov V.S. Localisation and transcription of human chromosome 1 pericentromeric heterochromatin in embryonic and extraembryonic tissues // *Medical Genetics*. 2012. Vol. 11. № 4 (118). P. 19–24.

29. Finch K., Fonseka G., Ioannou D., Hickson N., Barclay Z., Chatzimeletiou K., Mantzouratou A., Handyside A., Delhanty J., Griffin D. Nuclear organization in totipotent human nuclei and its relationship to chromosomal abnormality // *J Cell Sci*. 2008. Vol. 121 (Pt:5). № 5. P. 655–663. DOI: 10.1242/jcs.025205

PECULIARITIES OF 1qh, 9qh, 16qh REGIONS OF HUMAN CHROMOSOME FROM EXTRAEMBRYONIC AND EMBRYONIC TISSUES

© I.L. Trofimova^{1,2}, N.I. Enuakashvily³, T.V. Kuznetzova⁴

¹ “Almazov National Medical Research Centre”

of the Ministry of Health of the Russian Federation,

2 ulitsa Akkuratova, 197341, St. Petersburg, Russian Federation

² International centre of reproductive medicine,

53k1 Komendantskij prospect, 197350, St. Petersburg, Russian Federation

³ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences,

4 Tikhoretsky prospect, 194064, St-Petersburg, Russian Federation

⁴ The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology
named after D.O.Ott,

3 Mendeleev line, 199034, St-Petersburg, Russian Federation

In human karyotype, the most polymorphic regions of constitutive heterochromatin are localized in the pericentromeric regions of chromosomes 1, 9, 16, as well as in the distal part of the long arm Y chromosome. The organization and functional significance of these heterochromatin regions of chromosomes intrigue the attention of human cytogeneticists due to revision of traditional concepts about constitutive heterochromatin as inert component of the cell nuclei. The regulatory role of satellite DNA transcripts in embryonic development is currently being discussed. The review describes literature and our own data on the features of transcription and organization of constitutive heterochromatin of chromosomes 1, 9, 16 in human embryonic and extraembryonic tissues.

Key words: cytotrophoblast, constitutive heterochromatin, satellite DNA, transcription, replication, 3D organization of nucleus.

УДК:579.222.2

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-60-66

ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГРИБОВ В ЭКОЛОГИЧЕСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЯХ

© О.В. Турковская, Н.Н. Позднякова

Проведен сравнительный анализ микоремедиационного потенциала четырех штаммов грибов, принадлежащих к различным таксономическим и эко-физиологическим группам: дерево- и почво-обитающих базидиомицетов *Pleurotus ostreatus* f. Florida, *Agaricus bisporus* и *Stropharia rugosoannulata*, и сапрофитного аскомицета *Cladosporium herbarum*.

Все исследованные грибы были способны разрушать нефтепродукты и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Процесс деградации этих поллютантов исследовался в погруженной культуре и в почве. ПАУ не оказывали ингибирующего действия на рост мицелия. Деградационная способность грибов связана с продуцированием ими комплекса лигнинолитических ферментов, различающихся по составу. У *P. ostreatus* отмечена продукция лакказ и пероксидаз, что является характерным свойством этого вида. Наличие третьего лигнинолитического фермента – лигнин пероксидазы показано у подстилочного сапротрофа – *S. rugosoannulata*. У *A. bisporus* выявлена только лакказа, у аскомицета *C. herbarum* – только пероксидаза. При этом лигнинпероксидаза *S. rugosoannulata* и пероксидаза *C. herbarum* были индуцибельными и продуцировались только в присутствии определенных поллютантов. В случае *P. ostreatus* и *S. rugosoannulata* присутствие ПАУ в среде культивирования несколько снижало продукцию ферментов. На основании идентификации метаболитов, образующихся при деградации ПАУ: хинонов, карбоксибензальдегида, дифеновой и фталевой кислот, сделан вывод о схожих путях их метаболизма у исследованных грибов и влиянии состава лигнинолитического комплекса на глубину деградации молекул ПАУ.

Все представленные в статье штаммы могут быть использованы в процессах микоремедиации с условием разработки специальных мер, обеспечивающих безопасность подобных экологических биотехнологий.

Ключевые слова: грибы, базидиомицеты, аскомицеты, биodeградация, нефть, полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), лигнинолитические ферменты.

Введение. Детоксикационный потенциал живых организмов лежит в основе технологий ремедиации и является важным фактором самоочищения природной среды. Одним из важнейших компонентов функционирования и саморегулирования экосистем являются грибы, утилизирующие растительные полимеры. Лигнинолитические грибы, к которым относятся дерево- и почвообитающие базидио- и аскомицеты являются наиболее активными деструкторами лигнина в природе. В условиях глобального загрязнения биосферы они стали мощнейшей группой

организмов, способных вовлекать в процессы своего метаболизма широкий спектр загрязнителей, в том числе недоступных или труднодоступных для бактерий. Современные исследования деградации поллютантов этими грибами направлены на изучение метаболических путей и катализирующих их ферментных систем.

В настоящее время на рынке для осуществления биоремедиации предлагаются, в основном, бактериальные препараты. При этом грибы, обладающие большим деструктивным потенциалом, применяются не часто.

ТУРКОВСКАЯ Ольга Викторовна – д.б.н., Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, turkovskaya_o@ibppm.ru

ПОЗДНЯКОВА Наталия Николаевна – д.б.н., Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, pozdnyakova_n@ibppm.ru

Использование грибов для решения задач экологической биотехнологии – микоремедиация – простой и относительно недорогой метод. Он может быть использован для очистки почвы и поверхности воды, загрязненных промышленными и сельскохозяйственными отходами, нефтью и нефтепродуктами, а также различными ксенобиотиками. Ключом к успешному применению микоремедиации является корректный подбор штаммов грибов, способных утилизировать определенные поллютанты. Перспективными кандидатами для этой цели являются вышеназванные лигнинолитические грибы, обладающие способностью деградировать широкий спектр веществ, как в погруженной культуре [1], так и в стерильных и нестерильных почвах [2, 3].

Целый ряд уникальных свойств делает лигнинолитические грибы привлекательными для использования в микоремедиации: (а) широкое распространение в природе; (б) способность к росту на недорогих субстратах, являющихся отходами сельского хозяйства, которые легко могут быть внесены в загрязненную почву; (в) рост распространением гиф, позволяющий им проникать в почвенные поры к поллютантам, малодоступным для бактерий; (г) продукция мощной неспецифической окислительной ферментной системы, следствием чего является способность к деградации и минерализации значительного ряда токсичных поллютантов, включая гидрофобные; (д) внеклеточная природа лигнинолитического ферментного комплекса и наличие низкомолекулярных медиаторов, увеличивающих биодоступность поллютантов для этих грибов; (е) конститутивная природа лигнинолитических ферментов, что предотвращает необходимость адаптации организма; (ж) экспрессия лигнинолитических пероксидаз у ряда грибов в ответ на лимит по источникам питания, который является обычным для почвы [4].

К настоящему времени опубликовано много исследований по деградации деревьев (грибы белой гнили) и почвообитающими (подстилочные сапротрофы) лигнинолитическими грибами как индивидуальных полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), так и их

смесей. Хиноны идентифицированы как доминирующие продукты деградации, у ряда грибов обнаружена минерализация ПАУ до CO_2 и H_2O . Выявлено участие лигнинолитических ферментов в метаболизме этих углеводов. Несмотря на хорошую изученность биохимических превращений поллютантов грибами, продолжается выявление новых метаболических путей и образующихся метаболитов в результате деградации отдельных загрязнителей. Показана ключевая роль лигнинолитических ферментов в деградации ПАУ. Лигнин пероксидаза, Мп-пероксидаза, гибридная пероксидаза и лакказа продуцируются всеми грибами белой гнили и подстилочными сапротрофами, но их сочетание в значительной степени зависит от вида гриба [5].

Таким образом, анализ литературных данных позволяет говорить о том, что направление, связанное с исследованием лигнинолитических грибов как деструкторов персистентных поллютантов, а также выявление факторов, повышающих их активность, для создания фундаментальной основы технологии микоремедиации, является актуальным и перспективным направлением современной науки.

Цель данной работы – выявить особенности грибов различных эко-физиологических групп в отношении деградации нефти и ПАУ и оценить возможности их практического применения.

Материалы и методы. В работе исследованы штаммы грибов, выделенные авторами статьи или полученные из различных коллекций: *Pleurotus ostreatus* f. Florida IBPPM 540 (ИБФРМ РАН), *Agaricus bisporus* F-8 (ИБФРМ РАН), *Stropharia rugosoannulata* DSM11372 (UFZ-Центр исследований окружающей среды, Лейпциг, Германия), *Cladosporium herbarum* MUT 3238 (Микотека Туринского Университета, Турин, Италия). Грибы культивировали в колбах на богатой среде для базидиомицетов [6] или среде Кирка [7]. Деградационная активность грибов исследовалась по отношению к ПАУ (антрацен, фенантрен, флуорен) (0,05 г/л) и нефти (5 г/л), которые вносились в колбы через 3 сут

культивирования грибов. Твердофазное культивирование проводили на лузге подсолнечника, инокулят вносился в загрязненную нефтью почву через 7 сут. Общее содержание нефтепродуктов определяли гравиметрическим методом. Фракционный состав нефти в образцах почвы анализировали методом адсорбционной хроматографии с последующим поляриметрическим и гравиметрическим анализом. Деграцию ПАУ и образование метаболитов исследовали с помощью ГЖХ (GC-2010) и ВЭЖХ (Smart-Line 5000). Активность ферментов определяли спектрофотометрически (Evolution 60, Thermo Scientific, США): лакказ по скорости образования продукта окисления АБТС при 436 нм, пероксидаз – по образованию продукта окисления 2,6-диметоксифенола при 468 нм в присутствии H₂O₂ и MnCl₂. Подробно методы анализа описаны в работах [8, 9]. Все варианты проведенных экспериментов и анализов имели не менее, чем трехкратную повторность. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью Microsoft Excel 2003.

Результаты и обсуждение. Исследуемые на деструктивный потенциал грибы являлись представителями различных таксономических и эко-физиологических групп: базидиомицеты: *Pleurotus ostreatus* f. Florida IBPPM 540, *Stropharia rugosoannulata* DSM11372 и *Agaricus bisporus* F-8 – гумусовые (подстилочные) сапротрофы, аскомицет *Cladosporium herbarum* MUT 3238. Их объединяет способность продуцировать внеклеточные лигнинолитические ферменты, позволяющие использовать лигнин в качестве источника углерода. Эта способность является и основой биотехнологического потенциала этих грибов для решения экологических проблем, поскольку в процесс разложение лигнина вовлекается широкий круг поллютантов прежде всего ароматической природы. Каждый из выбранных объектов обладает особенностями, которые необходимо учитывать при его оценке в качестве микоремедианта.

Pleurotus ostreatus (Jacq.) P.Kumm., 1871 – вешенка устричная, агариковый базидиомицет, вызывает белую гниль древесины. Популярный съедобный гриб, культивируемый в промыш-

ленных масштабах во всем мире. В России объемы его производства уступают только шампиньону. Гриб нетребователен к субстрату для роста мицелия. Им может быть практически любой, содержащий целлюлозу и лигнин субстрат: опилки, стружка, кора, бумага, солома, камыш, лузга подсолнечника и т.п.

При исследовании выделенного нами из объектов окружающей среды штамма *P. ostreatus* f. Florida IBPPM 540 установлено, что в условиях погруженного культивирования на богатой среде для базидиомицетов гриб продуцирует два лигнинолитических фермента: лакказы и пероксидазу (предположительно гибридную пероксидазу). При внесении в среду культивирования нефти (0,5 г/л) ее деграция за 14 сут составила 72%.

На этой же среде исследована активность *P. ostreatus* f. Florida в отношении ПАУ. Показано, что при исходной концентрации 0,05 г/л за 14 сут антрацен, фенантрен и флуорен разрушались на 50, 70 и 94% соответственно. Присутствие ПАУ в среде культивирования не влияло на рост мицелия, переход на стационарную фазу наблюдался на 4-5 сут как в опыте, так и в контроле. Анализ метаболитов выявил образование на первых этапах соответствующих хинонов, далее – 2-карбоксібензальдегида и фталевой кислоты, которая в дальнейшем может включаться в основной клеточный обмен.

В исследованиях, проведенных с другим штаммом – *P. ostreatus* D1, показано влияние состава среды культивирования на продукцию ферментов и деграцию ПАУ. На среде Кирка продуцировалась только лакказа, при этом происходила трансформация ПАУ с накоплением соответствующих хинонов. На богатой среде для базидиомицетов продуцировались два фермента – лакказа и пероксидаза и происходила более полная их деграция, которая включала этапы, приводящие к образованию фталевой кислоты и ее дальнейшей утилизации. Это позволяет предположить, что лакказа может катализировать начальную атаку молекулы ПАУ, приводящую к образованию хинонов, а пероксидаза обеспечивает их дальнейшее окисление, приводящее в конечном итоге к минерализации ПАУ [10].

С этим штаммом проведено исследование способности грибов белой гнили разрушать нефть при их интродукции в почву. Показано, что внесение твердофазной культуры *P. ostreatus* D1 (на подсолнечной лузге) в нестерильную загрязненную нефтью почву обеспечивает деградацию практически всех фракций нефти, свидетельствуя в пользу успешного сосуществования грибного мицелия и почвенной микрофлоры. Показано, что нефть практически не влияла на продукцию лакказы этим грибом, тогда как продукция пероксидазы снижалась и смещалась на более ранние сутки, что может быть связано с ингибирующим действием компонентов нефти [9, 10]. Штамм *P. ostreatus* D1, как и *P. ostreatus* f. *Florida* IBPPM 540, продуцировал на богатой среде лакказу и пероксидазу, как в присутствии, так и в отсутствие изученных поллютантов.

Stropharia rugosoannulata Farl. ex Murrill, 1922 – строфария морщинисто-кольцевая, кольцевик. Является агариковым базидиомицетом, в природе встречается редко. Этот гриб — типичный почвенный сапрофит. Он не является микоризообразователем и никогда не встречается в лесах и рощах. Его природный субстрат — хорошо удобренная почва, растительные остатки. Со второй половины прошлого века строфария стала культивироваться. Этот гриб имеет некоторые преимущества перед широко распространенным в культуре двуспоровым шампиньоном. Во-первых, субстрат для этого гриба (солома всех видов и отходы льна) легкодоступен и дешев. Во-вторых, он не требует специальной подготовки (компостирования) и нуждается только в увлажнении. В-третьих, гриб устойчив к высокой температуре, низкой влажности воздуха и т. д., поэтому его можно выращивать не только в закрытых помещениях, но и в открытом грунте, делая легкие укрытия. Указанная неприхотливость данного вида может иметь существенное значения для его применения в микоремедиации.

Исследованный нами штамм *S. rugosoannulata* DSM11372 в условиях погруженного культивирования через 14 сут деградировал более 85% нефти. Изучение фракционного состава нефти после роста культуры показало, что гриб

наиболее активно деградировал алкановую и нафтеновую фракции, тогда как фракции моно- и полиароматических соединений были менее доступны.

Деградацию индивидуальных ПАУ *S. rugosoannulata* осуществляла достаточно активно: антрацен, фенантрен и флуорен за 14 сут метаболлизировались на 50, 58 и 70% соответственно.

В отличие от *P. ostreatus*, *S. rugosoannulata* продуцировала три лигнинолитических фермента: лакказу, Mn-пероксидазу и лигнин пероксидазу. Активность последней выявлялась только при культивировании гриба на нефти. По-видимому, среди компонентов нефти присутствуют вещества, которые могут выступать индукторами этого фермента.

Исследование деградации антрацена показало, что на первом этапе происходит образование 9,10-антрахинона, который не накапливается, а метаболизируется дальше с образованием 2-карбоксібензальдегида и фталевой кислоты. В отдельном исследовании показано, что 2-карбоксібензальдегид и фталевая кислота также доступны для утилизации этим грибом. Их убыль через 14 сут культивирования достигала 100%.

Исследованный ПАУ был нетоксичен для строфарии, о чем свидетельствовало примерно равное количество мицелия в опытном и контрольном вариантах.

Agaricus bisporus (J.E.Lange) Imbach, 1946 – шампиньон биспоровый, агариковый базидиомицет. Съедобный гриб, занимает лидирующую позицию в мире по масштабам производства. Для культивирования требуется специально приготовленный компост на основе соломы и конского навоза. В природе встречается на богатых перегноем почвах.

Штамм *Agaricus bisporus* F-8 был выделен нами с участка со старым нефтяным загрязнением на территории нефтеперерабатывающего завода. Твердофазная культура гриба (на подсолнечной лузге), внесенная в почву с нефтепродуктами, колонизировала субстрат в течение недели, образуя плотный белый мицелий. Мицелий сохранял жизнеспособность и активно рос в почве на протяжении 4 недель эксперимента. При этом происходило снижение концентрации

нефтепродуктов. Наиболее активно штамм разрушал фракцию ПАУ – на 70%.

A. bisporus F-8 являлся активным деструктором ПАУ, которые были не токсичны для него. За 14 сут культивирования деградация фенантрена и антрацена составила 100 и 80% соответственно. Исследуемые ПАУ метаболизировались штаммом с образованием в качестве доминирующих метаболитов соответствующих хинонов. Продуктов дальнейшей утилизации этих веществ не обнаружено. Возможно, это связано с тем, что гриб продуцировал только лакказу. На этом основании можно говорить о зависимости глубины деградации ПАУ от состава лигнинолитического комплекса.

Cladosporium herbarum (Pers.) Link, (1816) – кладоспорий травяной, грибковая плесень. Аскомицет, наиболее часто встречающийся вид из рода *Cladosporium*, который развивается на самых разнообразных органических субстратах, вносит значительный вклад в деградацию растительных остатков, обычен на здоровых растениях как постоянный компонент эпифитной микробной флоры зрелых листьев. Иногда является причиной порчи сена и зерна. Растет плотными бархатистыми дерновинками оливкового, черного или зеленоватого цвета. Гриб разрушает сырье, содержащее целлюлозу и пектин, изменяет окраску бумаги и поверхностных слоев древесины. Некоторые представители этого рода известны также как активные деструкторы углеводов (*C. resiniae* – «керосиновый гриб») и ПАУ (*C. herbarum*).

В наших исследованиях со штаммом *Cladosporium herbarum* MUT 3238 установлено, что гриб является медленно растущим, на стационарную фазу рост выходит только на 3-4 неделю культивирования. Однако является активным деструктором нефти и ПАУ. Деградация нефти составила более 80%, всех исследованных ПАУ – достигала 100%. Продуктами деградации являлись соответствующие хиноны, 2,2'-дифеновая и фталевая кислоты, что свидетельствует о возможности полной утилизации ПАУ этим грибом.

В ответ на присутствие в среде ПАУ и/или их метаболитов гриб продуцировал пероксидазу (вероятнее всего Mn-пероксидазу), активность которой в контрольном варианте не выявлялась.

Это с большой долей вероятности указывает на участие фермента в деградации ПАУ штаммом *C. herbarum*.

Заключение. Таким образом, принадлежность грибов к различным эко-физиологическим группам и культивирование в различных условиях отражаются на составе и динамике продукции лигнинолитического ферментного комплекса и, следовательно, на полноте утилизации исследуемых поллютантов. В случае деградации ПАУ базидиомицетами можно предположить, что лакказа осуществляет начальную атаку молекулы ПАУ, приводящую к образованию хинонов, а пероксидаза обеспечивает их дальнейшее окисление, приводящее в конечном итоге к минерализации ПАУ. В случае аскомицета *C. herbarum* на основании выявления только индуцируемой ПАУ пероксидазы можно сделать предположение о ее окислительной активности в отношении нативных ПАУ. Идентификация «реперных» метаболитов: хинонов, карбоксибензальдегида, дифеновой и фталевой кислот, свидетельствует о том, что пути деградации ПАУ у исследованных грибов сходны.

Кроме того, на основании полученных результатов можно также сделать вывод о необходимости исследования роли других ферментов и факторов в процессах деградации поллютантов грибами.

У всех исследованных грибов выявлен различный состав лигнинолитического ферментного комплекса. У *P. ostreatus* отмечена продукция лакказ и пероксидаз, что является характерным свойством этих грибов. Наличие третьего лигнинолитического фермента – лигнин пероксидазы показано у подстилочного сапротрофа – *S. rugosoannulata*. У *A. bisporus* выявлена только лакказа, у аскомицета *C. herbarum* – только пероксидаза. При этом лигнинпероксидаза строфарии и пероксидаза кладоспориума были индуцибельными и продуцировались только в присутствии определенных поллютантов.

Почвообитающие базидиомицеты *S. rugosoannulata* и *A. bisporus* показали высокий деструктивный потенциал и хорошую приживаемость в почве, что является необходимым условием для микоремедиации. Несмотря на то, что почва не является привычным местом обитания

P. ostreatus, он также хорошо колонизировал почву при внесении в виде твердофазной культуры на лузге.

Использование съедобных грибов в экологических биотехнологиях может быть достаточно дешевым мероприятием, поскольку имеется возможность получения в грибоводческих хозяйствах отработанного мицелия, пригодного для микоремедиации [3]. Более того, остающийся после производства вешенок субстрат, можно использовать для создания компоста, пригодного для выращивания иных видов грибов, например, строфари.

Отрицательным моментом является вероятность попадания в пищу грибных плодовых тел, которые могут накапливать в себе токсиканты. Это требует определенных мер защиты редемируемых участков от проникновения человека. Подобного недостатка лишено использование аскомицета *C. herbarum*, высокая деструктивная активность которого в отношении ПАУ и нефти очень высока. В результате глубинного культивирования можно получить активный мицелий для его дальнейшего применения. Однако основная проблема заключается в аллергенности и возможной фитопатогенности *C. herbarum* в отношении отдельных видов растений.

Все сказанное указывает на то, что в каждом случае вместе с необходимостью детального исследования процессов биodeградации поллютантов требуется и разработка четких правил использования биологических агентов в окружающей среде, главным из которых является снижение поллютантной нагрузки без нанесения еще большего вреда.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 16-14-00081.

ЛИТЕРАТУРА

1. Romagnolo A., Spina F., Risso S., Crotti M., Monti D., Brenna E., Lanfranco L., Varese G.C. Fungal oxidoreductases as biocatalysts for fine chemicals transformations // *Chemical engineering transactions*. 2016. V. 49. P. 31-36.
2. Ogbo E.M., Okhuoya J.A. Biodegradation of al-

iphatic, resinic and aliphatic fractions of crude oil contaminated soils by *Pleurotus tuberregium* Fr. Singer-a white rot fungus // *Afr. J. Biotechnol.* 2008. V. 7(23). P. 4291-4297.

3. Mohammadi-Sichani M., Assadi M., Farazmand A., Kianirad M., Ahadi A., Ghahderijani H. Bioremediation of soil contaminated crude oil by *Agaricomycetes* // *Environmental Health Science Engineering*. 2017. V. 15. P. 1-8.

4. Harms H., Wick L., Schlosser D. In: Dighton J, White J.F., editors. *Fungal community its organ role ecosystem*. Fourth ed. Boca Raton (FL), USA: CRC Press. 2017. P. 459-470.

5. Ghosal D., Ghosh S., Dutta T.K., Ahn Y. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Review // *Front. Microbiol.* 2016. 7:1369. doi: 10.3389/fmicb.2016.01369.

6. Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 2495-2501.

7. Kirk T., Croan S., Tien M., Murtagh K., Farrell R. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium* effect of selected growth condition and use mutant strain // *Enzyme Microb. Technol.* 1986. V. 8. P. 27-32.

8. Pozdnyakova N., Dubrovskaya E., Chernyshova M., Makarov O., Golubev S., Balandina S., Turkovskaya O. The peculiarities of degradation of three-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons by wood-inhabiting fungus *Pleurotus ostreatus* and soil-inhabiting fungus *Agaricus bisporus* // *Fungal Biology*. 2018. V. 122. P. 363-372.

9. Позднякова Н.Н., Никитина В.Е., Турковская О.В. Биоремедиация нефтезагрязненной почвы комплексом грибов *Pleurotus ostreatus* – почвенная микрофлора // *Прикл. биохим. и микробиол.* 2008. Т 44(1). С. 69-75. (Pozdnyakova N.N., Nikitina V.E., Turkovskaya O.V. Bioremediation of oil-polluted soil with an association including the fungus *Pleurotus ostreatus* and soil microflora // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2008. V. 44(1). P. 60–65).

10. Позднякова Н.Н. Биохимические и физиологические аспекты деградации полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) лигнинолитическими грибами: Дис. ... док. биол. наук. Саратов. 2014. 398 с. (Pozdnyakova N.N. Biochemical and physiological aspects of degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by ligninolytic fungi: Dis. ... doc. Biol. sciences. Saratov. 2014. 398 p.).



**PECULIARITIES OF THE APPLICATION OF FUNGI
IN THE ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY**

© O.V. Turkovskaya, N.N. Pozdnyakova

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS,
13, prospect Entuziastov, 410049, Saratov, Russian Federation

The comparative studies of mycoremediation potential of four strains of fungi belonging to different taxonomic and eco-physiological groups including wood- and soil-inhabiting basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* f. Florida, *Agaricus bisporus* and *Stropharia rugosoannulata*, and saprophytic ascomycetes *Cladosporium herbarum* has been conducted.

All studied fungi degraded oil-products and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The degradation of these pollutants was studied under submerged cultivation conditions and in soil. PAHs does not affect the fungal growth. It is known that the degradation ability of fungi associated with the production of the ligninolytic enzymes complex which composition depends from species of fungi and cultivation conditions. *P. ostreatus* produced laccase and peroxidase that is a typical property of the fungi of the genus *Pleurotus*. The presence of the third ligninolytic enzyme – lignin peroxidase was shown in the litter-decomposing saprotroph *S. rugosoannulata* only. *A. bisporus* produced only laccase, ascomycetes *C. herbarum* – only peroxidase. Lignin peroxidase of *S. rugosoannulata* and peroxidase of *C. herbarum* were inducible and were produced only in the presence of the certain pollutants. In the case of *P. ostreatus* and *S. rugosoannulata*, the presence of PAHs in the cultivation medium slightly reduced enzyme production. According to the identification of metabolites formed during the degradation of PAHs (quinones, carboxybenzaldehyde, 2,2'-diphenic and phthalic acids) the similarity of metabolic ways of the degradation of these compounds and the dependence of the completeness of degradation of the PAH molecules from the composition of the ligninolytic complex were showed.

All fungal strains presented in our paper can be used in the processes of mycoremediation taking into account the development of the special measures ensuring safety of similar ecological biotechnologies.

Key words: fungi, basidiomycetes, ascomycetes, biodegradation, petroleum, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), ligninolytic enzymes.

УДК 581.19

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-67-73

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСУЛЬФИДА КАЛЬЦИЯ НА РОСТОВЫЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

© В.В. Федяев, Р.Г. Фархутдинов, И.А. Массалимов, В.О. Цветков, З.И. Шарапова, И.А. Ярмухаметова, Р.Н. Латыпов, А.А. Ямалеева

В лабораторных и полевых условиях было исследовано влияние полисульфида кальция (CaS_4) на ростовые, физиолого-биохимические и продуктивные параметры растений пшеницы. Использовали 0,1; 0,5; 1; 2,5 и 5%-е растворы CaS_4 , инкубируя семена в течение 3 и 6 часов. Измеряли сырую, сухую массу и длину побегов и корней, скорость образования супероксид-аниона, содержание перекиси водорода, определяли пероксидазную и каталазную активности, концентрацию малонового диальдегида (МДА). В полевых исследованиях семена обрабатывали раствором CaS_4 из расчета 0,6 л/т, с последующим определением количества проростков, пораженных корневой гнилью. При обработке семян в течение 3-х часов в 1%-м растворе у 6-суточных проростков наблюдали увеличение длины листьев, а также по совокупности эффектов воздействия на редокс-систему клеток корня в указанной концентрации CaS_4 оказывал наиболее благоприятное влияние. Использование предпосевной обработки раствором CaS_4 в полевых условиях привело к росту урожая почти на 3 ц/га и повышению содержания белка в семенах пшеницы на 6%. Сравнение фунгицидной активности раствора полисульфида серы с известным препаратом ТМТД показало более низкую биологическую эффективность первого. Сделано заключение о влиянии полисульфида кальция на прорастание семян пшеницы в зависимости от концентрации и времени воздействия. Изученный препарат полисульфида кальция проявляет определенную фунгицидную активность.

Ключевые слова: пшеница; предпосевная обработка; полисульфид кальция; редокс-система; урожайность.

Введение. Растущий объем химизации растениеводства требует разработки и внедрения

более эффективных, с биологической точки зрения, и экологически более безопасных препара-

ФЕДЯЕВ Вадим Валентинович – к.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: vadim.fedyaev@gmail.com

ФАРХУТДИНОВ Рашит Габдулхаевич – д.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: frg2@mail.ru

МАССАЛИМОВ Исмаил Александрович – д.т.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: ismail_mass@mail.ru

ЦВЕТКОВ Вячеслав Олегович – к.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: zv347@ya.ru

ШАРАПОВА Зухра Ильгизовна, Башкирский государственный университет,
e-mail: z.sharapova8@yandex.ru

ЯРМУХАМЕТОВА Ильзида Айдаровна, Башкирский государственный университет,
e-mail: frg2@mail.ru

ЛАТЫПОВ Ринат Наилевич, Башкирский государственный университет,
e-mail: ismail_mass@mail.ru

ЯМАЛЕЕВА Анна Александровна – д.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: frg2@mail.ru

тов. Создаваемые соединения должны проявлять не только рострегулирующую активность по отношению к растению, но и обладать более широким спектром действия, например, обеспечивать защиту от фитопатогенов.

Ранее было показано, что биологическая активность высокодисперсных веществ значительно возрастает при переходе в наноразмерный диапазон [1, 2].

Одной из сторон влияния химических защитных соединений на растения, является увеличение образования активных форм кислорода (АФК) в различных компартментах клетки [3].

В связи с вышесказанным, представляется важным изучение процессов, происходящих с про- и антиоксидантной системой растений, связанных с предпосевной обработкой наносерой. Как было показано нами ранее [4], данная система первой реагирует на предпосевную обработку серосодержащими органическими веществами.

Материалы и методы исследования. Для лабораторных исследований были использованы семена и проростки мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Казахстанская 10. Эксперименты по изучению урожайности и устойчивости растений к фитопатогенам в полевых условиях проводили с растениями сорта Башкирская 26.

Для изучения влияния полисульфида кальция (CaS_4) на прорастание семян использовали 0,1; 0,5; 1; 2,5 и 5%-е растворы, принимая исходный коммерческий препарат за 100%-й. Контролем служила дистиллированная вода. Предобработка семян проводилась в герметичных стеклянных флаконах, куда помещали по 50 сухих зерновок одинакового размера, которые погружали в 15 мл раствора. Время выдерживания семян составляло 3 и 6 часов. Далее зерновки промывали в проточной воде, раскладывали на фильтровальной бумаге и помещали в темный термостат на сутки при температуре 26°C. По истечении этого времени, рассчитывали процент проросших семян.

Для работы с 6-суточными растениями полученные по вышеописанной методике проросшие семена далее выращивали методом гидропоники с использованием модифицированной

питательной смеси Хогланда-Арнона при освещении 120 Вт/м² в течение 16 часов и средней дневной температуре 26±2°C.

У проростков измеряли сырую, сухую массу и длину побегов и корней. Скорость образования супероксид-аниона определяли по накоплению адrenoхрома [5]. Содержание перекиси водорода измеряли методом с использованием ксиленолового оранжевого [6]. Экстракцию суммы ферментов проводили с использованием буфера следующего состава: 0,1 М фосфатный буфер, рН 7, 0,01 мМ ЭДТА и 0,1% Triton X-100. Пероксидазную активность определяли по активности гваяколпероксидазы [8]. Активность каталазы измеряли методом, основанным на образовании продукта реакции молибдата аммония и перекиси водорода [8]. Определение концентрации малонового диальдегида (МДА) осуществляли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [9]. Определение содержания белка проводили методом с использованием амидо черного.

В полевых исследованиях семена пшеницы обрабатывали раствором полисульфида кальция из расчета 0,6 л/т. Раствор ТМТД вносили согласно инструкции производителя в количестве 3 л на тонну семян пшеницы. Через 7 суток после посева подсчитывали количество проростков пораженных корневой гнилью. Биологическую эффективность препаратов определяли по формуле Эббота [10].

Все измерения проводили в 4-кратной биологической и 3-6-кратной аналитической повторности. На рисунках представлены средние арифметические значения и ошибки средней.

Результаты и обсуждение. Изучение влияния растворов CaS_4 разной концентрации на процесс прорастания семян пшеницы выявило зависимость количества полученных проростков от уровня содержания серы и времени обработки зерновок.

Доля проросших семян при использовании растворов, содержащих 0,1, 0,5 и 1% CaS_4 , при обработке в течение 3 часов снижалась на 8, 6, 13 и 13%, соответственно. Увеличение времени обработки семян до 6 часов в 1%-м растворе CaS_4 , приводило к снижению прорастания семян на 36%, относительно соответствующего контроля.

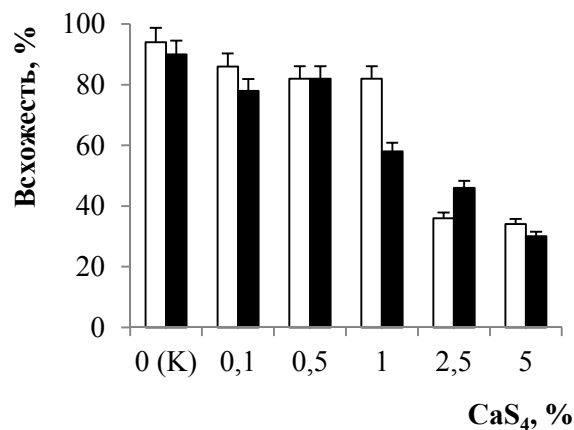


Рис. 1. Влияние концентрации растворов полисульфида кальция (CaS₄) и времени обработки на прорастание семян пшеницы. Обозначения: □ - обработка в течение 3-х часов, ■ - обработка в течение 6-и часов; К - контроль

Использование 2,5 и 5%-х растворов серы приводило к более чем 2-кратному снижению доли проросших семян, как при 3-х, так и при 6-и часах выдерживания семян в растворе препарата (Рис.1).

Таким образом, по результатам первого этапа работы, далее были использованы растворы CaS₄ в концентрации 0,1, 1 и 2,5% при времени обработки семян в течение 3-х часов.

Анализ морфометрических параметров показал увеличение длины первого листа у 6-суточных проростков при предобработке семян растворами, содержащими 0,1 и 1% соединения серы, относительно контроля, на 5 и 8%, соответственно. При этом применение 2,5%-го

раствора CaS₄ приводило к снижению длины первого листа на 3% по сравнению с контрольными растениями (Рис. 2, а).

Средняя длина корней под влиянием серы снижалась относительно контроля пропорционально повышению концентрации CaS₄ на 2, 7 и 16%, соответственно (Рис. 2, а).

Измерение сухой массы побегов и корней показало отсутствие значимых различий между побегами и корнями проростков при использовании растворов соединения серы в концентрации 0,1 и 1% и снижение данного параметра при применении 2,5%-го раствора на 8% у побегов и на 9,5% - корней (Рис. 2, б).

Таким образом, ростовые реакции 6-суточных проростков пшеницы позволили подтвердить тормозящее влияние 2,5%-го раствора полисульфида кальция, первоначально показанное при определении прорастания семян, и стимулирующее удлинение листьев воздействием 1%-го раствора CaS₄.

Измерение скорости образования супероксид-аниона (СОА) в корнях проростков показало, что у растений, семена которых были обработаны 1%-м раствором полисульфида кальция, данный показатель оставался на уровне близком к контрольному значению. Использование 0,1%-го раствора приводило к снижению образования СОА на 35%, а 2,5%-го – на 19%, относительно контроля (Рис. 3, а).

Определение содержания перекиси водорода (H₂O₂) в корнях проростков показало снижение её концентрации при использовании 0,1 и 1%-ых растворов в среднем на 17%. При этом

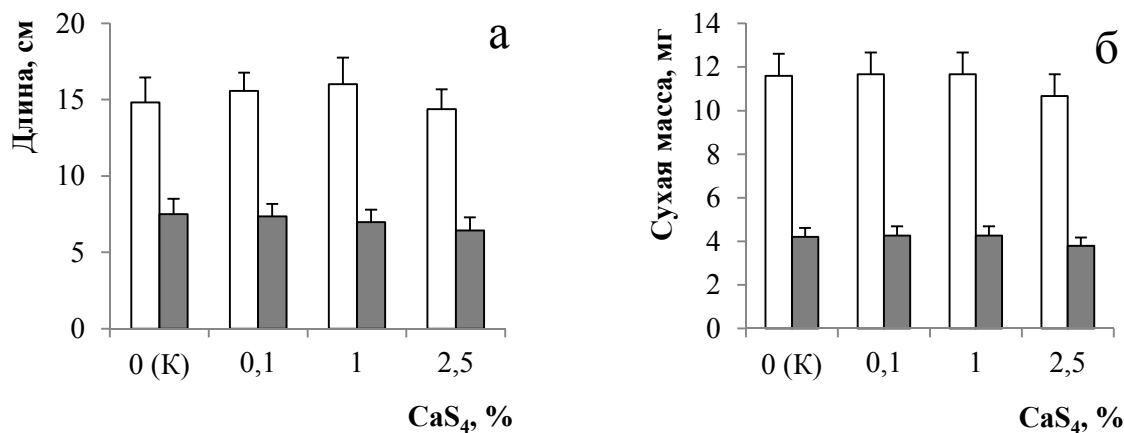


Рис. 2. Зависимость длины первого листа и корней (а) и сухой массы побегов и корней (б) от концентрации раствора полисульфида кальция (CaS₄). Обозначения: □ - лист, ■ - корень; К - контроль

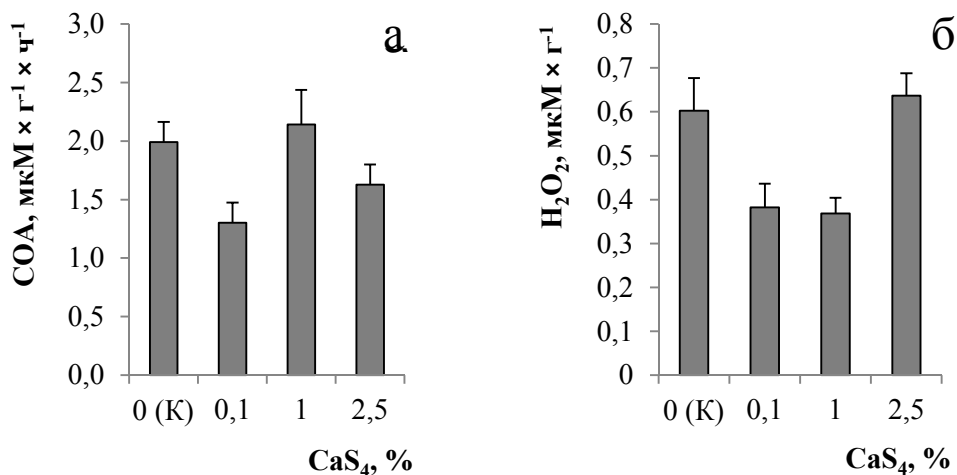


Рис. 3. Влияние растворов полисульфида кальция (CaS₄) разных концентраций на скорость образования супероксид-аниона (COA) (а) и содержание перекиси водорода (H₂O₂) (б) в корнях проростков пшеницы. Обозначения: К - контроль

уровень содержания H₂O₂ в корнях проростков после обработки семян 2,5%-ым раствором препарата серы был на 6,7% выше по сравнению с данным показателем у контрольных растений (Рис. 3, б).

Вероятно, высокая скорость образования супероксид-аниона при использовании 1%-го раствора CaS₄ относительно остальных вариантов применения изучаемого соединения серы, может быть обусловлена поддержанием ростовых процессов побега, как было показано выше. Косвенным подтверждением нашего предположения о благоприятном влиянии на проростки пшеницы 1%-го раствора CaS₄, может служить значительное снижение содержания перекиси водорода в тканях корня растений при использовании данного раствора.

Активность ферментов нейтрализующих перекись водорода – гваяколпероксидазы и каталазы, под влиянием обработки семян препаратом серы изменялась сходным образом. Так, при использовании 0,1%-го раствора CaS₄, происходило увеличение активности обоих ферментов, по сравнению с контролем, на 52 и 60%, соответственно. Обработка семян 1%-м раствором незначительно снижала активность данных ферментов на 4% в случае гваяколпероксидазы и 5% - каталазы. В то же время, 2,5%-й раствор полисульфида повышал активность обоих ферментов (на 20% - гваяколпероксидазы и 10% - каталазы) (Рис. 4, а, б).

Таким образом, активность рассмотренных ферментов зависела от концентрации соединения серы в процессе предпосевной обработки семян пшеницы. При 0,1%-ом содержании полисульфида кальция в растворе происходила стимуляция активности пероксидазы и каталазы, что могло привести к снижению содержания перекиси водорода в клетках корней. При этом низкая концентрация H₂O₂ в корнях растений предобработанных 1%-ым раствором, не сопровождалась повышением активности изученных в работе ферментов, что могло быть обусловлено участием других компонентов антиоксидательной системы растений.

Измерение содержания продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА), показало, что растения, семена которых были обработаны 0,1%-м раствором серы, отличались наиболее высоким содержанием этого соединения – на 172% выше относительно контроля. При применении 1%-го раствора полисульфида, уровень содержания МДА повышался только на 9%, а в случае обработки семян 2,5%-м раствором серы – снижался на 56%, по сравнению с контролем (Рис. 4, в).

Полевые испытания препарата содержащего полисульфид кальция проводились в 2016 году. Как видно из таблицы 1 предпосевная обработка приводила к увеличению урожая почти на 3 ц/га и увеличению содержания белка в зерне на 6%, относительно контроля.

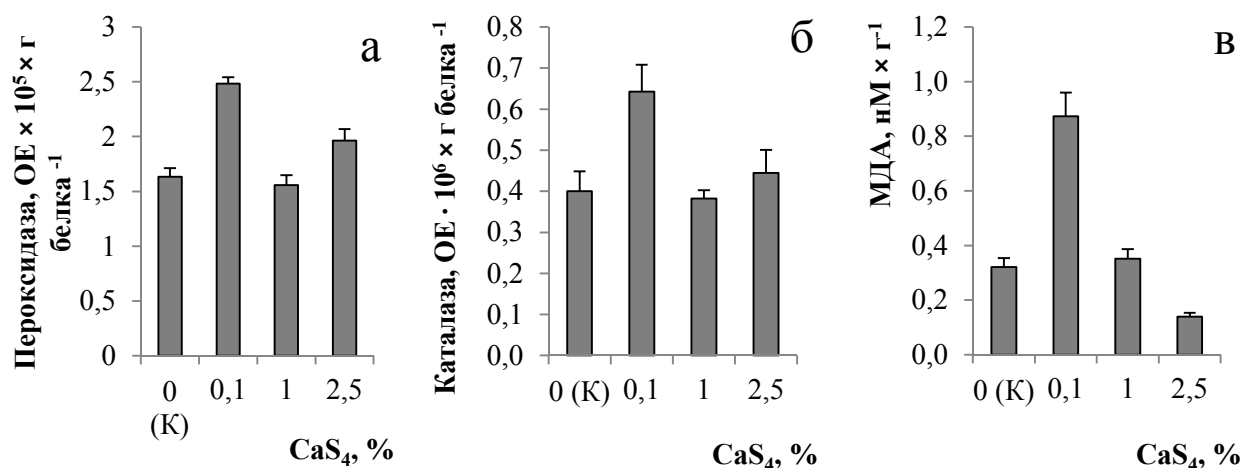


Рис. 4. Влияние растворов полисульфида кальция (CaS₄) пероксидазную (а) и каталазную (б) активности и накопление малонового диальдегида (МДА) (в) в корнях проростков пшеницы. Обозначения: К – контроль

Т а б л и ц а 1

Влияние полисульфида кальция на урожайность яровой пшеницы сорта Башкирская 26

Варианты опыта	Норма расхода, л/т	Урожайность, ц/га		Содержание белка, %
		среднее	прибавка урожая, ц/га к контролю	
Контроль (без обработки)	-	17,8	-	14
Полисульфид кальция	0,6	20,7	2,9	22

Также было проведено отдельное исследование влияния препарата серы на возбудителей корневых гнилей. Пораженность семян корневыми гнилями составляла 65 %. В качестве препарата сравнения был использован препарат ТМТД (бис-(диметилтиокарбомоил)-дисульфид) - современный контактный протравитель семян используемый для борьбы с корневыми гнилями.

Фунгицидную активность препаратов оценивали по степени подавления семенной инфекции возбудителями корневых гнилей (*Helminthosporium sp.*, *Fusarium sp.* и др.). Эффективность воздействия препаратов определяли по процентному содержанию незараженных семян. Всхожесть семян и пораженность их болезнями определяли через 7 дней от начала проращивания. Результат обработки семян показал, что наиболее эффективным являлся препарат ТМТД, который уничтожал 100% патогенных грибов. Полисульфид кальция ингибировал развитие почти 70 % грибной инфекции. Таким

образом, полисульфид кальция уступал по эффективности фунгицидного воздействия более токсичному препарату ТМТД.

Таким образом, по результатам лабораторных и полевых исследований влияния полисульфида серы на растения пшеницы, было показано его влияние на физиолого-биохимические процессы и урожайность. В частности, под действием препарата происходили изменения окислительно-восстановительных процессов в зависимости от концентрации препарата. Препарат повышал урожайность и содержание белка в зерне пшеницы, оказывал фунгицидное действие в отношении возбудителей корневых гнилей у пшеницы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Массалимов И.А., Давлетов Р.Д., Гайфуллин Р.Р., Зайнитдинова Р.М., Шайнурова А.Р., Мустафин А.Г. Наноразмерная сера - эффективный фунгицид и стимулятор роста пшеницы // Вестник защиты растений. 2013. № 4. С. 61-63.

2. Массалимов И.А., Давлетшин Р.Р., Гайфуллин Р.М., Зайнитдинова Л.Р., Мусавирова Р.Д. Сравнение биологических свойств наночастиц серы и известных пестицидов // Башкирский химический журнал. 2013. Т. 20. № 3. С. 142-144.

3. Miteva L., Ivanov S., Alexieva V. Comparative effect of 2,4-D on the glutathione levels, glutathione S-transferase and glutathione reductase activities in pea (*Pisum sativum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) // Докл. Бълг. АН. 2003. Vol. 56. № 3. P. 53-58

4. Набеева Р.А., Федяев В.В., Фархутдинов Р.Г., Ярмухаметова И.А., Хайруллина Р.Р., Ямалеева А.А., Ибрагимов А.Г. Влияние некоторых фунгицидных препаратов на окислительно-восстановительный обмен растений пшеницы // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 5.

5. Часов А.В., Минибаева Ф.В. Действие экзогенных фенолов на супероксидобразующую способность экстраклеточной пероксидазы корней проростков пшеницы // Биохимия. 2009. Т. 74. № 7. С. 766-774.

6. Suárez L., Savatin D.V., Salvi G., De Lorenzo G., Cervone F., Ferrari S. The non-traditional growth regulator pectimorf is an elicitor of defense responses and protects arabidopsis against *Botrytis cinerea* // Journal of Plant Pathology. 2013, V. 95, № 1, pp. 177-180.

7. Розина С.А., Макурина О.Н., Гончарук А.С. Влияние ксенобиотиков на полифенолоксидазную и аскорбинатоксидазную активность в тканях водного погружённого растения *Ceratophyllum demersum* // Поволжский экологический журнал. 2013. № 4. С. 427 – 432.

8. Дмитриюкова М.Ю., Баймиев А.Х., Рахманкулова З.Ф. Влияние экспрессии гена леггемоглобина сои на антиоксидантную систему трансгенных растений табака // Вестник ОГУ. 2010. №12 (118). С. 4-8.

9. Taylor N.L., Millar A.H. Oxidative Stress and Plant Mitochondria. *Methods in Molecular Biology*. 2007. V. 372, pp. 389-403. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_28

10. Мельников Н.Н., Новожилов К.В., Белан С.Р., Пылова Т.Н. Справочник по пестицидам.– М.: Химия, 1985.– 352 с.

References

1. Massalimov I.A., Davletshin R.D., Gayfullin R.R., Zaynitdinova R.M., Shaynurova A.R., Mustafin

A.G. Nanosize sulfur is effective fungicide and growth regulator for wheat. *Vestnik zashhity rasteniy* [Plant protection news]. 2013, no. 4, pp. 61-63. (In Russian)

2. Massalimov I.A., Davletshin R.D., Gayfullin R.R., Zaynitdinova R.M., Musavirova L.R. Comparison of the biological properties of sulfur nanoparticles with known pesticides. *Bashkirsky himichesky jurnal* [Bashkir chemical journal]. 2013, V.20, no. 3, pp. 142-144 (In Russian)

3. Miteva L., Ivanov S., Alexieva V. Comparative effect of 2,4-D on the glutathione levels, glutathione S-transferase and glutathione reductase activities in pea (*Pisum sativum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Dokl. Bolg. AN* [Докл. Бълг. АН]. 2003, V. 56. № 3. pp. 53-58

4. Nabeeva R.A., Fedyayev V.V., Farkhutdinov R.G., Jarmuhametova I.A., Khairullina R.R., Yamaleeva A.A., Ibragimov A.G. Influence of some fungicide on the redox exchange wheat germ. *Sovremennye problem nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education]. 2015, no. 5. (In Russian)

5. Chasov A.V., Minibayeva F.V. Effect of exogenous phenols on superoxide production by extracellular peroxidase from wheat seedling roots. *Biokhimiya* [Biochemistry]. 2009. V. 74, no. 7, pp. 766-774.

6. Suárez L., Savatin D.V., Salvi G., De Lorenzo G., Cervone F., Ferrari S. The non-traditional growth regulator pectimorf is an elicitor of defense responses and protects arabidopsis against *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Pathology*. 2013, V. 95, № 1, pp. 177-180.

7. Rozina S. A., Makurina O. N., Goncharuk A. S. Xenobiotic effects on polyphenoloxidase and ascorbate oxidase activities in the water-submerged plant *Ceratophyllum demersum*. *Povolzhskiy ekologichesky jurnal* [Povolzhskiy Journal of Ecology]. 2013, no. 4, pp. 427 – 432.

8. Dmitryukova M.Yu., Baimiev A.Kh., Rakhmankulova Z.F. Influence of expression of gene of soy leghemoglobin on antioxidant system of transgenesis tobacco plant. *Vestnik OGU* [Bulletin of OSU]. 2010, no. 12 (118), pp. 4-8. (In Russian)

9. Taylor N.L., Millar A.H. Oxidative Stress and Plant Mitochondria. *Methods in Molecular Biology*. 2007. Vol. 372. pp. 389-403. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_28.

10. Melnikov N.N., Novojilov K.V., Belan S.R., Pyilova T.N. *Spravochnik po pesticidam* [Handbook of pesticides]. Moscow: Khimia. 1985, P. 352 (in Russian).



**THE INFLUENCE OF CALCIUM POLYSULPHIDE ON MORPHOLOGICAL
AND PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL PROCESSES OF WHEAT PLANTS**

**© V.V. Fedyaev, R.G. Farkhutdinov, I.A. Massalimov, V.O. Tsvetkov, Z.I. Sharapova,
I.A. Yarmuhametova, R.N. Latypov, A.A. Yamaleeva**

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

The influence of calcium polysulphide on the growth, physiological, biochemical and parameters of productivity of wheat plants was investigated at laboratory and field conditions. Solutions of CaS_4 in concentration of 0.1; 0.5; 1; 2.5 and 5% were used for incubation of seeds during 3 and 6 hours. Shoots and roots fresh and dry weight and length, the rate of superoxide anion formation, the content of hydrogen peroxide, peroxidase and catalase activity, concentration of malonic dialdehyde (MDA) were measured. In the field studies the seeds were treated with solution of CaS_4 at a rate of 0.6 l / t, followed by the determination of the number of seedlings affected by root rot. After 3 hours in 1% solution the leave length increasing of 6-day-old seedlings was observed, also the sum-effect of CaS_4 in this concentration on redox-system of root cells was the most favorable. Using of presowing treatment with CaS_4 solution in the field conditions resulted in an increase of yield on almost 3 q / ha and an increase in protein content in wheat seeds by 6%. Comparison of the fungicidal activity of the solution of calcium polysulphide and the known drug TMTD showed a lower biological efficiency of CaS_4 . The effect of calcium polysulphide on the germination of wheat seeds was depended on the concentration and time of exposure. Also, the investigated preparation of calcium polysulphide showed a certain fungicidal activity.

Key words: wheat; presowing treatment; calcium polysulphide; redox-system; yield.

УДК 581.1.

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-74-80

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МУТАНТА *ARA7 ARABIDOPSIS THALIANA* В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА**© Л.А. Халилова, Ю.В. Орлова, О.В. Майорова, Н.А. Мясоедов,
Л.Г. Попова, Ю.В. Балнокин**

С использованием инсерционного мутанта по гену *ARA7/AtRabF2b* семейства Rab5 малых ГТФаз, который является одним из ключевых регуляторов везикулярного транспорта, исследовали связь эндоцитоза с ионным гомеостатированием и солеустойчивостью *Arabidopsis thaliana*. Измерения массы, содержания K^+ и Na^+ в органах, а также исследование ультраструктуры клеток мутантных растений *ara7* и растений дикого типа (ДТ), выращенных в присутствии и в отсутствие NaCl в питательном растворе (ПР), выявили мутантный фенотип. Фенотип мутанта выражался в увеличенной массе корней и листьев, увеличенном содержании K^+ и сниженном содержании Na^+ в органах. Полученные результаты показывают, что мутация *ara7* стимулирует рост и улучшает ионный статус растений в условиях засоления, что позволяет говорить о более высокой солеустойчивости мутанта *ara7*, чем растений ДТ.

Электронно-микроскопические исследования ультраструктуры клеток корней *ara7* и ДТ *A.thaliana* выявили у мутанта существенные изменения в структурах, вовлеченных в эндосомальный транспорт и аутофагию. Наиболее заметные отличия клеток мутантных растений *ara7* от клеток ДТ состояли в повышенной вакуолизации и везикуляции цитозоля, увеличенном содержании мультивезикулярных тел/поздних эндосом (МВТ/ПЭ) и аутофагических структур, а также сливающихся друг с другом микровакуолей. МВТ/ПЭ вовлечены как в секреторный, так и в эндоцитозный пути переноса веществ в клетке и участвуют в реорганизации белкового состава мембран. Вызванные мутацией изменения ультраструктуры клеток могут указывать на активирование путей эндосомального трафика, направленного на реорганизацию систем ионного транспорта для поддержания ионного гомеостаза в условиях солевого стресса. В изменениях белкового состава мембран, происходящих в ответ на засоление, могут быть вовлечены ионные каналы, транспортёры, транспортные АТФазы и компоненты путей передачи сигналов. Более эффективное ионное гомеостатирование у мутанта должно приводить в условиях засоления к стимуляции роста и повышению солеустойчивости.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, солевой стресс, малая ГТФаза ARA7/AtRabF2b, мутант *ara7*, везикулярный транспорт, фенотип, ультраструктура.

ХАЛИЛОВА Людмила Абдулгадиевна – к.б.н., Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, e-mail: lhalilova@mail.ru

ОРЛОВА Юлия Викторовна – к.б.н., Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, e-mail: orl-jul@mail.ru

МАЙОРОВА Ольга Викторовна, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, e-mail: oli-ifr.ran@mail.ru

МЯСОЕДОВ Николай Александрович – к.б.н., Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, e-mail: ifr@ippras.ru

ПОПОВА Лариса Геннадьевна – д.б.н., Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, e-mail: lora_gp@mai.ru

БАЛНОКИН Юрий Владимирович – д.б.н., Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Московский Государственный университет им. М. В. Ломоносова, e-mail: balnokin@mail.ru

Способность поддерживать низкие концентрации ионов Na^+ в цитоплазме при высоких концентрациях NaCl в питательном субстрате является важной характеристикой солеустойчивости растений. Ряд исследований последних лет показывает, что наряду с ион-транспортирующими белками, осуществляющими трансмембранный перенос ионов, в ионное гомеостатирование растительной клетки вовлечен также везикулярный транспорт (ВТ) [1-3].

ВТ играет важную роль в распределении и доставке веществ в различные части клетки и за ее пределы. Экзоцитоз и эндоцитоз – два основных пути ВТ. Одной из ветвей эндоцитозного пути является транспорт к вакуоли. Вещества доставляются в вакуоль посредством мультивезикулярных тел/поздних эндосом (МВТ/ПЭ) при слиянии их наружной мембраны с тонопластом. Ключевую роль в адресовании эндосом и их последующем слиянии с мембранами-мишенями играют Rab ГТФазы и белки комплекса SNARE [4]. Из 57 членов семейства Rab, кодируемых геномом *A.thaliana*, три белка принадлежат семейству Rab5 ГТФаз. Это два консервативных белка эукариот ARA7/AtRabF2b и RHA1/AtRabF2a, и один белок, специфичный для наземных растений, – ARA6/AtRabF1. ARA7 и RHA1 функционируют на поздних стадиях эндоцитозного пути: на стадии слияния МВТ/ПЭ с вакуолью [5-7].

В настоящей работе мы сосредоточили внимание на Rab5 ГТФазе AtARA7/AtRabF2b, являющейся одним из ключевых регуляторов везикулярного транспорта [5-7]. Роль этого белка в ионном гомеостатировании и солеустойчивости *A.thaliana* мы исследовали с применением инсерционного мутанта *ara7*. Исследуя рост и ионный статус мутантных растений и растений ДТ, а также ультраструктуру их клеток при выращивании в условиях водной культуры в присутствии или в отсутствие NaCl в питательном растворе, мы охарактеризовали мутантный фенотип.

Материалы и методы исследований.

Объект исследований: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (экотип Col-0) (ДТ) и его инсерционный мутант *ara7* по гену ARA7/AtRabF2b (коллекция

SALK_090266C). Семена мутанта были получены из банка семян Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) (arabidopsis.org). Растения выращивали в условиях водной культуры с продувкой ПР воздухом. Семена проращивали на агаризованной питательной среде $\frac{1}{2}$ Мурасиге-Скуга ($\frac{1}{2}$ МС), дополнительно содержащей 1% сахарозу. 14-дневные проростки переносили на жидкий ПР ($\frac{1}{2}$ МС). В вариантах с засолением через 3 сут после перенесения растений на водную культуру, в ПР вносили NaCl дробно по 25 мМ каждые 3 дня до конечной концентрации 100 мМ. Измерения проводили на растениях 45-дневного возраста.

Сырую и сухую массу органов определяли гравиметрическим методом. Для определения сухой массы анализируемый материал взвешивали и высушивали при 90°C до постоянного веса.

Определение содержания ионов. Высушенный при 90°C материал измельчали, подвергали водной экстракции при 100°C в течение 1ч. Концентрацию Na^+ и K^+ в экстрактах измеряли с помощью пламенного фотометра ФПА-2-01 (ОАО ЗОМЗ, Россия). Содержание ионов рассчитывали на сырой вес органов.

Электронная микроскопия. Для исследования ультраструктуры клеток корня использовали 4-дневные проростки, выращенные на агаризованной питательной среде $\frac{1}{2}$ МС, дополнительно содержащей 1% сахарозу, с добавлением или без добавления NaCl в конечной концентрации 100 мМ. Ультраструктуру клеток изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Образцы подготавливали в соответствии со стандартной методикой [8].

Определение гомозиготности растений инсерционного мутанта *A.thaliana* Col-0 по гену ARA7/AtRabF2b. Отбор гомозиготных линий проводили с применением методики ПЦР на матрице геномной ДНК, выделенной из растений. Для этой цели использовали пару ген-специфических праймеров, фланкирующих область вставки, и пару праймеров, один из которых был ген-специфическим, а другой – комплементарен к последовательности Т-ДНК. Праймеры подбирали с помощью программы VectorNTI Suite 9 (Invitrogen).

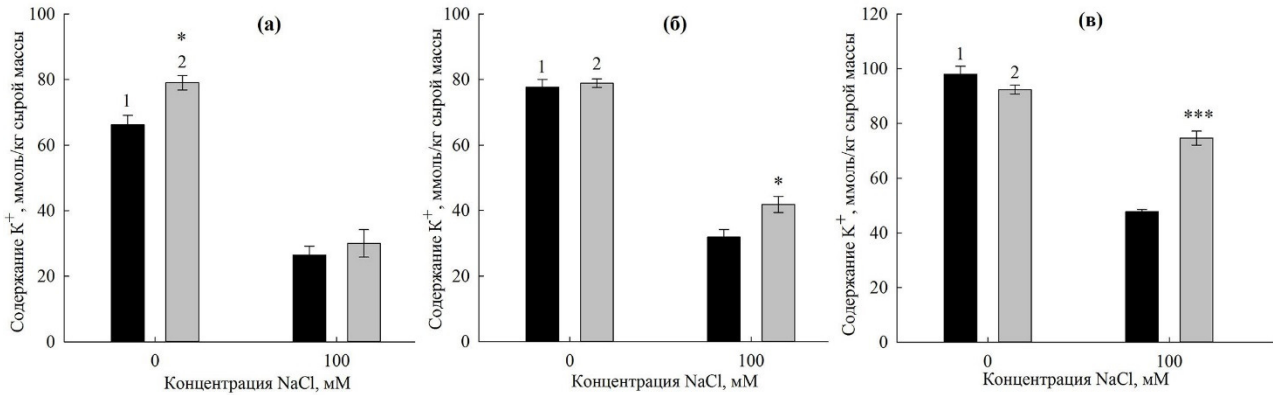


Рис. 1. Содержание K^+ в органах растений дикого типа (ДТ) и мутанта *ara7 A. thaliana* при разных концентрациях NaCl в питательном растворе. 1 – ДТ, 2 – *ara7*. а – корень, б – лист, в – цветочная стрелка. На графиках представлены средние значения и их стандартные ошибки

Статистический анализ. Статистическую обработку проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа, используя Excel 2007 Microsoft. Данные представлены как средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между мутантами и растениями ДТ оценивали по *t*-критерию Стьюдента при разных значениях вероятности: $p \leq 0.05$ - (*), $p \leq 0.001$ - (***)

Результаты.

Ростовые характеристики растений ДТ и мутанта *ara7 A.thaliana*. Определение сухой массы органов мутантных растений *ara7* и растений ДТ обнаружило между ними заметные различия. Мутация привела к заметной стимуляции роста *A. thaliana*. Сухая масса корней и листьев была больше у мутантных растений, чем у растений ДТ при их выращивании как в отсутствие, так и в присутствии NaCl в ПР. Особенно сильная стимуляция роста наблюдалась в корнях в условиях засоления и в листьях в отсутствие засоления. Следует отметить, что хлористый натрий, вызывающий торможение роста органов растений ДТ *A. thaliana*, значительно стимулировал рост корней *ara7* (табл.1). Мутация не оказала влияния на рост цветочных стрелок как в отсутствие засоления, так и при добавлении 100 мМ NaCl в ПР (табл. 1).

Содержание ионов K^+ и Na^+ в органах растений ДТ и мутанта *ara7 A. thaliana*. В отсутствие соли у мутанта *ara7*, по сравнению с

Т а б л и ц а 1

Относительная сухая масса органов растений ДТ и мутанта *ara7 A. thaliana*

Вариант	Корень, %*		Лист, %*		Цветочная стрелка, %*	
	0 мМ	100 мМ	0 мМ	100 мМ	0 мМ	100 мМ
Дикий тип	100	91	100	72	100	34
Мутант (<i>ara7</i>)	111	169	141	82	94	31

Примечание: * за 100% принята масса органов растений ДТ в отсутствие засоления

растениями ДТ, содержание K^+ в корнях было незначительно повышено; содержание этого иона в листьях и цветочных стрелках у *ara7* и растений ДТ достоверно не различалось (рис. 1). Внесение NaCl в ПР привело к существенному снижению содержания K^+ в органах как мутанта *ara7*, так и растений ДТ. Однако у мутанта содержание K^+ в органах оставалось, в среднем, выше, чем у растений ДТ. Особенно заметной эта разница была в цветочных стрелках (рис. 1).

В присутствии NaCl в ПР происходило накопление Na^+ в органах растений *A.thaliana*, как ДТ, так и мутанта, однако у мутанта содержание Na^+ в органах было ниже, чем у растений ДТ, особенно существенной эта разница была в корнях и цветочных стрелках (рис. 2).

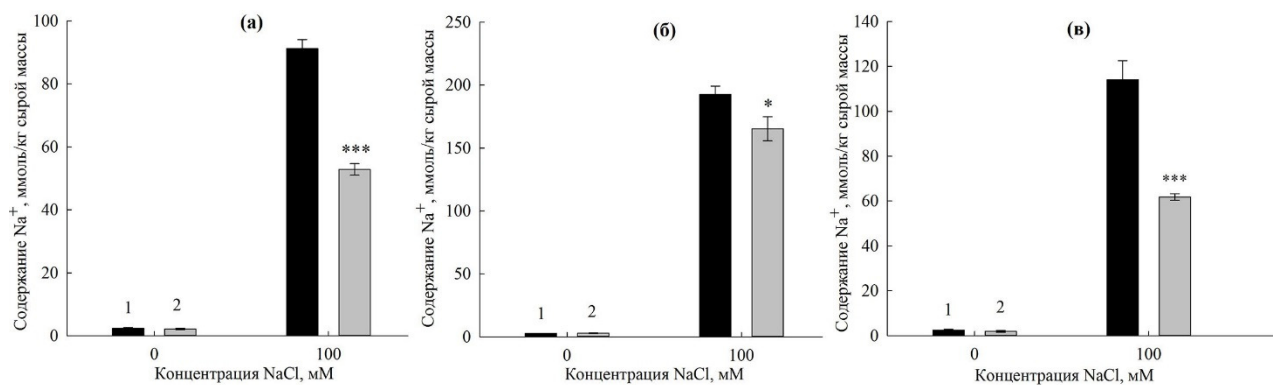


Рис. 2. Содержание Na^+ в органах растений дикого типа (ДТ) и мутанта *ara7* *A. thaliana* при разных концентрациях NaCl в питательном растворе. 1 – ДТ, 2 – *ara7*. а – корень, б – лист, в – цветочная стрелка. На графиках представлены средние значения и их стандартные ошибки

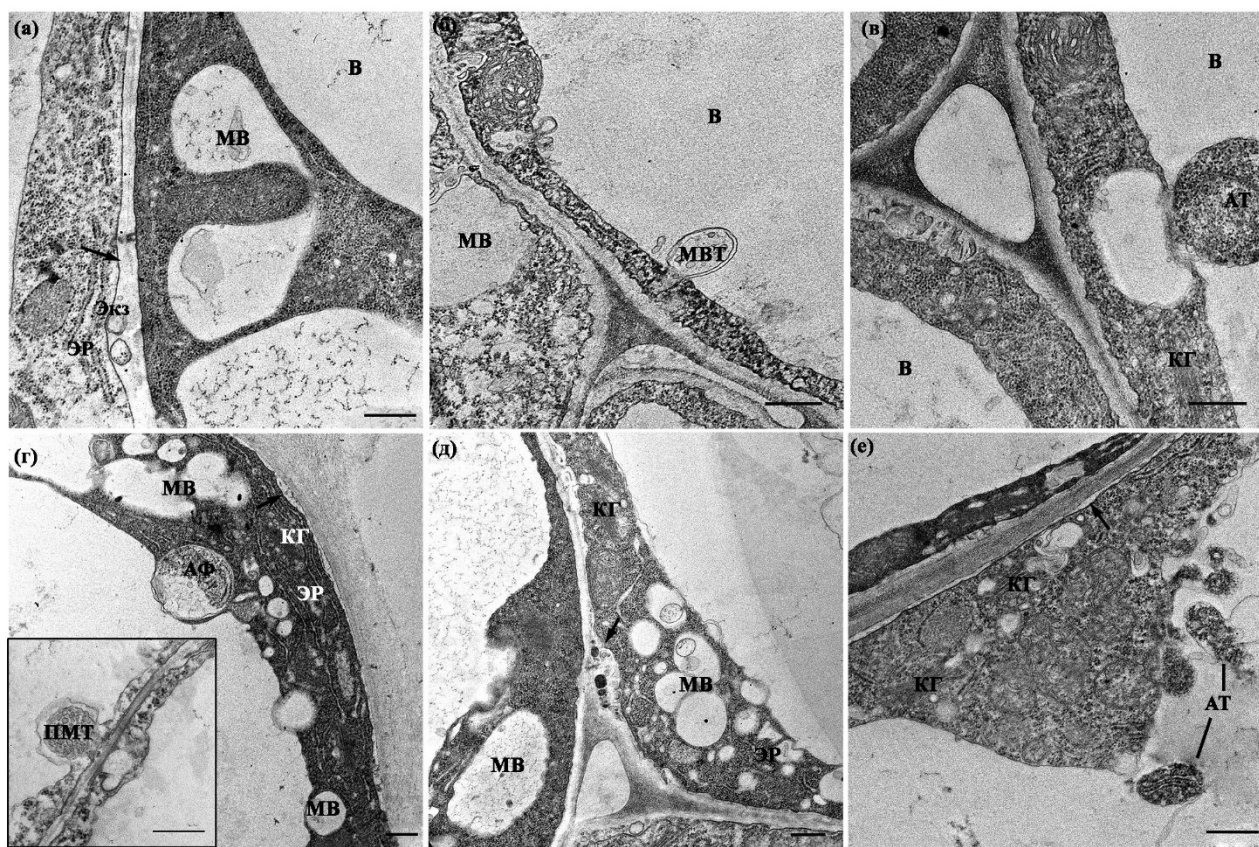


Рис. 3. Ультраструктура клеток корня 4-дневных проростков дикого типа (ДТ) *A. thaliana*. а-в – контроль (3 mM NaCl), г-е – 100 mM NaCl. МВ – микровакуоль, В – вакуоль, Экз – экзосомы, ЭР – эндоплазматический ретикулум, МВТ – мультивезикулярное тело, АТ – аутофагическое тело, КГ – комплекс Гольджи, Аф – аутофагосома, ПМТ – парамуральное тело. Стрелками показана плазмалемма. Масштабный отрезок - 0,5 мкм

Ультраструктура клеток корней мутанта *ara7* и растений дикого типа *A.thaliana* при засолении. Ультраструктура клеток корня растений ДТ, выращенных на ПР без NaCl, была типичной для растений, растущих на пресном субстрате (рис. 3а-в). Цитоплазма содержала различные

органеллы и включения. Эндоплазматический ретикулум (ЭР) был хорошо развит. Помимо большой центральной вакуоли встречались микровакуоли (МВ), которые иногда сливались друг с другом или с центральной вакуолью (рис. 3а). Обнаруживались также мультивезикулярные

тела/поздние эндосомы (МВТ/ПЭ) (рис. 3б). В периплазматическом пространстве (ПП) иногда встречались экзосомы (Экз) (рис. 3а). Диктиосомы аппарата Гольджи (АГ) были плотно упакованы. В цитоплазме встречались аутофагосомы (АФ), а в вакуолях аутофагические тела (АТ), содержащие разного рода цитоплазматический материал, который, по-видимому, подвергался деградации (рис. 3в).

Электронно-микроскопическое исследование клеток корней растений *ara7*, выращенных на ПР без NaCl, не обнаружило заметных отличий в структуре большинства органелл от растений ДТ, выращенных на таком же ПР (рис. 4а-в).

В условиях засоления ультраструктура клеток корня ДТ *A. thaliana* претерпела ряд изменений (рис. 3г-е). В частности, наблюдалось набухание и фрагментация цистерн ЭР, которые формировали МВ неправильной формы (рис. 3д). Вакуолизация цитоплазмы в целом была более

выражена, чем в отсутствие NaCl в ПР. В цитоплазме обнаруживались инвагинации в сторону вакуоли, образованные одновременно двумя мембранами – ПМ и тонопластом. Такие структуры известны как парамуральные тела (ПМТ) (Рис. 3г, вставка). При засолении в клетках ДТ увеличилось также количество МВТ/ПЭ, от аппарата Гольджи отпочковывалось больше везикул ТГС/РЭ (рис. 3г, е). АФ в цитоплазме и АТ в вакуолях растений ДТ в условиях засоления встречались чаще, чем в отсутствие NaCl (рис. 3г, е).

В клетках мутантов *ara7*, выращенных на ПР с NaCl, наблюдалось существенное увеличение количества и размеров МВТ (рис. 4 д). Эти клетки характеризовались также повышенным содержанием АТ в вакуоли (что может указывать на активированный перенос цитоплазматического материала в вакуоль посредством аутофагии), а также в них чаще, чем в клетках ДТ,

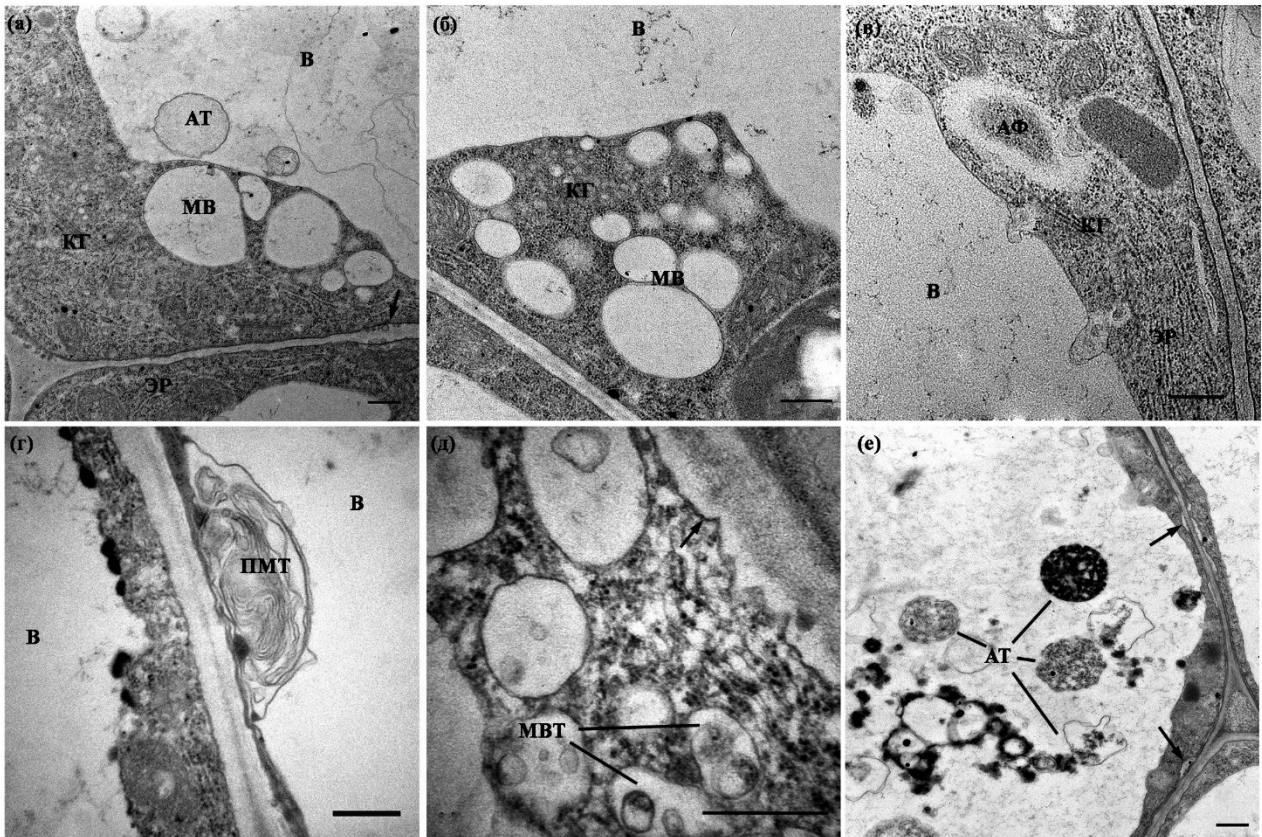


Рис. 4. Ультраструктура клеток корня 4-дневных проростков мутанта *ara7* *A. thaliana*. а-в – контроль (3 mM NaCl), г-е – 100 mM NaCl. МВ – микровакуоль, КГ – комплекс Гольджи, В – вакуоль, ЭР – эндоплазматический ретикулум, АФ – аутофагосома, МВТ – мультивезикулярное тело, АТ – аутофагическое тело, ПМТ – парамуральное тело. Масштабный отрезок - 0,5 мкм

встречались ПМТ (рис. 4е, 4г). Следует отметить, что в клетках корней мутанта, выросшего в условиях засоления, происходило лишь небольшое увеличение количества МВ и не наблюдалось набухания цистерн ЭР и формирования МВ неправильной формы.

Обсуждение. Мутация по гену *ARA7/AtRabF2b*, кодирующему белок, семейства Rab5 ГТФаз, привела к существенному увеличению массы корней и листьев мутанта *ara7* по сравнению с растениями ДТ *A.thaliana* при выращивании растений в условиях засоления, а также к увеличению массы листьев и в отсутствие NaCl в ПР (табл. 1). Мутантные растения, выращенные на ПР с NaCl, были способны поддерживать содержание воды на уровне, наблюдавшемся у растений ДТ. В корнях, листьях и цветочных стрелках мутанта в условиях засоления содержание K^+ было выше, а содержание Na^+ ниже, чем у растений ДТ (рис. 1, 2). Подобные изменения в содержании ионов Na^+ и K^+ в органах мутанта *ara7* отражают возросшую эффективность механизмов ионного гомеостатирования в условиях солевого стресса. В целом, полученные данные показывают, что мутация *ara7* стимулирует рост и улучшает ионный статус растений в условиях засоления, что позволяет сделать вывод о более высокой солеустойчивости мутанта *ara7*, чем растений ДТ.

Проведенное электронно-микроскопическое исследование клеток корня растений *ara7* и ДТ *A.thaliana* выявили у мутанта существенные изменения в структурах, вовлеченных в эндосомальный транспорт и аутофагию (рис. 3, 4). Повышенная вакуолизация цитоплазмы клеток корней мутанта и растений ДТ при засолении, по-видимому, связана с необходимостью компартментализации Na^+ . С этим предположением согласуется более высокое содержание Na^+ в корнях ДТ, чем в корнях мутанта, при выращивании растений на ПР с NaCl (рис. 2). По-видимому, существенный вклад в вакуолизацию цитоплазмы растений ДТ при засолении вносил ЭР, формирующий в этих условиях МВ неправильной формы (рис. 3д). В отличие от растений ДТ, в клетках мутантных растений в условиях засоления наблюдается интенсивное образование

и развитие МВТ. МВТ играют важную роль в везикулярном транспорте. Эти органеллы вовлечены как в секреторный, так и эндоцитозный пути переноса веществ в клетке и участвуют в реорганизации белкового состава мембран [9]. Интенсивное образование и развитие МВТ/ПЭ, могут указывать на активирование путей эндосомального транспорта и более эффективную доставку в клеточные мембраны белков, необходимых для преодоления солевого стресса. Такими белками могут быть ионные каналы, транспортеры, транспортные АТФазы и компоненты путей передачи сигналов.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 18-04-00504.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mazel A., Leshem Y., Tiwari B.S., Levine A. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol.* 2004. Vol. 134. P. 118-128.
2. Baral A., Irani N.G., Fujimoto M., Nakano A., Mayor S., Mathew M.K. Salt-Induced remodeling of spatially restricted clathrin-independent endocytic pathways in Arabidopsis root. *The Plant Cell.* 2015. Vol. 27. P. 1297-1315.
3. Hamaji K., Nagira M., Yoshida K., Ohnishi M., Oda Y., Uemura T., Goh T., Sato M.H., Morita M.T., Tasaka M., Hasezawa S., Nakano A., Hara-Nishimura I., Maeshima M., Fukaki H., Mimura T. Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 2009. Vol. 50. P. 2023-2033.
4. Robinson D.G., Jiang L., Schumacher K. The Endosomal System of Plants: Charting New and Familiar Territories. *Plant Physiology.* 2008, Vol. 147. P. 1482-1492.
5. Ebine K., Miyakawa N., Fujimoto M., Uemura T., Nakano A., Ueda T. Endosomal trafficking pathway regulated by ARA6, a RAB5 GTPase unique to plants // *Small GTPases.* 2012. Vol. 3. P. 23-27.
6. Sohn E.J., Kim E.S., Zhao M., Kim S.J., Kim H., Kim Y.W., Lee Y. J., Hillmer S., Sohn U., Jiang L., Hwang I. Rha1, an Arabidopsis Rab5 homolog, plays a critical role in the vacuolar trafficking of soluble cargo proteins // *The Plant Cell.* 2003. Vol.15. P. 1057-1070.
7. Kotzer A.M., Brandizzi F., Neumann U., Paris N., Moore I., Hawes C. AtRabF2b (Ara7) acts on the vacuolar trafficking pathway in tobacco leaf epidermal cells // *Journal of Cell Science.* 2004. Vol. 117. P. 6377-6389.

8. Балнокин Ю.В., Куркова Е.Б., Халилова Л.А., Мясоедов Н.А., Юсуфов А.Г. Пиноцитоз в клетках корня соленакапливающего галофита *Suaeda altissima* и его возможное участие в транспорте ионов

Cl- // Физиология растений. 2007. Т. 54. С. 892–901.

9. Cui Y., Shen J., Gao C., Zhuang X., Wang J., Jiang L. Biogenesis of Plant Prevacuolar Multivesicular Bodies // Molecular Plant. 2016. Vol. 9. P. 774–786.

MORPHO-PHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF AN *ARABIDOPSIS THALIANA* *ARA7* MUTANT UNDER SALT STRESS

© L.A. Khalilova¹, Y.V. Orlova¹, O.V. Majorova¹, N.A. Myasoedov¹,
L.G. Popova¹, Y.V. Balnokin^{1,2}

¹ Timiryasev Plant Physiology Institute, Russian Academy of Sciences,
35, ulitsa Botanicheskaya, 127276, Moscow, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University (MSU),
1, Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russian Federation

With the application of an insertional mutant of the *ARA7/AtRabF2b* gene of Rab5 small ATPase family being one of the key regulators of vesicular transport we investigated the relationship between endocytosis, ionic homeostasis and salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. The measurements of dry weight, K⁺ и Na⁺ content in organs as well the study of ultrastructure in cells of the mutant *ara7* and wild type (WT) plants grown in NaCl presence or absence in nutrient solution (NS) revealed the mutant phenotype. The phenotype of the mutant was manifested in elevated dry weight of root and leaves, increased K⁺ and decreased Na⁺ contents in organs. The results obtained show that the *ara7* mutation stimulates grow and improves ion status of the plants under salinity testifying in favor of higher salinity tolerance of the mutant *ara7* than WT plants.

Electron microscopic studies of root cell ultrastructure of *ara7* and WT revealed appreciable changes in structures involved in endosomal transport and autophagy. Most noticeable differences of the mutant plant cells from cells of WT consisted in elevated vacuolization and vesiculation of cytosole, increased content of multivesicular bodies/late endosomes (MVB/LE), autophagic structures, and microvacuoles which fused one with another. MVB/LEs are involved both in secretory and endocytic pathways of transport in cell and take part in remodeling of protein composition of membranes. The ultrastructural changes evoked by the mutation likely point to the endosomal trafficking pathway activation that is directed to reorganization of ion transport systems for ionic homeostasis maintenance under salt stress. Ion channels, transporters, transport ATPases, and components of signaling pathways can be involved into changes of protein composition of membranes. More effective ionic homeostasis in the mutant plants compared to WT likely leads to growth stimulation under salinity and to elevation of salt tolerance.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, salt stress, *ARA7/AtRabF2b* low-density gas, mutation, vesicular transport, phenotype, ultrastructure.

УДК 577.15

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-81-85

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗ И ПРОТЕАЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СУБСТРАТОВ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ПОЛИКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

© В.О. Цветков, И.А. Шпирная, В.О. МаксUTOва, Р.И. Ибрагимов

Предложен быстрый и дешевый метод количественного определения активности амилаз и протеаз. Метод предполагает использование полиакриламидного геля с иммобилизованным субстратом гидролаз. Исследуемый раствор помещают в лунки стандартного 96-луночного иммунологического планшета, выдерживают в контакте с поверхностью геля, после чего гель окрашивают и фотографируют. Количественное определение ферментативной активности проводят с использованием компьютерной программы, позволяющей определять цвет участков геля, соответствующих отдельным лункам. Исследована возможность применения метода для количественного определения активности амилаз и протеаз различного биологического происхождения. Показана прямая зависимость получаемых числовых данных от ферментативной активности в экспериментах с использованием амилазы *Bacillus subtilis*, трипсина, амилаз и протеаз личинок колорадского жука. Во всех случаях, за исключением амилазы *Bacillus subtilis*, наблюдается нелинейность зависимости числовых данных от активности фермента.

Ключевые слова: гидролитические ферменты, определение активности ферментов, полиакриламидный гель, протеолитические ферменты, амилитические ферменты.

Введение. Для определения активности гидролитических ферментов широко применяются методы, связанные с расщеплением субстрата, иммобилизованного в геле агарозы, под действием фермента, наносимого в лунки геля [1, 2]. В процессе диффузии фермента из лунки в гель происходит гидролиз субстрата; размер зоны гидролиза позволяет судить о суммарной активности фермента в лунке. Данные методы отличаются простотой и отсутствием необходимости использования дорогостоящего оборудования. Вместе с тем, присутствует ряд недостатков: необходимость использования дорогостоящей агарозы; длительное время анализа (более 10 часов, т.к. фермент диффундирует в гель в

продольном направлении); неоднозначность интерпретации результатов (зоны гидролиза могут отличаться не только размером, но и цветом).

В поисках способа удешевления метода была предпринята попытка использования намного более дешевого полиакриламидного геля (ПААГ) взамен агарозного. Однако использование ПААГ с сохранением прежней техники эксперимента оказалось неудачным: ПААГ, обладая иными механическими свойствами, не позволял вырезать лунки необходимого размера без деформации геля и образования воздушных пузырей под ним. К тому же, использование лунок оставляло нерешенной проблему длительности измерения и неоднозначности интерпретации результатов.

ЦВЕТКОВ Вячеслав Олегович – д.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: zv347@ya.ru

ШПИРНАЯ Ирина Андреевна – к.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: i-shia@yandex.ru

МАКСУТОВА Вилена Олеговна, Башкирский государственный университет,
e-mail: vilenka312@yandex.ru

ИБРАГИМОВ Ринат Исмагилович – д.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: IBRAGIMOV56@yandex.ru

Нанесение раствора с амилолитической активностью на поверхность 4%-ного ПААГ с 1%-ным крахмалом в виде капель объемом 20-100 мкл позволило, после окрашивания геля, получить четко различимые зоны гидролиза субстрата при весьма малом времени гидролиза (около 20 минут). Однако данная техника показала себя неприменимой для количественного определения активности из-за невозможности соблюдения строго одинакового размера капель и их высыхания в процессе эксперимента.

Для обеспечения строго одинаковой площади контакта ферментного раствора с гелем было предложено использовать стандартный 96-луночный иммунологический планшет. С использованием данной техники проведено определение активности амилаз и протеаз различного происхождения.

Материалы и методы.

Материалы и реактивы. В работе использовали фабричный препарат трипсина (Россия), препараты амилаз *Bacillus subtilis* (Sigma, США), желатин, крахмал, 0,05М трис-НСl (рН 8), 0,2М фосфатный буфер (рН 6), акриламид (Biochemica, Германия), тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) (Sigma, США), персульфат аммония (ПСА) (Fluka, США), раствор Люголя и Кумасси. Источниками гидролаз служили личинки колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*).

Получение растворов с ферментативной активностью. Для приготовления препарата амилазы навеску 1 мг фабричного препарата амилазы *Bacillus subtilis* растворяли в 100 мкл фосфатного буфера. 1 мг коммерческого препарата трипсина растворяли в 100 мкл трис-буфера.

Для получения растворов гидролаз личинок колорадского жука навеску замороженных личинок гомогенизировали в фарфоровой ступке со стеклянным песком, ресуспендировали в однократном объеме буферного раствора (0,05М трис-НСl (рН 8) для протеаз, 0,2М фосфатный буфер (рН 6) для амилаз) и выдерживали 15 минут при 4 °С. Полученный экстракт дважды центрифугировали при 10 000 g и 4 °С в течение 10 мин на центрифуге Eppendorf 5417R (Германия). Супернатант использовали как

источник протеолитической и амилолитической активности.

Приготовление геля. Для приготовления 6%-ного полиакриламидного геля смешивали 5 мл Н₂О, 3 мл буферного раствора, 2 мл 30%-ного ПААГ (29,2 % акриламида, 0,8% метиленисакриламида). Добавляли 100 мг субстрата (крахмал или желатин) и растворяли при нагревании. После растворения остужали до 50 °С, добавляли 4 μl TEMED и 40 мкл 10%-ного ПСА. Приготовленный раствор заливали в стекла со спейсерами аналогично тому, как это делается при заливке геля для вертикального электрофореза. Размер геля составлял 8 x 4 x 0,5 мм. Стекла с раствором помещали в суховоздушный термостат, в котором поддерживалась температура 37 °С. Выдерживали в течение 15 минут для полимеризации геля. Затем разделяли стекла так, чтобы гель остался на одном из стекол, и смывали с поверхности геля незаполимеризовавшийся акриламид дистиллированной водой. Стряхивали остатки воды, просушивали поверхность геля фильтровальной бумагой.

Проведение эксперимента. В лунки стандартного 96-луночного иммунологического планшета, заблаговременно помещенного в суховоздушный термостат с температурой 37 °С, наносили растворы с ферментативной активностью до конечного объема 200 мкл.

Помещали стекло с гелем на планшет так, чтобы гель закрывал сверху лунки с образцами (рис.1). Стекло с гелем закрепляли на планшете с помощью резинок таким образом, чтобы гель после закрепления оставался неподвижным относительно планшета и герметично закрывал лунки с образцами. Переворачивали получившуюся конструкцию стеклом вниз и слегка покачивали в вытянутой руке, добиваясь, чтобы жидкость в лунках стекла на гель. Инкубировали в течение 20 минут в термостате при 37 °С. Затем, перевернув конструкцию стеклом вверх, отделяли стекло с гелем от планшета. Немедленно промывали поверхность геля водой и погружали в окрашивающий раствор. Гель, содержащий крахмал, окрашивали в растворе Люголя (50 μl на 50 мл воды) 1 минуту; гель, содержащий желатин, окрашивали Кумасси (1 мг на 100 мл воды) 10 минут. После окрашивания получали

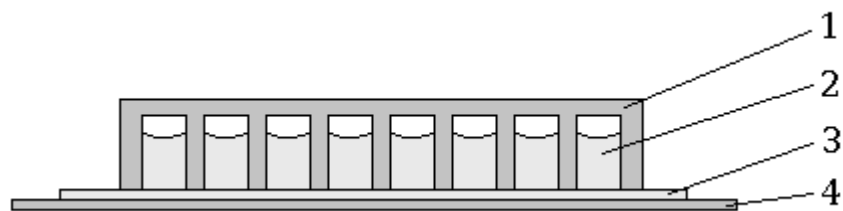


Рис. 1. Схема конструкции для определения активности ферментов. 1 – иммунологический планшет, 2 – образец с ферментативной активностью в лунке планшета, 3 – полиакриламидный гель, 4 – стекло. Резинки, прижимающие планшет к гелю, не показаны

цифровое изображение геля с помощью фотоаппарата.

Анализ результатов. Изображения гелей обрабатывали с использованием оригинальной компьютерной программы, написанной на языке программирования Javascript, для получения числовых данных. Полученные данные обрабатывали в программе Statsoft Statistica 10. Определение ферментативной активности проводили в четырехкратной повторности, на графиках приведены средние величины полученных значений цвета.

Результаты и их обсуждение. Для исследования возможности количественного определения гидролитической активности использовали растворы амилазы *Bacillus subtilis* и трипсина с ферментативной активностью от 8 до 103 Е (мкмоль субстрата в минуту) в мл. Выдерживание растворов в контакте с гелем в течение 20 минут позволяет, после окрашивания, различить участки геля с различной степенью гидролиза субстрата и, соответственно, с различной яркостью (рис. 2 а, б). Следует отметить, что техника эксперимента позволяет, при необходимости,

увеличить или уменьшить время инкубации в широких пределах для повышения чувствительности метода при работе с различными концентрациями ферментов.

Для анализа изображений гелей была написана компьютерная программа на языке программирования Javascript [3] (рис. 3). Программа позволяет выделить на изображении геля круглые участки, соответствующие лункам планшета. Для упрощения алгоритма и устранения возможных «краевых артефактов» внутри «лунки» выделяется квадрат со стороной, равной радиусу лунки (центр квадрата совпадает с центром лунки) (см. рис. 3). Для каждой точки квадрата вычисляется суммарное значение цвета, равное сумме значений компонентов цветовой модели RGB (данная величина принимает значения от 0 до 765, где 0 соответствует чистому черному цвету, 765 – белому). Значения цвета всех точек квадрата усредняются, давая среднее значение цвета лунки.

При определениях активности амилазы *Bacillus subtilis* и трипсина была получена прямая зависимость величины значения цвета от ферментативной активности (рис. 4 а, б).

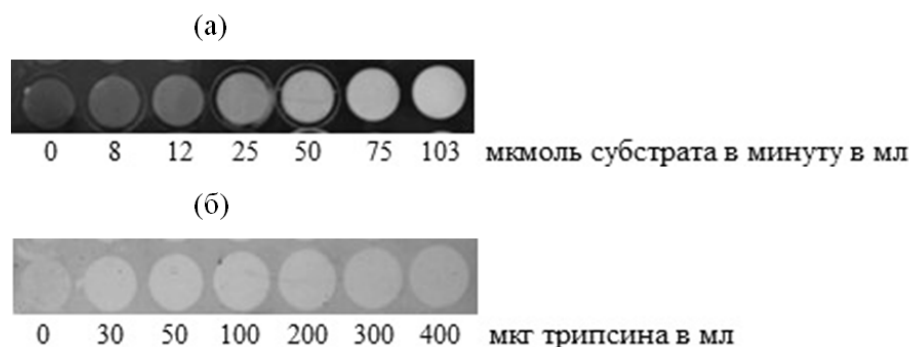


Рис. 2. а – полиакриламидный гель с 1%-ным крахмалом после инкубирования с амилазой *Bacillus subtilis* и окрашивания раствором Люголя; б – полиакриламидный гель с 1%-ным желатином после инкубирования с трипсином и окрашивания кумасси



Рис. 3. Интерфейс компьютерной программы для определения значений цвета на изображении геля

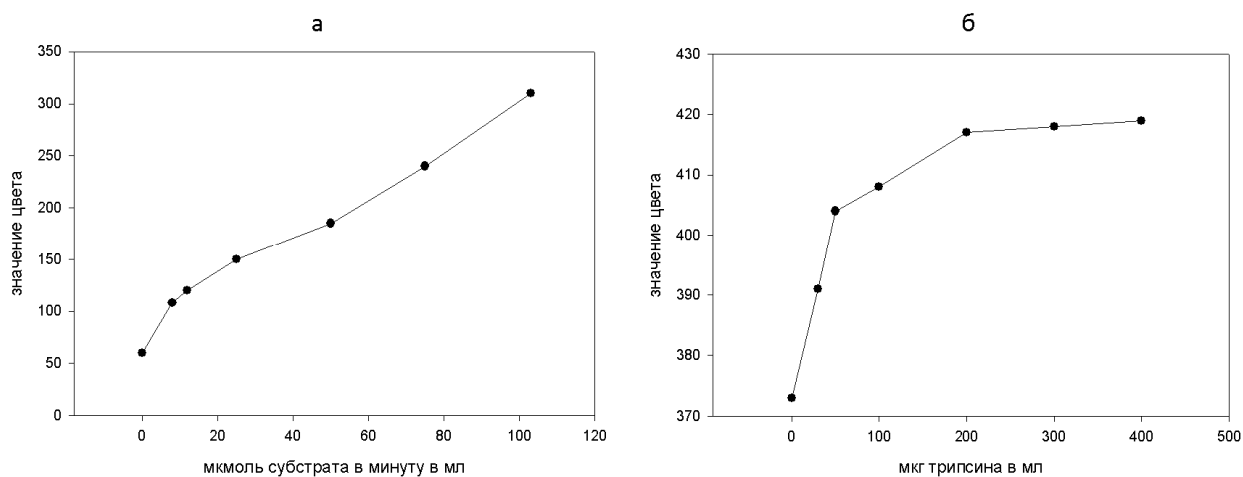


Рис. 4. Значения цвета участков геля при различной концентрации амилазы *Bacillus subtilis* (а) и трипсина (б)

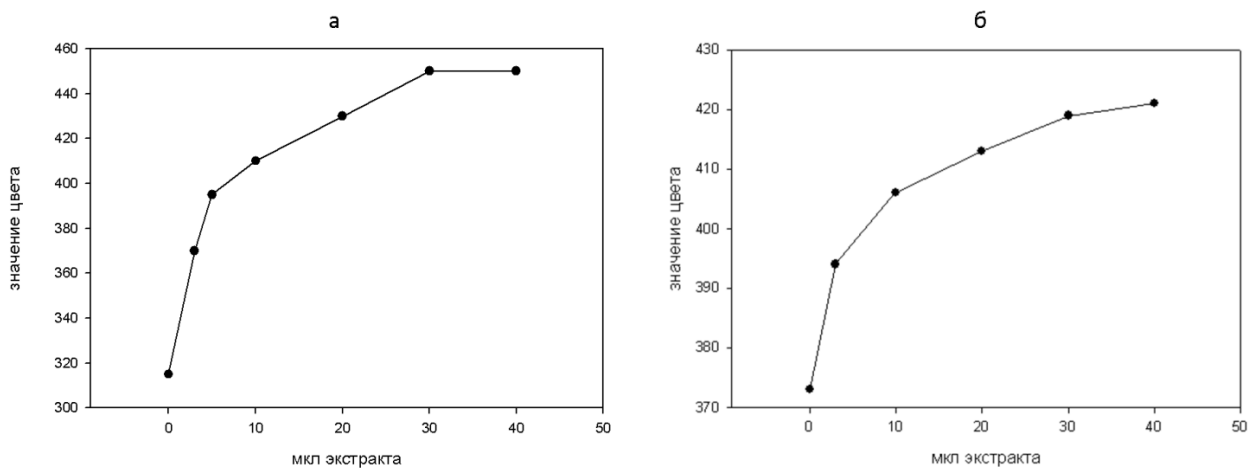


Рис. 5. Значения цвета участков геля при различной концентрации экстракта личинок колорадского жука. а – определение амилаз (гель с крахмалом, окраска раствором Люголя); б – определение протеаз (гель с желатином, окраска кумасси)

Зависимость значения цвета от концентрации амилазы *Bacillus subtilis* может быть описана

линейной функцией, тогда как для трипсина она имеет ярко выраженный нелинейный характер.

Подобная же нелинейная зависимость была получена при определении активности амилаз и протеаз личинок колорадского жука (рис. 5 а, б).

Таким образом, предложенный метод может быть использован для быстрого и дешевого, по сравнению с широко используемыми в настоящее время методами, определения активности амилалитических и протеолитических ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shpirnaya I.A., Umarov I.A., Shevchenko N.D., Ibragimov R.I. Evaluation of the activity of hydrolases and their inhibitors using substrates immobilized on agarose gel // *Applied biochemistry and microbiology*.

2009. V. 45 (4). P. 449-453

2. Толчёнов А.А., Зубов Д.В., Сергеева А.В. Оперативный метод определения активности целлюлаз // *Программные системы: теория и приложения*. 2009. С. 207-216

3. Свид. 2018611900 Российская Федерация. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ. Инструмент определения гидролитической активности по гидролизу субстрата в полиакриламидном геле / В.О. Цветков, И.А. Шпирная, В.О. МаксUTOва; заявитель и правообладатель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный университет» (RU). - № 2017663245; заявл. 20.12.2017; опублик. 08.02.2018, Реестр программ для ЭВМ. – 1 с.



DETERMINATION OF THE ACTIVITY OF AMYLASES AND PROTEASES USING SUBSTRATE-IMMOBILIZED POLYACRYLAMIDE GEL

© V. Tsvetkov, I. Shpirnaya, V. Maksutova, R. Ibragimov

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

A fast and cheap method of quantitative determination of amylase and protease activity is proposed. The method involves the use of polyacrylamide gel with immobilized substrate hydrolase. The test solution is placed in the holes of a standard 96-well immunological tablet, kept in contact with the gel surface, after which the gel is painted and photographed. Quantitative determination of enzymatic activity is carried out using a computer program that allows to determine the color of the gel sites corresponding to individual wells. The possibility of using the method for quantitative determination of the activity of amylases and proteases of different biological origin is investigated. The direct dependence of the obtained numerical data on the enzymatic activity in experiments using amylase *Bacillus subtilis*, trypsin, amylase and protease of Colorado potato beetle larvae was shown. In all cases, except amylase *Bacillus subtilis*, there is a nonlinearity of the dependence of the numerical data on the enzyme activity.

Key words: hydrolytic enzymes, enzyme activity determination, polyacrylamide gel, proteolytic enzymes, amylolytic enzymes.

УДК 577.2.08

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-86-93

НЕКОТОРЫЕ НЕДАВНИЕ УЛУЧШЕНИЯ МЕТОДОВ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ

© А.В. Чемерис, Н.А. Рожнова, Г.А. Геращенко

В геномах бактерий известны повторяющиеся элементы, названные CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), являющиеся прототипом примитивной иммунной системы прокариот. Эти CRISPR-локусы выделяют в два класса, 6 типов и около 20 подтипов. Биоинформатические исследования CRISPR-локусов играют очень важную роль и нацелены на понимание иммунной защиты бактерий, обнаружение CRISPR-кассет в геномах различных микроорганизмов и в метагеномных данных, а также дизайну направляющих (гидовых) РНК. В обзоре кратко рассматриваются недавно написанные программы дизайна гидРНК. Отдельное внимание обращено на проблему эффективности и специфичности CRISPR/Cas редактирования. В 2018 г. больше внимания стало уделяться использованию так называемого «бесследного» (DNA-free) редактирования геномов, в результате которого не происходит встраивания чужеродной ДНК векторов-переносчиков в ДНК редактируемого организма и растений в частности, что с полным основанием позволяет относить такие организмы не к генно-модифицированным. Говорится о новой странице в геномном редактировании без образования двуцепочечных разрывов молекул ДНК на основе редактирования единичных оснований. Так, «сшиванию» каталитически неактивной нуклеазы Cas9 или никазы Cas9 с дезаминазой, позволяет проводить точечные однонуклеотидные замены, например С→Т или G→А, обеспечивая как замены отдельных аминокислот в нужных местах белковых молекул, так и вызывая нарушения работы генов, что продемонстрировано в 2018г. на растениях. Упомянется уникальный метод редактирования eMAGE – eukaryotic Multiplex Automated Genome Engineering, заключающийся в доставке в делящуюся клетку одноцепочечных фрагментов ДНК, имитирующих собой фрагменты Оказаки, которые в репликативной вилке замещают последние при синтезе отстающей цепи, а за счет имеющихся некоторых отличий от геномной ДНК вносят желаемые изменения в последовательность реплицируемой ДНК. Не обойдена вниманием и проблем взаимоотношения CRISPR/Cas геномного редактирования и ГМО. В итоге выражена надежда, что в обществе утвердится понимание того, что геномное редактирование растений не опаснее традиционных биотехнологических и селекционных методов, основанных на радиационном или химическом мутагенезе.

Ключевые слова: геном, геномное редактирование, CRISPR/Cas системы, CRISPR/Cas технология, гидовая РНК, ПЦР, ГМО.

Открытие у бактерий защитных систем на основе таких повторяющихся элементов их геномов как CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) повлекло за собой разработку методов CRISPR/Cas геномного редактирования [1, 2] после чего в мире начался самый настоящий бум вокруг данной технологии.

Причем, по прошествии 5 лет он не стихает, а только усиливается. При этом постоянно появляются различные вариации существующих подходов, а также продолжается разработка новых. Если после завершения секвенирования генома человека в 2003 г. наступивший период стали называть «постгеномной эрой», то сейчас

ЧЕМЕРИС Алексей Викторович – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
e-mail: chemeris@anrb.ru

РОЖНОВА Наталья Анатольевна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
e-mail: rnata2013@gmail.com

ГЕРАЩЕНКОВ Григорий Алексеевич – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
e-mail: apomixis@anrb.ru

появилась новая черта, разделяющая, по крайней мере, часть биологической науки, на периоды «до» выявления CRISPR/Cas систем и «после», что лишней раз свидетельствует о революционном характере данной технологии. И теперь широко известную аббревиатуру «В.С.» («Before Christmas» или в русскоязычных вариантах «до рождества Христова», «дохристианская эра», либо «до нашей эры») даже стали использовать для обозначения новой эпохи в биологии – «Before CRISPR» [3].

Осенью 2017 г. нами вместе с другими соавторами был подготовлен тематический номер журнала «Биомика» (<http://biomics.ru>), целиком посвященный всестороннему рассмотрению CRISPR/Cas систем и методам геномного редактирования преимущественно на их основе. Однако ввиду чрезвычайно бурного развития методологии этих подходов на основе CRISPR/Cas систем назрела необходимость подготовить новый обзор, в котором были бы отражены самые последние новшества в этой области молекулярной биологии и геномной инженерии и поэтому подавляющее число цитируемых в данной статье литературных источников датированы 2018 г. или концом 2017 г. Но таковых публикаций уже настолько много, что в кратком обзоре можно коснуться только небольшой их части.

Поиск CRISPR-локусов в геномах микроорганизмов. В настоящее время у бактерий известно два класса, 6 типов и около 20 подтипов CRISPR-локусов, но можно ожидать, что их многообразие гораздо шире и для выявления новых CRISPR/Cas систем требуется применение специализированных компьютерных программ, рассчитанных на детекцию в геномах конкретных микроорганизмов, а также в метагеномах таких последовательностей. Однако даже известные CRISPR-локусы таят в себе много загадок, поскольку для подавляющего их числа неизвестно происхождение спейсеров и соответственно мишеней, которым бактерии намерены противостоять. Также остаются необъяснимыми очень большие различия в числе CRISPR-кассет у близких видов микроорганизмов. При этом, знание тонких механизмов функционирования CRISPR/Cas иммунной защиты от вирусных атак, хотя непосредственного отношения к

геномному редактированию не имеет, крайне важно для общего понимания функционирования этой системы и ряд недавних статей посвящены вопросам контроля за CRISPR/Cas-арсеналом со стороны микроорганизмов [4, 5]. И здесь биоинформатические исследования играют очень большую роль. Ранее мы подробно рассмотрели базы данных по CRISPR/Cas локусам и существующие программы их поиска [6], однако за время, прошедшее с момента написания той статьи, появились новые подобные инструменты. Так, написана новая программа **CRF (CRISPR Finder by Random Forest)**, предназначенная для улучшенного обнаружения CRISPR-кассет в геномах различных микроорганизмов, поскольку она позволяет отфильтровывать ложно-положительные результаты [7]. Программа CRF находится в свободном доступе (<http://bioinfo.folab.miamioh.edu/crf/home.php>) и позволяет в режиме on-line вести поиск CRISPR-кассет. На самом деле, на первом этапе *in silico* анализа бактериальных геномов с помощью CRF сначала в действие вступает ранее написанная программа **CRISPR Recognition Tool - CRT** и уже затем из полученной информации CRF позволяет отсеять обычные тандемные повторы, не имеющие отношения к CRISPR-локусам. Другим недавно предложенным инструментом поиска CRISPR-кассет в метагеномных данных служит программа **MetaCRIST (Metagenomic CRISPR Reference-Aided Search Tool)** [8]. Она доступна по адресу <https://github.com/mollera/CRIST> и может быть установлена на компьютер конечного пользователя. Разработчики сообщают, что MetaCRIST обеспечивает улучшенную детекцию CRISPR-кассет *de novo*.

Но это не единственное место применения компьютерных программ при изучении и использовании CRISPR/Cas систем. Крайне важное значение в геномном редактировании уделяется дизайну направляющих (гидовых) РНК (гидРНК), к рассмотрению которых ниже перейдем.

Дизайн гидовых (направляющих) РНК для осуществления CRISPR/Cas редактирования геномов. Точность и эффективность геномного редактирования во многом зависит от выбранных участков геномной ДНК, которые

требуется «подредактировать» и в этом вопросе без компьютерных программ и без баз данных обойтись невозможно. Ранее, мы довольно подробно охарактеризовали свыше 70 компьютерных программ дизайна гидРНК [9] однако после написания той статьи появились новые программные продукты, о которых желательно знать экспериментаторам, занятым геномным редактированием.

Одной из таких программ служит **CRISPu-lator** [10], находящаяся в свободном доступе - <http://crispulator.ucsf.edu>. Особенность данной программы заключается в возможности осуществлять дизайн гидРНК для геномного редактирования (CRISPRn) и для интерференции (CRISPRi). Сообщалось о разработке web-инструмента **pgRNAFinder**, позволяющего подбирать парные гидРНК независимо от расстояния локализации их мишеней [11]. Для дизайна гидРНК и редактирования геномов как промышленных организмов, так и обычных немодельных объектов был создан такой инструмент как **CASPER – CRISPR Associated Software for Pathway Engineering and Research** [12]. Для дизайна гидРНК, предназначенных для редактирования человеческого генома, сопровождаемого выявлением как целевых, так и нецелевых сайтов редактирования разработан такой web-инструмент как **CRISPCut** [13], находящийся по адресу - <http://web.iitd.ac.in/crispcut/webserver/index.html>. Поскольку существуют Cas нуклеазы, мишенью которых служат молекулы РНК, то неудивительно появление программы **CRISPR-RT**, нацеленной на дизайн соответствующих гидРНК [14]. Для оценки точности проведенного геномного редактирования также существует немало компьютерных программ, к которым недавно добавилась еще одна **CRISPRMatch** [15].

Помимо качественного дизайна гидРНК на эффективность и специфичность процесса геномного редактирования влияют и другие факторы, которым также следует уделить определенное внимание.

Эффективность и специфичность CRISPR/Cas редактирования. Поскольку в своей предыдущей статье, посвященной CRISPR/Cas редактированию геномов растений [16], мы довольно подробно рассмотрели различные улуч-

шения этой технологии прежних лет, то здесь затронем лишь новшества последних месяцев. Так, недавно было показано, что химическая модификация гидРНК в определенных положениях углеводородного скелета 2'-О-метил-3'-фосфоноацетатом значительно снижала редактирование геномов в нецелевых местах [17]. Другими авторами сообщено, что нахождение на 5'-конце гидРНК 5-бромо-2'-дезоксинуридина в 300 раз повышало дискриминирующую способность при сравнении гидРНК, несущих замены единичных нуклеотидов [18]. Десятикратно возрастала эффективность редактирования после предобработки стволовых клеток человека диметилсульфоксидом в нетоксичной 1%-ной концентрации в течение суток и при этом специфичность редактирования не снижалась [19], что, по-видимому, можно объяснить улучшенным попаданием внутрь клеток CRISPR/Cas компонентов, поскольку известно, что ДМСО способствует проникновению различных веществ. Для растительных организмов на примере гена *GFP* показано, что экспозиция соматических тканей арабидопсиса при температуре 37°C увеличивала эффективность редактирования в 5 раз, а для генеративных тканей до 100 раз [20]. Причем такой эффект был характерен не только для арабидопсиса, но и для лимона. Авторы объясняют это тем, что Cas9 нуклеаза из *Streptococcus pyogenes* работает намного эффективнее при 37°C, чем при 22°C, что было продемонстрировано ими в опытах *in vitro*. Таким образом, повышение температуры, при которой происходит редактирование с помощью CRISPR/Cas системы, представляет собой простой метод ощутимого улучшения технологии геномного редактирования.

Если нокаутное редактирование с объединением концов по месту двуцепочечного разрыва путем негомологичной репарации в целом проходит с высокой эффективностью, то нокин эксперименты, в ходе которых требуется внедрить некую новую последовательность ДНК в место двуцепочечного разрыва, не столь успешны. Поэтому любые вариации CRISPR/Cas редактирования, направленные на улучшение нокин-вариантов редактирования геномов, представляют повышенный интерес. Так, в одной из работ было предложено подбирать множественные

гидРНК с перекрывающимися (на 5 или 6 нуклеотидов) последовательностями спейсеров, что, по мнению авторов, возможно способно повысить выход редактированных форм [21]. Доставка в клетку рекомбинантного аденовируса, обеспечивающего синтез одноцепочечной протяженной ДНК непосредственно при редактировании после образования под действием CRISPR/Cas системы двуцепочечных разрывов, повысило эффективность процесса геномного редактирования в нокин формате почти в 20 раз [22].

В немалом числе работ в 2018 г. сообщается об использовании так называемого «бесследного» (DNA-free) редактирования геномов, в результате которого не происходит встраивания никакой чужеродной ДНК в ДНК редактируемых организмов и растений в частности [23-26], что позволяет относить такие организмы не к генно-модифицированным в их нынешнем понимании. Подобное редактирование достигается за счет доставки компонентов CRISPR/Cas систем в клетку с помощью биобаллистики или иным способом в виде рибонуклеопротеидных комплексов вкпе с химически синтезированными молекулами гидРНК, что особенно удобно при использовании нуклеазы *Spf1*, обходящейся более короткой гидРНК [27].

Геномное редактирование без образования двуцепочечных разрывов молекул ДНК. Хорошо известно, что наиболее эффективное геномное редактирование с помощью как CRISPR/Cas технологий, так и технологий предыдущих поколений происходит только после образования двуцепочечных разрывов в молекулах ДНК. При этом в нокаутном варианте редактирования по местам разрыва происходит негомологичное объединение концов, сопровождаемое «инделами» (инсерциями или делециями единичных либо нескольких нуклеотидов), что в большинстве случаев приводит к нарушению рамки считывания и повреждению гена. Однако относительно недавно разработан весьма эффективный вариант CRISPR/Cas редактирования геномов, не требующий возникновения разрывов цепей ДНК. Так, если «сшить» каталитически неактивную нуклеазу Cas9 или никазу Cas9 с какой-либо дезаминазой, то можно проводить точечные однонуклеотидные замены, например

C→T или G→A, обеспечивая как замены отдельных аминокислот в нужных местах белковых молекул, так и вызывая нарушения работы генов [28-30]. Другими авторами было показано, что с помощью Cas9 нуклеазы, содержащей соответствующую дезаминазу, можно конвертировать триплеты CAA, CAG, CGA, TGG в терминаторные кодоны TAA, TAG и TGA, обрывающие трансляцию полноценного белка [31]. В 2018 г. такое редактирование было перенесено и на растительные организмы [32-34]. Недавно сообщено о точечном редактировании гена ацетоллактатсинтазы арбуза с помощью Cas9 никазы, сшитой с цитидиндезаминазой [35]. При этом известно, что некоторые мутации в данном гене обеспечивают устойчивость к гербициду трибенурону. Что говорит о возможности использования данного подхода для создания гербицидоустойчивых редактированных растений. Произведенное редактирование выбранной мишени в виде замены C на T в кодоне Pro190 показало довольно высокую частоту, составившую 23% для поколения T₀.

Другой подход к геномному редактированию без формирования двуцепочечных разрывов и без использования CRISPR/Cas технологии заключается в образовании множественных мутаций в нужных местах генома методом, получившим название eMAGE – ekaryotic Multiplex Automated Genome Engineering [36], ранее применявшимся только для прокариот. Суть метода заключается в доставке в делящуюся клетку одноцепочечных фрагментов ДНК, имитирующих собой фрагменты Оказаки, которые в репликативной вилке замещают последние при синтезе отстающей цепи, а за счет имеющихся некоторых отличий от геномной ДНК вносят желаемые изменения в последовательность реплицируемой ДНК. Так, этими авторами было показано, что они смогли произвести за одно трансформационное событие включение 12 олигонуклеотидов, обеспечивших 60 целевых мутаций, а для однонуклеотидных отличий во вводимой ДНК эффективность редактирования составила более 40%.

Детекция произведенного геномного редактирования. Для обнаружения специфичности произведенного редактирования ранее

предложено значительное количество методов, включая ПЦР, сопряженную с рестрикцией, плавление ампликонов, секвенирование, полно-геномное секвенирование и ряд других, каждый из которых имеет как свои достоинства, так и недостатки. Недавно сообщено о разработке для такого поиска нового варианта ПЦР – MSBSP-PCR (Mutation Sites Based Specific Primers [37]. Авторы отмечают, что их метод быстр, прост и дешев. Он заключается в проведении двухстадийной ПЦР, в первом раунде которой праймеры отжигаются на участках, фланкирующих место редактирования, а во втором - ПЦР продукты после первого цикла подвергают амплификации, используя новую пару праймеров, напоминая semi-nested или полувложенную ПЦР. При этом один из праймеров совпадает с таковым из первого раунда, а второй должен отжигаться непосредственно на редактируемом месте, что в случае произошедшего редактирования происходить не будет. Иной метод обнаружения действия двух парных Cas9 никак при геномном редактировании основан на амплификации с помощью ПЦР вырезаемого ими участка ДНК с образованием тупых концов после его интрамолекулярного / интермолекулярного лигирования с возникновением либо кольцевой матрицы либо конкатемеров [38]. Авторы назвали свой метод CARP – CRISPR- or Cas9/sgRNA-associated reverse PCR.

CRISPR/Cas геномное редактирование и проблема ГМО. Рассматривая методы геномного редактирования, в том числе на основе CRISPR/Cas технологий сельскохозяйственных организмов и в первую очередь растений, невозможно оставить без внимания проблему ГМО. Так, согласно определения Всемирной Организации Здравоохранения, «генетически модифицированные организмы (ГМО) — это организмы (т.е. растения, животные или микроорганизмы), чей генетический материал (ДНК) был изменен, причем такие изменения были бы невозможны в природе в результате размножения или естественной рекомбинации». Ключевым моментом здесь является дефиниция, что «...такие изменения были бы невозможны в природе...». В случае «бесследного» редактирования геномов растений (о котором говорилось выше) встраивания никакой чужеродной ДНК не происходит, а те

изменения генома, которые производятся вполне могли бы случайно произойти в самой Природе. Ранее мы уже упоминали о том, что созданные с помощью CRISPR/Cas нокаутной технологии новый сорт шампиньона двуспорового *Agaricus bisporus*, некоричневееющего на воздухе после сбора урожая, благодаря тому, что в нем оказался нарушенным один из шести имеющихся генов полифенолоксидазы, а также сорт кукурузы с нарушенным геном *waxy*, характеризующийся повышенным содержанием амилопектина, ГМО не является и на них не распространяется соответствующее регулирование [39]. В 2017 г. перечень таких отредактированных растений, не подлежащих контролю как за ГМО, дополнили рыжик *Camelina sativa*, продуцирующий масло с увеличенным содержанием омега-3, соя *Glycine max*, устойчивая к засухе и засолению, что достигнуто путем нарушения генов *Drb2a* и *Drb2b*, и однолетний злак щетинник зеленый *Setaria viridis*, характеризующийся задержкой цветения, вызванной нарушением гомолога гена *ID1* [40]. И эти решения были приняты в США. В Европе действуют гораздо более жесткие правила в отношении ГМО в целом. Однако можно сказать, что Европа разделилась – так в Швеции сочли отредактированные растения не за ГМО [41]. К тому же в январе 2018 г. после ходатайства, поданного Францией, Генеральный адвокат Европейского суда М. Bobek определил, что организмы, полученные с помощью новых технологий редактирования генов, не должны подпадать под правила ЕС по выращиванию и маркетингу генетически модифицированных продуктов питания [3]. Летом 2018 г. Европейский суд должен рассмотреть данный вопрос и вынести окончательное решение. Здесь надо также добавить, что в ЕС еще в 2001 г. было решено, что созданные с помощью химического или радиационного мутагенеза сорта культурных растений ГМО не являются, а нокаутные растения также можно считать полученными в результате мутагенеза, только направленного. Тем самым в начале 2018 г. в Европе сделан очередной шаг в сторону упрощенного допуска измененных с помощью современных технологий организмов (растений) в рацион питания.

Остается лишь выразить надежду, что вскоре придет понимание того, что и прочие

созданные с помощью генной инженерии растения не опаснее тех, что получены благодаря радиационному или химическому мутагенезу.

Заключение. Главным инструментом CRISPR/Cas геномного редактирования являются плазмидные векторы, несущие необходимый комплект генов для внесения направленных изменений в геномы различных организмов. Подавляющее большинство сконструированных разными исследователями таких плазмид хранятся в репозитории Addgene (<http://www.addgene.org>), где их можно приобрести по цене 65 долларов за штуку, подписав соответствующее Соглашение о передаче, использовании и нераспространении. На начало июня 2018 г. в данном репозитории имелось около 6 тысяч таких векторных молекул, подавляющее число которых нацелено на редактирование эукариотических организмов. В свою очередь среди таких плазмид около 70% рассчитаны на редактирование геномов млекопитающих, включая человека и менее 5% пригодны для растений. К сожалению имеющая на сайте поисковая система не позволяет ранжировать включение в этот репозиторий плазмид по годам, но можно не сомневаться, что конструирование все новых векторов для геномного редактирования на основе CRISPR/Cas технологий идет пока по нарастающей. Что будет происходить в дальнейшем – покажет время и нельзя исключать, что эту систему CRISPR/Cas редактирования, какой хорошей бы она ни была, в будущем не потеснит какая-либо другая еще более совершенная и удобная, поскольку можно считать, что эволюция методов геномного редактирования фактически продолжается, о чем говорилось нами ранее [42].

ЛИТЕРАТУРА

1. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science*. 2012. V.337(6096). P.816-821. doi: 10.1126/science.1225829
2. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science*. 2013. V.339(6121). P.819-823. doi: 10.1126/science.1231143

3. Editorial. A CRISPR definition of genetic modification // *Nature Plants*. 2018. V.4. P.233. doi: 10.1038/s41477-018-0158-1
4. Martynov A, Severinov K, Ispolatov I. Optimal number of spacers in CRISPR arrays // *PLoS Comput Biol*. 2017. 13(12):e1005891. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005891
5. Leon L.M., Mendoza S.D., Bondy-Denomy J. How bacteria control the CRISPR-Cas arsenal // *Curr Opin Microbiol*. 2018. V.42. P.87-95. doi: 10.1016/j.mib.2017.11.005
6. Баймиев Ан.Х., Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Матниязов Р.Т., Валеев А.Ш., Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Биоинформатические ресурсы для in silico поиска CRISPR локусов в геномах прокариот // *Биомика*. 2017. Т.9. С.229-244.
7. Wang K., Liang C. CRF: detection of CRISPR arrays using random forest // *PeerJ*. 2017. 5:e3219 doi: 10.7717/peerj.3219
8. Moller A.G., Liang C. MetaCRIST: reference-guided extraction of CRISPR spacers from unassembled metagenomes // *PeerJ*. 2017. 5:e3788. doi: 10.7717/peerj.3788
9. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Геращенко Г.А., Кулуев Б.Р., Рожнова Н.А., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Биоинформатические ресурсы для CRISPR/Cas редактирования геномов // *Биомика*. 2017. Т.9. С.203-228.
10. Nagy T., Kampmann M. CRISPulator: a discrete simulation tool for pooled genetic screens // *BMC Bioinformatics*. 2017. V.18(1). P.347. doi: 10.1186/s12859-017-1759-9
11. Xiong Y., Xie X., Wang Y., Ma W., Liang P., Songyang Z., Dai Z. pgRNAFinder: a web-based tool to design distance independent paired-gRNA. *Bioinformatics*. 2017. V.33. No. 22. P.3642-3644. doi: 10.1093/bioinformatics/btx472
12. Mendoza B., Trinh C.T. Enhanced guide-RNA design and targeting analysis for precise CRISPR genome editing of single and consortia of industrially relevant and non-model organisms. *Bioinformatics*. 2018. V.34. No1. P.16-23. doi: 10.1093/bioinformatics/btx564
13. Dhanjal J.K., Radhakrishnan N., Sundar D. CRISPCut: A novel tool for designing optimal sgRNAs for CRISPR/Cas9 based experiments in human cells. *Genomics*. 2018. pii: S0888-7543(18)30018-1. doi: 10.1016/j.ygeno.2018.03.011
14. Zhu H, Richmond E, Liang C. CRISPR-RT: a web application for designing CRISPR-C2c2 crRNA with improved target specificity // *Bioinformatics*. 2018. V.34(1). P.117-119. doi: 10.1093/bioinformatics/btx580
15. You Q., Zhong Z., Ren Q., Hassan F., Zhang Y., Zhang T. CRISPRMatch: An automatic calculation and

- visualization tool for high-throughput CRISPR genome-editing data analysis // *Int. J. Biol. Sci.* 2018. V.14(8). P.858-862. doi:10.7150/ijbs.24581
16. Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев А.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов растений // *Биомика*. 2017. Т.9. С.155-182.
17. Ryan D.E., Taussig D., Steinfeld I., Phadnis S.M., Lunstad B.D., Singh M., Vuong X., Okochi K.D., McCaffrey R., Olesiak M., Roy S., Yung C.W., Curry B., Sampson J.R., Bruhn L., Dellinger D.J. Improving CRISPR-Cas specificity with chemical modifications in single-guide RNAs // *Nucleic Acids Res.* 2018. V.46(2). P.792-803. doi: 10.1093/nar/gkx1199
18. Lapinaite A., Doudna J.A., Cate J.H.D. Programmable RNA recognition using a CRISPR-associated Argonaute // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V.115(13). P.3368-3373. doi: 10.1073/pnas.1717725115
19. Stratigopoulos G., De Rosa M.C., LeDuc C.A., Leibel R.L., Doege C.A. DMSO increases efficiency of genome editing at two non-coding loci // *PLoS One*. 2018. 13(6):e0198637. doi: 10.1371/journal.pone.0198637
20. LeBlanc C., Zhang F., Mendez J., Lozano Y., Chatpar K., Irish V.F., Jacob Y. Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress // *Plant J.* 2018. V.93(2). P.377-386. doi: 10.1111/tpj.13782
21. Jang D.E., Lee J.Y., Lee J.H., Koo O.J., Bae H.S., Jung M.H., Bae J.H., Hwang W.S., Chang Y.J., Lee Y.H., Lee H.W., Yeom S.C. Multiple sgRNAs with overlapping sequences enhance CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency // *Exp. Mol. Med.* 2018. V.50(4). P.16. doi: 10.1038/s12276-018-0037-x
22. Xiao Q., Min T., Ma S., Hu L., Chen H., Lu D. Intracellular generation of single-strand template increases the knock-in efficiency by combining CRISPR/Cas9 with AAV // *Mol. Genet. Genomics*. 2018. doi: 10.1007/s00438-018-1437-2
23. Andersson M., Turesson H., Olsson N., Fält A.S., Ohlsson P., Gonzalez M.N., Samuelsson M., Hofvander P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery // *Physiol. Plant.* 2018. doi: 10.1111/ppl.12731
24. Ferenczi A., Pyott D.E., Xipnitou A., Molnar A. Efficient targeted DNA editing and replacement in *Chlamydomonas reinhardtii* using Cpf1 ribonucleoproteins and single-stranded DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V.114(51). P.13567-13572. doi: 10.1073/pnas.1710597114
25. Liang Z., Chen K., Yan Y., Zhang Y., Gao C. Genotyping genome-edited mutations in plants using CRISPR ribonucleoprotein complexes // *Plant Biotechnol. J.* 2018. doi: 10.1111/pbi.12938
26. Liang Z., Chen K., Zhang Y., Liu J., Yin K., Qiu J.L., Gao C. Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 in vitro transcripts or ribonucleoproteins // *Nat. Protoc.* 2018. V.13(3). P.413-430. doi: 10.1038/nprot.2017.145
27. Endo A., Toki S. FnCpf1-mediated targeted mutagenesis in plants // *Methods Mol. Biol.* 2018. V.1795. P.223-239. doi: 10.1007/978-1-4939-7874-8_18
28. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage // *Nature*. 2016. V. 533. P. 420-424.
29. Nishida K., Arazoe T., Yachie N., Banno S., Kakimoto M., Tabata M., Mochizuki M., Miyabe A., Araki M., Hara K.Y., Shimatani Z., Kondo A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems // *Science*. 2016. V.353(6305). pii: aaf8729. doi: 10.1126/science.aaf8729
30. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., Liu D.R. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage // *Nature*. 2017. V.551(7681). P.464-471. doi: 10.1038/nature24644
31. Billon P., Bryant E.E., Joseph S.A., Nambiar T.S., Hayward S.B., Rothstein R., Ciccia A. CRISPR-mediated base editing enables efficient disruption of eukaryotic genes through induction of STOP codons // *Mol. Cell*. 2017. V.67(6). P.1068-1079.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.008
32. Kang B.C., Yun J.Y., Kim S.T., Shin Y., Ryu J., Choi M., Woo J.W., Kim J.S. Precision genome engineering through adenine base editing in plants // *Nat. Plants*. 2018. doi: 10.1038/s41477-018-0178-x
33. Kim J.S. Precision genome engineering through adenine and cytosine base editing // *Nat. Plants*. 2018. V.4(3). P.148-151. doi: 10.1038/s41477-018-0115-z
34. Shan Q., Voytas D.F. Editing plant genes one base at a time // *Nat. Plants*. 2018. doi: 10.1038/s41477-018-0177-y
35. Tian S., Jiang L., Cui X., Zhang J., Guo S., Li M., Zhang H., Ren Y., Gong G., Zong M., Liu F., Chen Q., Xu Y. Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing // *Plant Cell Rep.* 2018. doi: 10.1007/s00299-018-2299-0
36. Barbieri E.M., Muir P., Akhuetie-Oni B.O., Yellman C.M., Isaacs F.J. Precise editing at DNA replication forks enables multiplex genome engineering in Eukaryotes // *Cell*. 2017. V.171(6). P.1453-1467.e13. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.034
37. Guo J., Li K., Jin L., Xu R., Miao K., Yang F., Qi C., Zhang L., Botella J.R., Wang R., Miao Y. A simple

and cost-effective method for screening of CRISPR/Cas9-induced homozygous/biallelic mutants // *Plant Methods*. 2018. V.14:40. doi: 10.1186/s13007-018-0305-8

38. Zhang B., Wang Q., Xu X., Xia Q., Long F., Li W., Shui Y., Xia X., Wang J. Detection of target DNA with a novel Cas9/sgRNAs-associated reverse PCR (CARP) technique // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V.410(12). P.2889-2900. doi: 10.1007/s00216-018-0873-5

39. Баймиев Ан.Х., Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р. Князев А.В., Чемерис Д.А., Рожнова Н.А., Геращенко Г.А., Михайлова Е.В., Баймиев Ал.Х., Чемерис

А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов (растений) и общество // *Биомика*. 2017. Т.9. С.183-202.

40. Waltz E. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time // *Nat. Biotechnol.* 2018. V.36(1). P.6-7. doi: 10.1038/nbt0118-6b

41. Jansson S. Gene-edited plants on the plate - the "CRISPR cabbage story" // *Physiol. Plant.* 2018. doi: 10.1111/pp1.12754

42. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., Чемерис Д.А., Гумерова Г.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Эволюция методов редактирования геномов // *Биомика*. 2017. Т.9. С.245-270.



SOME RECENT IMPROVEMENTS IN GENOME EDITING TECHNIQUES

© A.V. Chemeris, N.A. Rozhnova, G.A. Gerashchenkov

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

In genomes of bacteria the repeating elements, called CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) which are a prototype of primitive immune system of prokaryotes, are known. These CRISPR loci allocate in two classes, 6 types and about 20 subtypes. Bioinformatics researches of CRISPR loci play very important role and are aimed at understanding of immune protection of bacteria, detection of CRISPR cassettes in genomes of various microorganisms and in metagenome data and also to design of guide RNA. The programs of guide RNA design which are recently created are considered briefly. The special attention is paid to development of efficiency and specificity problem of CRISPR/Cas genome editing. In 2018 more attention began to be paid to use of so-called DNA-free genome editing without embedding of alien DNA of vectors carriers in DNA of the edited organism (and plants in particular). It allows to classify such organisms as the non genetic modified with good reason. It is told about the new page of genome editing without formation of two-chained ruptures of DNA molecules on the basis of editing the single bases. So, "sewing together" catalytically of an inactive nuclease of Cas9 or nickase of Cas9 with deaminase, allows to make pointed single-nucleotide substitutions, for example C→T or G→A, providing as replacements of separate amino acids in the right places of protein molecules and causing violations of gene work that is shown in 2018 on plants. It is mentioned the unique method of editing eMAGE– eukaryotic Multiplex Automated Genome Engineering based on delivery in the sharing cell of one-strand fragments of DNA imitating Okazaki's fragments which replace these fragments at synthesis of the lagging strand in replicative fork. As result desirable changes to the sequence of replicable DNA are introducing. Authors haven't ignored also a problem of relationship of CRISPR/Cas of genomic editing and GMO. As a result it is hoped that in society the understanding that genomic editing plants isn't more dangerous than the traditional biotechnological and selection methods based on a radiation or chemical mutagenesis will be approved.

Key words: genome, genome editing, CRISPR/Cas systems, CRISPR/Cas technology, guide RNA, PCR, GMO.

УДК 581.143.6: 582.931.4

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-94-99

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ СИРЕНИ В МЕДЛЕННО РАСТУЩЕЙ КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

© О.А. Чурикова, А.А. Креницына

С целью поддержания живых коллекций растений необходимо разрабатывать методы и подходы, позволяющие увеличивать продолжительность беспересадочного культивирования. Получение медленно растущей коллекции растений в асептической культуре возможно с использованием низких положительных температур. В настоящей работе приведены данные, описывающие влияние пониженной положительной температуры на рост и развитие микропобегов семи различных сортов сирени в стерильной культуре в течение девяти месяцев. Реакция сирени на продолжительное воздействие низкой положительной температуры оказалась сортоспецифичной. У сортов ‘Великая Победа’, ‘П.П. Кончаловский’, ‘Виолетта’, ‘Лебедушка’ и ‘Обманщица’ происходило формирование раневого каллуса, наличие которого не наблюдали у микропобегов сортов ‘Сенсация’ и ‘Лунный свет’. У микропобегов только двух сортов ‘Виолетта’ и ‘Лунный свет’ не было отмечено ветвления, у остальных начинали развиваться пазушные побеги в самом нижнем (‘Обманщица’) или третьем от основания узлах (‘П.П. Кончаловский’, ‘Великая Победа’, ‘Сенсация’ и ‘Лебедушка’). У микропобегов всех изученных сортов продолжали закладываться новые узлы, однако вытягивания междоузлий не происходило. Практически у всех сортов было отмечено изменение окраски листовых пластинок и стеблей микропобегов. Очевидно, это обусловлено накоплением в них антоцианов в связи с защитой растений от воздействия стрессовых факторов, в том числе и низкой температуры. В результате анализа содержания общих антоцианов в микропобегах сирени было показано, что способность растений накапливать антоцианы при пониженной температуре, по-видимому, коррелирует с окраской венчика. У сорта с белой окраской венчика (‘Лебедушка’) содержание антоцианов в листьях практически не изменилось, тогда как у остальных, имеющих фиолетовую или лиловую окраску, за исключением сорта ‘Виолетта’, их уровень при пониженной температуре увеличился. У последнего наоборот, при изначально высоком их содержании наблюдалось снижение их количества в тканях листовых пластинок, что требует последующего более подробного изучения. Полученные результаты послужат основой для разработки и усовершенствования технологии выращивания сирени в медленно растущей культуре *in vitro*.

Ключевые слова: *Syringa vulgaris* L., медленно растущая культура *in vitro*, стрессовые факторы, антоцианы.

Введение. Для поддержания живых коллекций растений в стерильной культуре необходимо разрабатывать методы, которые позволяют длительно сохранять большое количество растений с высокой эффективностью и низкими затратами. Одним из путей решения данного вопроса является увеличение сроков беспереса-

дочного культивирования растений на питательной среде в условиях, замедляющих их рост и развитие, в частности, при пониженной положительной температуре [1].

Однако, такие условия культивирования являются стрессовыми для большинства видов растений. Низкие температуры оказывают

ЧУРИКОВА Ольга Альбертовна, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, e-mail: ochurikova@yandex.ru

КРИНИЦЫНА Анастасия Александровна, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, e-mail: ankrina@gmail.com

Характеристика сортов сирени обыкновенной

Сорт (происхождение сорта)	Цвет венчика	махровость	Время цветения
‘Великая Победа’	лиловый с голубизной	махровый	Средние сроки
‘П.П. Кончаловский’ (‘Victor Lemoine’ x ‘Jules Simon’) x ‘President Poincare’)	голубовато-лиловый	махровый	Средние сроки
‘Виолетта’	фиолетовый	простой	Средние сроки
‘Сенсация’ (спорт от ‘Hugo de Vries’, периклиальная химера)	пурпурно-красные с белой полоской	простой	Поздние сроки
‘Обманщица’	голубой-лиловый-розоватый	махровый	Средние сроки
‘Лебедушка’ (‘Mme Abel Chatenay’ x ‘Reaumur’)	белый с кремовым оттенком	простой	Средние сроки
‘Лунный свет’ (‘Mme Abel Chatenay’ x ‘Reaumur’)	белый с кремовым оттенком	махровый, полумахровый	Средние сроки

негативное влияние на протекание многих физиологических процессов и могут привести к сильным повреждениям или даже полной гибели растения. Защитной реакцией на снижение температуры может быть увеличение содержания общих антоцианов - веществ фенольной природы, которые образуются во всех тканях растения [2].

Для успешной оптимизации протокола культивирования при пониженных температурах необходимо учитывать не только размер, возраст и физиологическое состояние эксплантов, но и видовую и сортовую принадлежность культуры. В зависимости от вида продолжительность культивирования в условиях низкой положительной температуры может варьировать от 6 до 12 месяцев [3]. Основные исследования в настоящее время проводятся для видов растений, имеющих сельскохозяйственную ценность, например, плодово-ягодных культур, тогда как для декоративных растений таких исследований намного меньше. В частности, для сирени была показана возможность сохранения сортов при помощи создания искусственных семян [4], но работ, описывающих влияние низких положительных температур на растения в стерильной культуре, практически нет.

Материалы и методы исследования.

В качестве объекта использовали микропобеги сирени семи сортов, морфологически отличающихся друг от друга. Список сортов и их характеристики указаны в таблице 1.

Вышеуказанные сорта сирени были введены в культуру *in vitro* в период 2010-2015 гг. и прошли не менее 15 пересадок на питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением 20 г/л сахарозы и 1,5 мг/л 2-иР (N⁶-(2-изопентил) аденин). Культивирование растений в стерильных условиях осуществляли при температуре 22°±2°С и стандартном фотопериоде (16 часов день/8 часов ночь). Подробнее состав питательных сред и условия культивирования описаны ранее [5]. Для оценки возможности культивирования сирени в условиях пониженной температуры микропобеги, состоящие из 3 узлов, помещали в пробирки на свежую питательную среду того же состава, инкубировали в течение 7 дней в стандартных условиях, после чего пробирки с растениями перемещали в климатическую камеру. Дальнейшее выращивание микропобегов проводили при постоянной температуре +10°С при стандартном фотопериоде.

Дважды, через 5 и 9 месяцев после начала культивирования, у микропобегов подсчитывали

вали количество узлов, отмечали наличие/отсутствие каллуса на базальной части, оценивали внешний вид: окраску листьев, количество отмерших листьев, развитие пазушных побегов, наличие придаточных корней.

Содержание общих антоцианов в листовых пластинках микропобегов сирени (в условиях пониженной температуры и в стандартных условиях) определяли спектрофотометрическим методом путем измерения оптической плотности кислотного извлечения при длине волны 520 нм с использованием спектрофотометра LEKI SS1207UV (Радиян, Россия). Экстракцию суммарных антоцианов проводили из целых листовых пластинок (размер около 0,5 см²) кислотным этанолом (1% раствор HCl в 75% этиловом спирте) при +4°C в темноте в течение 24 часов. Расчет количества суммарных антоцианов проводили согласно Ribereau-Gayon (1972) (цит. по [6]).

Для каждого сорта в условия пониженной температуры помещали не менее 10 растений в двух независимых повторностях. Для всех значений определяли среднее и стандартное отклонение с использованием пакета программ MS Excell.

Результаты и обсуждение. Реакция сирени на продолжительное воздействие низких положительных температур оказалась сортоспецифичной. Через 5 месяцев у всех микропобегов сирени сорта ‘П.П Кончаловский’ на базальной части формировался раневой каллус. У 40% микропобегов в пазухах листьев третьего снизу узла начинали развиваться побеги. В среднем за этот период сформировалось 1-3 новых узла.

У всех микропобегов сирени сорта ‘Великая Победа’ на базальной части также формировался раневой каллус, однако его диаметр был в 2 раза меньше, чем у микропобегов сорта ‘П.П. Кончаловский’ (таблица 2). У единичных растений-регенерантов начинали развиваться пазушные почки третьего от верхушки узла. В среднем за этот период сформировалось два новых узла, причем рост междоузлий происходил равномерно.

У всех микропобегов сирени сорта ‘Виолетта’ на базальной части формировался небольшой раневой каллус (диаметр 2,4±1,16 мм), у некоторых растений наблюдалось отмирание листовых пластинок. За указанный период у большей части растений происходило развитие 2-3 новых узлов, которые оставались сближенными. У некоторых растений развивалось 7 новых узлов, индукции развития пазушных почек ни в одном узле не происходило.

Ни у одного из заложенных в условиях пониженной температуры микропобегов сирени сорта ‘Сенсация’ формирования раневого каллуса на базальной части не наблюдалось. За 5 месяцев развивалось, в среднем, 3 новых узла, которые оставались сильно сближенными. У единичных растений трогались в рост пазушные почки третьего снизу узла.

Побеги и листья всех выше описанных сортов приобретали красно-фиолетовую окраску.

У микропобегов сирени сорта ‘Лунный свет’ формирования раневого каллуса на базальной части микропобега также, как и у сорта ‘Сенсация’, не происходило, их рост продолжался, количество узлов увеличивалось в 2 раза, часть побега, формировавшаяся в условиях пониженной температуры, сильно вытягивалась. Развития пазушных почек ни в одном узле не наблюдалось.

У микропобегов сирени сорта ‘Лебедушка’ на раневой поверхности формировался раневой каллус, сходный с таковым у сорта ‘Великая Победа’ (Таблица 2). У половины микропобегов начинали активно развиваться почки второго и третьего снизу узлов. У развившихся пазушных побегов в пазухах их листьев, в свою очередь, трогались в рост побеги второго порядка. У этого сорта также, как и у сорта ‘Лунный свет’ в 2,5 раза увеличилось число заложившихся и развивающихся, впоследствии, в условиях низкой положительной температуры узлов.

У микропобегов сирени сорта ‘Обманщица’ на раневой поверхности базальной части формировался небольшой раневой каллус. За 5 месяцев культивирования при пониженной температуре происходило увеличение числа уз-

Характеристика микропобегов различных сортов сирени после 9 месяцев культивирования при +10°C.

Сорт	Раневой каллус (диаметр мм)	Число узлов	Развитие пазушных побегов	Общие антоцианы/100 мг ткани при +22°C	Общие антоцианы/100 мг ткани при +10°C
‘Великая Победа’	6,67±2,21	4,57±0,98	есть	0,025±0,012	0,252±0,016
‘П.П. Кончаловский’	15,5±2,78	5±1,15	есть	0,089±0,009	0,177±0,018
‘Виолетта’	2,4±1,16	5,7±1,77	нет	0,319±0,047	0,145±0,032
‘Сенсация’	0	6±1,41	есть	0,024±0,006	0,348±0,198
‘Лебедушка’	6,33±2,06	6,86±1,77	есть	0,144±0,094	0,081±0,037
‘Обманщица’	5,22±1,19	6,9±2,5	есть	0,036±0,002	0,074±0,034
‘Лунный свет’	0	6,56±1,13	нет	0,064±0,036	0

лов, в среднем, в 2 раза. При этом у отдельных побегов количество узлов увеличивалось в 4 раза, однако вытягивания междоузлий не происходило. У 80% растений обе почки нижнего узла развивались в побеги.

Побеги и листья этих трех сортов практически не меняли окраску. У сорта ‘Обманщица’ нижняя поверхность некоторых листьев становилась красновато-фиолетовой, у двух других таких изменений окраски не наблюдали.

За следующие 4 месяца изменений с микропобегами сортов ‘П.П. Кончаловский’ и ‘Великая Победа’ не происходило, они оставались темно-красно-фиолетовыми также, как и сорта ‘Виолетта’ и ‘Сенсация’, новых узлов не закладывалось. У двух микропобегов сорта ‘Виолетта’ было отмечено формирование придаточных корней, при этом дальнейшего роста побега не происходило. У остальных сортов (‘Сенсация’, ‘Лунный свет’ и ‘Обманщица’) наблюдалась гибель единичных растений-регенерантов, а у сорта ‘Лебедушка’ у большей части микропобегов произошло отмирание практически всех листьев и началось отмирание базальной части побега.

У микропобегов сорта ‘Лунный свет’ при длительном культивировании при пониженной температуре (+10°C) через 6 месяцев в акропетальном направлении начинали отмирать листья

и стебель. У всех остальных сортов в условиях пониженной температуры закладывались узлы, которые оставались сближенными. У большинства сортов (кроме сорта ‘Сенсация’) происходило формирование раневого каллуса на базальной части микропобегов. Практически у всех сортов (кроме сорта ‘Виолетта’), начинали развиваться пазушные почки самого нижнего (‘Обманщица’) или третьего от основания узла. Ветвления микропобегов при культивировании их в стандартных условиях и при температуре +15°C отмечено не было [5, 7].

Частичное или полное изменение окраски листовых пластинок растений-регенерантов связано с изменением содержания общих антоцианов. Накопление антоцианов связано с защитой растений от воздействия стрессовых факторов, в том числе и низкой температуры [2]. Кроме того, состав и уровень содержания антоцианов в листьях и стеблях коррелирует с окраской венчика цветка: в венчиках фиолетово-голубой окраски детектируется, в том числе и цианидин (основной компонент антоцианового комплекса), наличие которого было показано, в частности, в листьях сирени [8]. В стерильной культуре в листьях всех изученных сортов, кроме сорта ‘Виолетта’, в стандартных условиях (22°±2°C) количество общих антоцианов находилось практически на одном уровне и составляло

0,025-0,144 мг на 100 мг ткани. Увеличение количества общих антоцианов в ответ на понижение температуры до +10°C наблюдалось не у всех сортов. У сорта 'Лебедушка' содержание антоцианов практически не изменилось, а у сорта 'Виолетта', наоборот, при изначально высоком их содержании наблюдали снижение их количества в тканях листовых пластинок (таблица 2), что требует последующего более подробного анализа. Культивирование сирени при температуре +15°C при использовании питательной среды сходного состава не приводило к изменению цвета побегов и листьев [7].

Таким образом, как показали результаты проведенных исследований, успех длительного культивирования сирени при пониженной температуре зависит, прежде всего, от генотипа. Продолжительность культивирования сирени при +10 °C в течение 5 месяцев практически не оказывает отрицательного влияния на микропобеги данной культуры. Тогда как более продолжительное культивирование при такой температуре может приводить к гибели растений сортов сирени, в листьях которых не происходит увеличения количества общих антоцианов. Способность растений накапливать антоцианы в листовых пластинках и побегах при пониженной температуре, по-видимому, коррелирует с окраской венчика. У сортов сирени с лилово-голубой ('Великая Победа', 'П.П. Кончаловский') или пурпурной ('Сенсация') окраской венчика цветка при культивировании *in vitro* в условиях пониженной температуры содержание общих антоцианов в листьях увеличивается от 1,5 до 10 раз.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029 (направление "Растения")).

ЛИТЕРАТУРА

1. Решетников В. Н., Спиридович Е. В., Носов А. М. Биотехнология растений и перспективы ее развития // Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46, № 1. С. 3–18.
2. Cheynier V., Comte G., Davis K.M., Lattanzio V., Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology // Plant Physiol. Biochem., 2013. Vol. 72. P. 1-20.
3. Renau-Morata B., Arrillaga I., Segura J. In vitro storage of cedar shoot cultures under minimal growth conditions // Cell Biology and morphogenesis. 2006. Vol. 25. P. 636-642
4. Refouvelet E., Le Nours S., Tallon C., Daguin F. A new method for in vitro propagation of lilac (*Syringa vulgaris* L.): Regrowth and storage conditions for axillary bud encapsulation in alginate beads, development of a preacclimatisation stage // Sci. Hortic. 1998. Vol. 74. P. 233–241
5. Молканова О. И., Чурикова О. А., Коновалова Л. Н., Окунева И. Б. Клональное микроразмножение интродуцированных сортов *Syringa vulgaris* L. // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2002. № 4. С. 8–14.
6. Lapornik B., Prosek M., Wondra A.G. Comparison of extracts prepared from plant by products using different solvents and extraction time. // Journal of Food Engineering. 2005. Vol. 71. P. 214–222
7. Gabryszewska E. Effect of various levels of sucrose, nitrogen salts and temperature on the growth and development of *Syringa vulgaris* L. shoots in vitro // Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 2011. Vol. 19, №2. P. 133-148
8. Price J. R., Sturgess V. C. A survey of anthocyanins. VI // Biochem J. 1938. Vol. 32, № 9. P. 1658–1660.

SOME SPECIAL FEATURES OF LILAC DEVELOPMENT IN SLOW GROWTH CULTURE *IN VITRO*

© О.А. Churikova, А.А. Krinitsina

Lomonosov Moscow State University,
1, Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russian Federation

The elaboration of methods and approaches which allow to increase the continuance of long-term cultivation is necessary for alive plant collections maintaining. Lilac cultivation in slow growth aseptic culture is possible at low positive temperatures. Data on low positive temperature influence on growth and development of microshoots from 7 different lilac cultivars in sterile culture during 9 months are given. The reaction to low positive temperature prolonged influence turned to be genotype-specific. In microshoots of 'Velikaya Pobeda', 'P.P. Konchalovsky', 'Violetta', 'Lebyodushka' and 'Obmanschitsa' cultivars wound callus formed contrary to 'Sensation' and 'Lunnii svet' cultivars. Only in microshoots of 'Violetta' and 'Lunnii svet' branching wasn't noticed. In other cultivars axillar shoots in very low ('Obmanschitsa') or third node from the base ('P.P. Konchalovsky', 'Velikaya Pobeda', 'Sensation' and 'Lebyodushka') developed. In microshoots of all studied cultivars new nodes developed, but internodes didn't elongate. Practically in all cultivars the changing of color of microshoots leaves and stems was noticed. Obviously it is due to presence of anthocyanins there. Accumulation of anthocyanins is connected with the defense of plants under stress factors, including low temperature. Analysis of total anthocyanins content in lilac microshoots showed that the ability of plants to accumulate anthocyanins in shoots in low temperature, apparently, correlates with flowers color. Thus in white-coloured 'Lebyodushka' the content of anthocyanins practically didn't change, while in other cultivars, with violet-coloured flowers, except for 'Violetta', their amount in low temperature increased. In 'Violetta' in contrary their amount in leaves in low temperature reduced. So this fact requires subsequent more detailed study. Attained results are the basis for elaboration and improvement of technology of slow growth lilac culture *in vitro*.

Key words: *Syringa vulgaris* L., slow growth culture in vitro, stress factors, anthocyanins.

УДК 582.29:581.128:58.035.4

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-100-104

**ИЗМЕНЕНИЕ ДЫХАНИЯ И СООТНОШЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ
ПРИ АДАПТАЦИИ ЛИШАЙНИКОВ К ДЕЙСТВИЮ УФ-В РАДИАЦИИ**

© М.А. Шелякин, И.Г. Захожий, Т.К. Головко

Исследовали влияние УФ-В радиации на дыхание и соотношение дыхательных путей в талломах двух видов лишайников *Cladonia stellaris* и *Peltigera aphosa*. Талломы экспонировали 2 ч к УФ-В интенсивностью 2 Вт/м² (доза 14.4 кДж/м²) ежедневно в течение 10 суток. Под влиянием УФ-В в талломах повышался уровень липопероксидации, снижалась активность цитохромного дыхания (ЦП) и возрастала активность энергодиссипирующего альтернативного дыхательного пути (АП). На десятые сутки эксперимента доля АП в общем дыхании достигала 70%. Эффекты УФ-В на дыхание носили обратимый характер. Экспозиция талломов к УФ-В радиации не оказала деструктивного влияния на фотосинтетический аппарат фотобионта. Сделан вывод, что изменения соотношения дыхательных путей в лишайниках под действием УФ-В связаны с ответной реакцией микобионта. Активация АП носит адаптивный характер и направлена на защиту талломов от окислительного стресса.

Ключевые слова: лишайники, УФ-В облучение, дыхание, альтернативный путь дыхания, фотобионт, микобионт, адаптация.

Введение. Жизнь на Земле поддерживается непрерывным потоком солнечной энергии. Биосфера получает солнечную радиацию с λ от 290 нм до 10⁵ нм. Длинноволновая область включает инфракрасную (750–4000 нм) и тепловую (4000–10⁵ нм) радиацию. Примерно 45% приходится на область 400–700 нм (ФАР), которую растения могут использовать в фотосинтезе благодаря фотосинтетическим пигментам. Коротковолновая область (280–390 нм) относится к ультрафиолетовому излучению (УФ-радиация), его доля составляет 2%. Основная часть достигающего поверхности Земли УФ излучения приходится на УФ-А радиацию (320–398 нм). Хотя высокоэнергетические УФ-В фотоны (280–320 нм) попадают на Землю в малом количестве, они потенциально опасны для биоты, так как способны вызвать окислительный стресс и индуцировать

деструктивные изменения ДНК и других биологически важных макромолекул [1]. Рецептором УФ-В служат недавно обнаруженные UVR8 белки [2].

Лишайники относят к устойчивым к действию УФ-радиации фототрофным организмам. Показано, что фотобионт лишайников полностью восстанавливал свою функциональную активность через несколько часов после длительного воздействия УФ-В и даже УФ-С ($\lambda < 290$ нм) радиации [3,4]. Считается, что в создании условий для функционирования фотобионта большую роль играет гетеротрофный микобионт [5]. Однако механизмы этого явления до конца не поняты. Мы полагаем, что адаптивные реакции лишайников на действие УФ-В радиации могут проявляться на уровне микобионта через изменения активности дыхания и соотно-

ШЕЛЯКИН Михаил Анатольевич – к.б.н., Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, e-mail: shelyakin@ib.komisc.ru

ЗАХОЖИЙ Илья Григорьевич – к.б.н., Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, e-mail: zakhozhiy@ib.komisc.ru

ГОЛОВКО Тамара Константиновна – д.б.н., Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, e-mail: golovko@ib.komisc.ru

шения дыхательных путей в электрон-транспортной цепи (мЭТЦ) митохондрий путем вовлечения энергетически малоэффективного альтернативного пути дыхания. В исследованиях на высших растениях [6], некоторых водорослях [7] и грибах [8] показано, что функционирование альтернативной оксидазы (АОХ) не связано с реализацией основной функции клеточного дыхания – образованием энергии, но вносит существенный вклад в поддержание метаболизма клеток в стрессовых условиях. Информация о соотношении дыхательных путей и возможной роли вовлечения энергетически малоэффективного АП в лишайниках практически отсутствует.

Целью работы было исследовать реакцию дыхания и дыхательных путей в талломах лишайников на воздействие УФ-В радиации.

Материал и методы. Исследования выполнены на двух видах лишайников *Cladonia stellaris* (Opiz) Pouzar & Vezda и *Peltigera aphthosa* (L.) Willd.. *C. stellaris* – кустистый лишайник обитает в борах, преимущественно на открытых и сухих участках. Фотобионтом данного лишайника является зеленая водоросль рода *Trebouxia*. *P. aphthosa* – листоватый лишайник, обитает в затененных местах с высокой влажностью. *P. aphthosa* является трехкомпонентным лишайником, содержит зеленую водоросль р. *Coccomyxa* и цианобактерии р. *Nostoc*.

Лишайники собирали в конце мая и адаптировали талломы в течение 3 суток при температуре около 25 °С и ФАР 120 мкмоль квантов/м²с (фотопериод 16/8 ч). На протяжении всего опыта талломы поддерживали в гидратированном состоянии, используя периодическое капельное орошение. Часть талломов каждого вида ежедневно экспонировали под УФ-лампами ЛЭР-40 М в течение 2 ч на протяжении 10 суток. Интенсивность УФ-В излучения составляла 2 Вт/м². За 2 ч лишайники получали дозу УФ-В 14,4 кДж/м², близкую к количеству УФ-В радиации, поступающей за день на открытый участок в подзоне средней тайги.

Интенсивность дыхания измеряли по поглощению O₂ полярографически на системе

Oxytherm (Hansatech, Англия) при 20 °С. Активность основного цитохромного (ЦП) и альтернативного пути (АП) оценивали с применением специфических ингибиторов – KCN и бензгидроксамовой кислоты (БГК) соответственно.

Для оценки уровня окислительного стресса измеряли интенсивность липопероксидации по накоплению в талломах продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-ПП) [9].

Состояние фотобионта характеризовали по величине максимального (F_v/F_m) и реального (Ф_{ФСП}) квантового выхода фотохимической реакции в фотосистеме II. Измерения показателей проводили на флуориметре PAM-2000 (Walz, Германия).

Функциональные показатели лишайников определяли на 3 и 10 сутки сразу после экспозиции к УФ-В, а также спустя неделю после завершения воздействия. Суммарная доза УФ-В радиации за весь период составила 144 кДж/м². Контролем служили образцы талломов, не подвергшиеся воздействию УФ-В радиации.

Все измерения проводились в 3-20 кратной биологической повторности. В таблицах представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Расчеты проводились с использованием программного обеспечения Statistica 10.

Результаты и их обсуждение. Обработка талломов УФ-В радиацией оказала влияние на общий метаболизм и биоэнергетику лишайников. Это проявлялось в изменении интенсивности общего дыхания, цитохромного и альтернативного дыхательного пути (табл. 1). Дыхание лишайника *P. aphthosa*, обитающего в затененных и влажных условиях, изменялось сильнее, чем дыхание *C. stellaris*, произрастающего на почве в сквозистых сосняках лишайниковых. На третьи сутки облучения дыхательная активность опытных талломов *P. aphthosa* была в 1.7 раза ниже по сравнению с контрольными. Через 10 суток воздействия УФ-В дыхание опытных талломов не отличалось от уровня контроля, а спустя семь суток после окончания воздействия даже несколько снижалась. У лишайника *C. stellaris* значимых изменений в скорости поглощения O₂ под влиянием УФ-В не наблюдалось.

Т а б л и ц а 1

Влияние УФ-В облучения лишайников на интенсивность общего (Добщ.),
цитохромного (ЦП) и альтернативного дыхания (АП) талломов,
нмоль O₂/(г сухой массы мин)

Вид	Суммарная доза, кДж/м ²	Добщ.	ЦП	АП
<i>Cladonia stellaris</i>	0	463±24	312±16	101±15
	43	573±44	309±40	151±6
	144	484±29	144±35	294±18
	144*	445±32	212±45	133±23
<i>Peltigera aphthosa</i>	0	1019±92	607±81	220±16
	43	634±41	379±35	142±12
	144	949±76	404±61	404±50
	144*	724±12	410±20	189±33

Примечание: Представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки интенсивностей общего дыхания, цитохромного и альтернативного дыхательных путей под действием разных доз УФ-В облучения; 0 – дыхание контрольной группы (без воздействия УФ); 144* – дыхание образцов через семь дней после десятидневного воздействия УФ-В (в каждом варианте n= 4 – 9).

Реакция основного ЦП дыхания и энергетически малоэффективного АП на воздействие УФ-В радиации у обоих видов лишайников была сходной. У талломов контрольной группы на протяжении всего эксперимента в дыхании превалировал основной энергетически эффективный ЦП. Соотношение ЦП/АП составляло около 3, вклад ЦП в общее дыхание был 60 – 70%, доля АП не превышала 20%. После 3 суток облучения у опытных талломов *C. stellaris* отмечали увеличение активности АП дыхания в среднем в 1.5 раза относительно контроля. У талломов *P. aphthosa* отмечали снижение в 1.5 раза активности основного ЦП дыхания, тогда как интенсивность АП практически не изменялась. На 10 сутки облучения, когда суммарная доза полученной талломами лишайников в опыте УФ-В радиации достигла 144 кДж и была в 10 раз выше среднесуточной, у обоих видов наблюдали резкое смещение в соотношении дыхательных путей в пользу энергетически малоэффективного АП. Соотношение ЦП/АП было ниже 1, а доля АП в общем дыхании достигала 70%. Эффект УФ-В облучения на дыхательную систему лишайников зависел от дозы и был обратимым. Через 7 дней после окончания облуче-

ния у опытных образцов обоих видов лишайников отмечали восстановление соотношения и интенсивностей ЦП и АП до значений, выявленных для образцов в контроле.

По нашему мнению, вовлечение энергетически малоэффективного АП под действием УФ-В радиации может быть обусловлено необходимостью защиты клеток от избытка активных форм кислорода в условиях окислительного стресса. В пользу такого предположения свидетельствуют результаты определения уровня перекисного окисления липидов. После воздействия УФ-В радиацией уровень липопероксидации в опытных талломах обоих видов лишайников был почти в 2 раза выше по сравнению с контролем (табл. 2). Спустя неделю после прекращения воздействия УФ-В интенсивность липопероксидации в талломах лишайников снижалась, что совпадало со снижением вовлечения АП в дыхание лишайников. Поскольку основная масса таллома (более 90%) у всех видов лишайников приходится на грибной компонент [5], можно с уверенностью отнести изменения в соотношении дыхательных путей в талломах лишайников под действием УФ-В на счет микобионта.

Т а б л и ц а 2

Содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП, нмоль/г сухой массы) в талломах лишайников

Суммарная доза, кДж/м ²	<i>Peltigera apthosa</i>	<i>Cladonia stellaris</i>
0	194±20	98±20
43	146±22	102±20
144	348±54	162±12
144*	261±20	119±30

Примечание. Представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки показателей интенсивности перекисного окисления липидов (ТБК-РП) в талломах лишайников при разных дозах воздействия УФ-В радиацией (в каждом варианте n= 3). Остальные обозначения, как в табл. 1.

Помимо этого, мы отметили изменения в окраске поверхности талломов лишайников после облучения УФ. Как правило, такие изменения связаны с накоплением в верхнем коровом слое лишайника вторичных метаболитов, синтезируемых микобионтом. Образование специфических УФ протекторных лишайниковых веществ – один из наиболее исследованных механизмов защиты лишайников от действия УФ-радиации [10]. Большая часть лишайниковых веществ синтезируются по поликетидному пути (ацетил-полималоновому), а также через мевалоновую и шикимовую кислоты [11]. Биосинтезы тесно связаны с дыханием, поставляющим предшественники, восстановитель и энергию. Вовлечение АП транспорта электронов в мЭТЦ предотвращает перевосстановление пула убихинона и избыточное образование АФК, способствует снятию дыхательного контроля в клетках микобионта.

Судя по величинам показателей Fv/Fm и ФФСЦ, экспозиция талломов к УФ-В радиации не оказала деструктивного влияния на фотосинтетический аппарат фотобионта исследованных видов лишайников (табл. 3). Полученные результаты подтверждают данные литературы о высокой устойчивости и защищенности

Т а б л и ц а 3

Величина максимального (Fv/Fm) и реального (ФФСЦ) квантового выхода фотосистемы II фотобионта лишайников

Вид	Суммарная доза, кДж/м ²	Fv/Fm, отн. ед.	ФФСЦ, отн. ед.
<i>Cladonia stellaris</i>	0	0,73±0,01	0,52±0,01
	43	0,69±0,02	0,49±0,03
	144	0,67±0,02	0,46±0,02
	144*	0,73±0,01	0,50±0,02
<i>Peltigera apthosa</i>	0	0,74±0,01	0,43±0,01
	43	0,70±0,02	0,38±0,03
	144	0,68±0,01	0,40±0,02
	144*	0,73±0,01	0,45±0,03

Примечание. Представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки показателей максимального и реального квантового выхода фотобионтов лишайников при разных вариантах воздействия УФ-В радиацией (в каждом варианте n= 8 – 20). Остальные обозначения как в табл. 1.

фотобионтов лишайников к действию УФ-радиации [3, 4].

Итак, нами установлено, что дыхание микобионта играет важную роль в адаптации и устойчивости лишайников к действию повышенных доз УФ-В радиации. УФ-В облучение усиливало вовлечение энергетически малоэффективного АП в общее дыхание лишайников до 70%. При этом происходило снижение активности основного энергетически эффективного ЦП дыхания. Соотношение интенсивностей ЦП/АП снижалось в среднем в 2-4 раза относительно контроля.

Работа выполнена в рамках темы НИ-ОКТР «Физиология и стресс-устойчивость фотосинтеза растений и пойкилогидрических фотоавтотрофов в условиях Севера» (№ АААА-А17-117033010038-7), при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00346 мол_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Frohnmeyer H., Staiger D. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection // *Plant Physiology*. 2003. V. 133. P. 1420 – 1428.
2. Rizzini L., Favory J.J., Cloix C., Faggionato D., O'Hara A., Kaiserly E., Baumeister R., Schafer E., Nagy F., Jenkins G.I., Ulm R. Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein // *Science*. 2011. V. 332. P. 103–106.
3. Vera, J., Rettberg P., Ott S. Life at the limits: capacities of isolated and cultured lichen symbionts to resist extreme environmental stresses // *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. 2008. V. 38. № 5. P. 457 – 468.
4. Sánchez F. J., Meeßen J., Ruiz M. D. C., Sancho L. G., Ott S., Vilchez C., Horneck G., Sadowsky A., Torre R. UV-C tolerance of symbiotic *trebouxia* sp. In the space-tested lichen species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances // *International Journal of Astrobiology*. 2014. V. 13. № 1. P. 1 – 18.
5. *Lichen Biology* / ed. T. H. III. Nash. – Cambridge : Cambridge University Press, 2008. – 486 p.
6. Van Dongen J.T, Gupta K.J, Ramírez-Aguilar S.J, Araújo W.L, Nunes-Nesi A., Fernie A.R. Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways // *J. Plant Physiol.* 2011. V. 168. P. 1434 – 1443.
7. Eriksen N. T., Lewitus A. J. Cyanide-resistant respiration in diverse marine phytoplankton. Evidence for the widespread occurrence of the alternative oxidase // *Aquatic Microbial Ecology*. 1999. V. 17. № 2. P. 145 – 152.
8. Joseph-Horne T., Hollomon D. W., Wood P. M. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2001. V. 1504. № 2 – 3. P. 179 – 195.
9. Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1968. V. 125. № 1. P. 189 – 198.
10. Solhaug K. A., Gauslaa Y., Nybakken L., Bilger W. UV-induction of sun-screening pigments in lichens // *The New Phytologist*. 2003. V. 158. № 1. P. 91 – 100.
11. Elix J. A., Stocker-Wörgötter *Biochemistry and secondary metabolites* // *Lichen Biology* / ed. T. H. III. Nash. – Cambridge : Cambridge University Press, 2008. P. 104 – 133.



**CHANGES OF TOTAL RESPIRATION AND RESPIRATORY PATHWAYS RATIO
IN LICHENS ADAPTATION TO UV-B RADIATION**

© M.A. Shelyakin, I.G. Zakhozhiy, T.K. Golovko

Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences,
28, ulitsa Kommunisticheskaya, 167982, Syktyvkar, Russian Federation

The UV-B radiation effects on the total respiration and respiratory pathways in *Cladonia stellaris* and *Peltigera apthosa* lichens were studied. The thalli were exposed for 2 h to UV-B (intensity 2 W/m², dose 14.4 kJ/m²) daily for 10 days. The increase of the lipid peroxidation level and the energy-dissipating alternative respiratory pathway activity by 1.5-2 times were observed. Effects of UV-B radiation on the lichen respiration were reversible. It was concluded that the respiration pathway ratio changes in lichens were associated with the response of mycobiont and directed on the protection from oxidative stress.

Key words: lichens, UV-B radiation, respiration, alternative respiratory pathway, photobiont, mycobiont, adaptation.

УДК: 58.035.4; 58.084; 58.02.

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-105-109

**ЗАВИСИМОСТЬ МОРФОГЕНЕЗА *STEVIA REBAUDIANA IN VITRO*
ОТ ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ**

© А.А. Шульгина, Е.А. Калашникова, И.Г. Тараканов

Многие из вторичных метаболитов высших растений являются ценными веществами, и потому возрастает интерес к исследованию их метаболизма. Объектом нашего исследования является южнопарагвайское растение *Stevia rebaudiana* Bertoni (*Asteraceae*), которое содержит уникальные соединения – дитерпеновые стевиол-гликозиды, обладающие сладким вкусом. Род Стевия включает в себя около 200 видов, но только в одном виде обнаружены стевиольные гликозиды. Они присутствуют во всех частях растения, кроме корней, но большее их содержание обнаружено в листьях (6–15 % на сухую массу). Мажорным и наиболее ценным соединением из них является стевиозид, который в чистом виде представляет собой белый кристаллический гигроскопичный порошок без запаха с сильным сладким вкусом, примерно в 300 раз слаще сахарозы, при этом не повышают уровень сахара в крови. Он чрезвычайно перспективен в качестве сахарозаменителей для людей, страдающих от нарушений углеводного обмена, и особенно, для больных сахарным диабетом. В настоящее время стевиозид широко используется в качестве высокоэффективного низкокалорийного подсластителя и заменителя сахара в Японии, Китае и Южной Корее. Благодаря перспективности целевого соединения, любое исследование закономерностей морфогенеза культуры стевии, способного теоретически увеличить накопление стевиозидов, становится практически значимым для более полного использования потенциала этого растения. Биосинтез вторичных метаболитов в растениях напрямую коррелирует с интенсивностью роста, и потому наше особое внимание было направлено на морфогенетические изменения стевии при культивировании *in vitro* в различных условиях. На процессы морфогенеза существенное влияние оказывает состав питательной среды. Изучено влияние различных гормонов и веществ, обладающих гормональной активностью. Важным физическим фактором воздействия является свет, который выполняет у растений не только энергетические функции, но также обладает фиторегуляторной активностью. В данной работе изучали влияние инновационных облучателей на основе сверхярких светоиспускающих диодов различных длин волн на морфометрические и биохимические показатели растений *Stevia rebaudiana* Bertoni, выращиваемые в условиях *in vitro*. Установлена положительная корреляция между изучаемыми факторами гормональной и физической природы на клональное микроразмножение растения *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Ключевые слова: *Stevia rebaudiana*, культура *in vitro*, стевиозид, спектральный состав света, светоиспускающие диоды (СД).

В последнее время всё больше возрастает интерес к вторичным метаболитам высших растений. Их изучение имеет практическую значимость, т.к. многие из них являются ценными веществами. Примером может служить дитерпеновый

стевиол-гликозид (13-гидрокси-энт-каур-16-ен-19-овая кислота), называемый стевиозидом, содержащийся в листьях южнопарагвайского растения *Stevia rebaudiana* Bertoni (*Asteraceae*) [1]. Мажорным и наиболее ценным соединением из

ШУЛЬГИНА Алла Андреевна, Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, e-mail: alja.shulgina@yandex.ru

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

ТАРАКАНОВ Иван Германович – д.б.н., Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, e-mail: plantphys@timacad.ru

комплекса дитерпеновых гликозидов (ДГ) является стевиозид, который в чистом виде – белый кристаллический порошок без запаха с сильным сладким вкусом (примерно в 300 раз слаще сахара), устойчив к высокой температуре [2]. ДГ не приводят к повышению уровня сахара в крови даже в концентрации, в 10-15 раз превышающей ее среднесуточное потребление, что делает их чрезвычайно перспективными в качестве подсластителей и сахарозаменителей для людей, страдающих от нарушений углеводного обмена и, особенно, для больных сахарным диабетом. В настоящее время стевиозид широко используется в качестве низкокалорийного заменителя сахара и подсластителя в Японии, Китае и Южной Корее. Токсикологическими исследованиями была подтверждена его безопасность [3].

Знание закономерностей морфогенеза этой перспективной культуры принципиально важно для более полного использования потенциала растений при их интенсивном выращивании в условиях светокультуры с использованием инновационных облучателей на основе светопускающих диодов (СД).

Цель работы – изучить влияние факторов гормональной природы, а также спектрального состава света на морфогенетические показатели растений *Stevia rebaudiana* Vertoni в условиях *in vitro*.

Объектом исследования служили микро-растения стевии, выращиваемые в стерильных условиях, и размноженные ранее методом клонального микроразмножения. Микро-растения делили на микрочеренки, которые культивировали на питательной среде Мурасига и Скуга (МС), при температуре 22–24°C, с фотопериодом 18 часов и плотность потока фотонов (ППФ) – 150-180 мкмоль/м²·с.

В качестве факторов гормональной природы использовали различные вещества с ауксиновой (3-индолилмасляная кислота – ИМК 1мг/г, 3-индолилуксусная кислота – ИУК 0,1-1,0 мг/л и альфа-нафтилуксусная кислота – НУК 1мг/г) и цитокининовой (кинетин 1мг/г, 6-бензиламинопуридин – БАП 0,5-1,0 мг/л) активностью, а также изучали действие брассиностероидов (2,4-эпибрассинолид – Эпин 0,01-0,1 мг/л).

В качестве физических факторов изучали действие различного спектра светодиодных ламп (белый T_{цв}=5000°K, зелёный 515 нм, красный 660 нм и синий 460 нм) на процессы морфогенеза.

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена на основе методов математической статистики. На графиках представлены средние арифметические значения с доверительными интервалами на 5%-ом уровне значимости.

Исследования показали, что состав питательной среды оказывает существенное влияние на процессы морфогенеза. Так, культивирование первичных эксплантов на безгормональной среде МС, приводило к образованию 1-2 побегов со слегка удлинёнными междоузлиями, без развития корневой системы. Присутствие в питательной среде 1 мг/л БАП в сочетании с 0,5 мг/л ИУК, приводило к формированию хорошо пролиферирующей каллусной ткани, которая формировалась в базальной части эксплантов, а также наблюдали формирование «веретеновидной» формы листьев. При замене ИУК на более сильный ауксин в той же концентрации – ИМК, наблюдали аналогичный эффект – формирование в 100% случаях мощного каллуса в базальной части микрочеренка. Кроме того, было отмечено, что культивирование в этих условиях приводило к формированию слабых побегов светло-зеленого цвета, на которых так же формировались листья «веретеновидной» формы, которые в случае соприкосновения со средой превращались в каллусные клетки. Установлено, что из всех изученных гормонов, их концентраций и сочетаний была определена наиболее благоприятная комбинация регуляторов роста (препарат Эпин и ИУК в концентрациях 0,1 и 0,5 мг/л, соответственно), которая позволила получить хорошо развитые растения с 2-3 крупными микропобегами и наивысшим коэффициентом размножения [4].

Регулирование морфогенетическими процессами, возможно, осуществлять не только гормональным составом питательной среды, но и условиями освещения, в частности, спектральным составом света [5].

Мы использовали узкополосные СД красной и синей части спектра одновременно (660 и 460 нм, соответственно). Культивирование микропобегов *Stevia rebaudiana* на безгормональной среде в условиях *in vitro* при красно-синем освещении, по сравнению с контрольным вариантом (белые СД), оказывало стимулирующее действие на формирование корневой системы и на

Схема эксперимента

Вариант освещения	белый свет			зелёный (515 нм)			красный (660 нм)			синий (460 нм)		
Состав сред	МС безгормональная	МС + 0,1 мг/л ЭПИН + 0,5 мг/л ИУК	МС + 1,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л ИУК	МС безгормональная	МС + 0,1 мг/л ЭПИН + 0,5 мг/л ИУК	МС + 1,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л ИУК	МС безгормональная	МС + 0,1 мг/л ЭПИН + 0,5 мг/л ИУК	МС + 1,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л ИУК	МС безгормональная	МС + 0,1 мг/л ЭПИН + 0,5 мг/л ИУК	МС + 1,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л ИУК
условн. обознач.	б/г	ЭПИН	БАП	б/г	ЭПИН	БАП	б/г	ЭПИН	БАП	б/г	ЭПИН	БАП

коэффициент размножения, но при этом наблюдали формирование укороченных побегов [6].

Для выявления значимых частей спектра, для более точного изучения их влияния на морфологические параметры растений *stevia in vitro* и учитывая результаты предыдущих исследований, был проведён расширенный эксперимент, схема которого включает в себя варианты совместного действия регуляторов роста и спектрального светодиодного освещения. В работе использовали три варианта питательных сред (МС безгормональная – контрольный вариант; среда с добавлением 0,1 мг/л препарата Эпин в сочетании с 0,5 мг/л ИУК, а также среда, содержащая БАП и ИУК в концентрациях 1,0 и 0,5 мг/л соответственно), на которых был ярко выражен морфогенетический потенциал культивируемых микрочеренков. В качестве физического фактора использовали СД различных частей видимого спектра: белый, который являлся контрольным вариантом, зелёный (515 нм), красный (660 нм) и синий (460 нм) отдельно. Схема эксперимента представлена в Таблице 1.

В результате проведенных исследований и на основании биометрических показателей (высота главного побега (мм), коэффициент размножения, наличие корневой системы) установлено, что во всех вариантах питательных сред при выращивании микрорастений под красными СД, наблюдали интенсивный рост побегов, который происходил за счёт растяжения междоузлий.

Наиболее ярко эта ответная реакция была отмечена в варианте с присутствием в составе питательной среды препарата Эпин и ИУК (Рис. 1).

Что касается варианта питательной среды с БАП и ИУК, то в этих условиях красный свет так же усиливал биометрические показатели по сравнению с контрольным вариантом и средой, в которой не было фитогормонов. Однако, следует отметить, что именно в варианте с БАП и ИУК и в условиях красного света коэффициент размножения был максимальным и составил 11,9 (Рис. 2). Минимальный коэффициент размножения был отмечен в варианте с применением зеленого света и цитокинина БАП.

Что касается выращивания микрорастений под белым светом, то только в варианте с препаратом Эпин коэффициент размножения составил 10,5, в то время как на синем свете не было замечено определенной зависимости между гормональным составом питательной среды и условий освещения. В этих условиях коэффициент размножения был стабильно высоким (от 8,4 до 9,2) и при этом формировались микрорастения с сильно укороченными междоузлиями.

Кроме того нами отмечено, что у растений, культивируемых на среде с добавлением БАП и независимо от освещения, в базальной части эксплантов формировалась хорошо пролиферирующая каллусная ткань, а на безгормональной среде МС замечено формирование корневой системы.

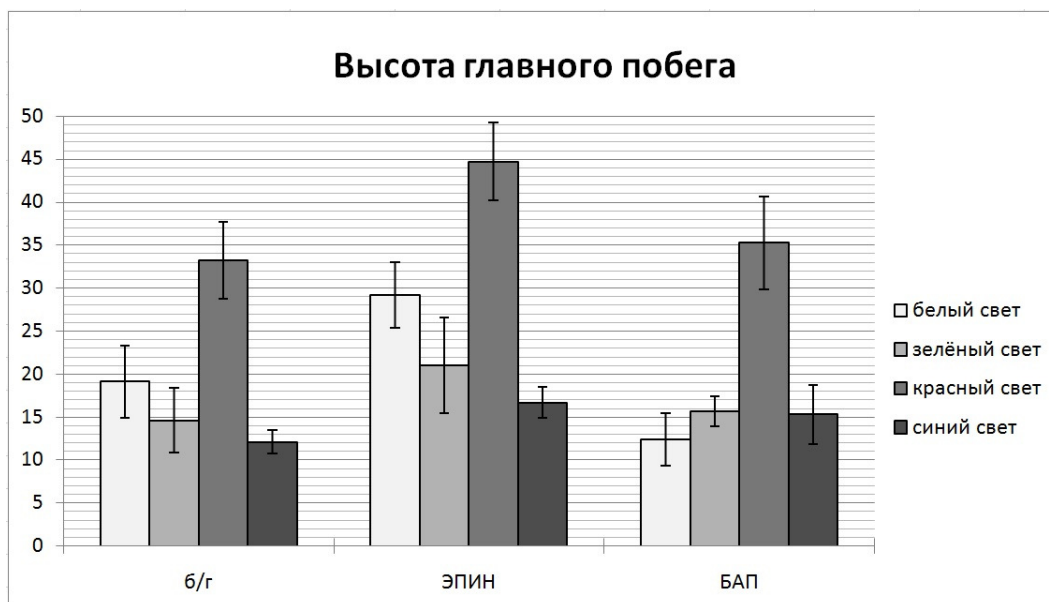


Рис. 1. Высота главного побега (в мм) у стевии *in vitro* при выращивании под разным светодиодном освещении и на разных гормональных сочетаниях

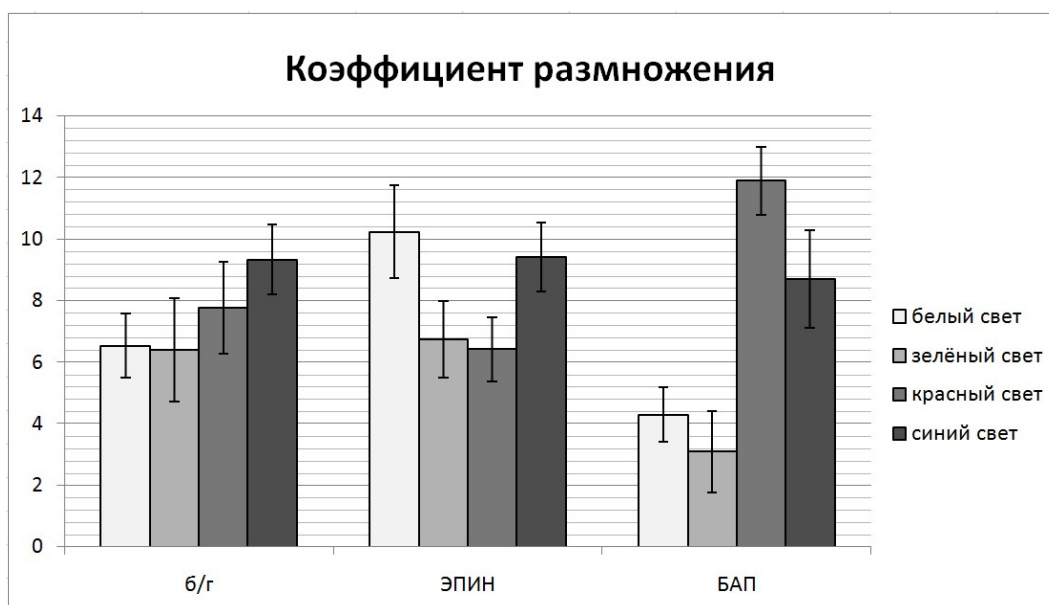


Рис. 2. Коэффициент размножения у стевии *in vitro* при выращивании под разным светодиодном освещении и на разных гормональных сочетаниях

Таким образом, в результате проведенных исследований были определены наилучшие режимы выращивания стевии *in vitro* и показана зависимость этого процесса от состава питательной среды и условий освещения. Проведение дальнейших исследований позволит более полно использовать морфогенетический потенциал растения стевии при интенсивном её выращивании в условиях светокультуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bondarev, N. I. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny // *Biologia plantarum*. — 2003. — Т. 47, №. 2. — С. 261-264.
2. Sivaram L. In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana* / U. Mukundan // *In Vitro Cellular & Developmental Plant Biology*. 2003. Т. 39, №. 5. С. 520-523.

3. Carakostas, M. C. Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside //Food and Chemical Toxicology. — 2008. —Т. 46, №. 7. —С. S1-S10.

4. Шульгина А.А., Калашникова Е.А. Зависимость морфофизиологических показателей от условий выращивания *Stevia rebaudiana* Bertoni в условиях *in vitro*. Ежемесячный научно-практический журнал Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2017. Т. 20, № 6. С. 46-50.

5. Tarakanov I., Yakovleva O., Konovalova I., Paliutina G., Anisimov A. Light-emitting diodes: on the way to combinatorial lighting technologies for basic research and crop production//Acta Horticulturae, 2012, vol. 956, p.171-178.

6. Шульгина А.А., Калашникова Е.А., Тараканов И.Г. Влияние факторов гормональной и физической природы на морфобиохимические показатели *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro* и *in vivo*. Труды Кубанского государственного аграрного университета, Ялта 2017. Т. 66, № 3 (1) С. 253-257.

References

1. Bondarev, N. I. Steviol glycoside content in differ-

ent organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny //Biologia plantarum. 2004. Т. 47, № 2. С. 261-264.

2. Sivaram L. In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana* / U. Mukundan // In Vitro Cellular & Developmental Plant Biology. 2003. Т. 39, № 5. С. 520-523.

3. Carakostas, M. C. Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside // Food and Chemical Toxicology. — 2008. — Т. 46, №. 7. — С. S1-S10.

4. Shulgina A.A., Kalashnikova E.A. Influence on morphophysiological parameters *Stevia rebaudiana* of the cultivation conditions *in vitro*. Monthly scientific and practical journal «Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry». — 2017. — Т. 20, № 6 — P. 46-50.

5. Tarakanov I., Yakovleva O., Konovalova I., Paliutina G., Anisimov A. Light-emitting diodes: on the way to combinatorial lighting technologies for basic research and crop production//Acta Horticulturae, 2012, vol. 956, P.171-178.

6. Shulgina A.A., Kalashnikova E.A., Tarakanov I. G. The influence of hormonal and physical factors on morphological and biochemical parameters of *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro* and *in vivo*. Works of Kuban State Agrarian University, Jalta. 2017. Т. 66. № 3 (1). P. 253-257.



THE EFFECT OF VARIOUS FACTORS ON THE MORPHOGENESIS OF STEVIA REBAUDIANA *IN VITRO*

© A.A. Shulgina, E.A. Kalashnikova, I.G. Tarakanov

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
49, ulitsa Timirjazevskaja, 127550, Moscow, Russian Federation

Today, sucrose is the main commonly used food sweetener derived from sugar-beet or sugarcane. However, excessive sugar consumption could undermine human's health. In the world, where problem of obesity continues to grow, studies on natural sugar substitutes are of vital importance. The object of our study is *Stevia rebaudiana* Bertoni (*Asteraceae*). Its leaves are rich with sweet glycosides, the major and the most valuable substance of them is stevioside (secondary metabolite of stevia). It is about 300 times sweeter than sucrose however it doesn't increase blood sugar level and generally recognized as safe. Stevioside is widely used as a low-calorie sweetener and sugar substitute product. In addition, it is chemically resistant at high temperatures and helps in wound healing acceleration and has antiallergic action. Useful qualities of this plant have become a reason of our studies on its secondary metabolites. The aim of our study is to optimize conditions of *Stevia rebaudiana* cultivation with hormonal content of MS medium and artificial lighting. Plants were cultivated in MS medium with various concentrations of growth substances in order to find the best hormonal proportion. Secondary metabolites synthesis directly depends on the photosynthesis intensity. Photosynthesis rate increasing could be done in particular by growing plants under specific light spectrum. LEDs (light-emitting diodes) provide unique possibilities for manipulating plant photomorphogenesis. We studied the effect of light quality (white, green, blue and red regions of visible light spectrum) in order to find out the most favorable wave lengths for plants. Further studies on the optimal LED lighting design could result in the increased yield of targeted functional components.

Key words: *Stevia rebaudiana*, *in vitro* culture, stevioside, light spectral composition, light-emitting diodes (LED).

УДК 577.21; 575.167

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-110-116

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА RS16260 ГЕНА *CDH1* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА ЖЕЛУДКА

© Л.Ф. Юсупова, А.Х. Нургалиева, И.Р. Гилязова, Д.С. Прокофьева, Ф.Р. Мунасыпов, Ш.М. Хуснутдинов, Р.Р. Рахимов, Д.Д. Сакаева, Э.К. Хуснутдинова

Рак желудка – это злокачественная опухоль слизистой оболочки желудка человека, характеризующаяся высоким метастатическим потенциалом и плохим прогнозом. В структуре онкологических заболеваний в России рак данной локализации устойчиво занимает лидирующие позиции. Важнейшим геном-кандидатом семейного рака желудка считается ген *CDH1*, кодирующий трансмембранный кальций-зависимый гликопротеин Е-кадгерин. Утрата экспрессии Е-кадгерина может быть обусловлена различными генетическими aberrациями гена *CDH1*. В частности изменения в промоторной области, могут приводить к эпигенетическому молчанию и инактивации гена *CDH1*, что в свою очередь может играть роль в прогрессировании рака.

В данной работе проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта, находящегося в промоторной области гена *CDH1*, в позиции -160C>A (rs16260), у больных раком желудка и здоровых доноров из Республики Башкортостан. Выявлено, что аллель rs16260*С и гомозиготный генотип rs16260*С/С гена *CDH1* являются для русских маркерами повышенного риска развития злокачественных опухолей желудка, а маркером пониженного риска для данной группы испытуемых является аллель rs16260*А. Среди татар обнаружен маркер повышенного риска развития онкопатологий желудка, им оказался гомозиготный генотип rs16260*А/А гена *CDH1*. Показано, что среди женщин нашего региона генотип rs16260*С/А достоверно чаще встречается у индивидов контрольной группы, чем у больных раком желудка.

ЮСУПОВА Лилия Фанилевна, Башкирский государственный университет,

e-mail: liliyagallyamova@mail.ru

НУРГАЛИЕВА Альфия Хаматьяновна – к.б.н., Башкирский государственный университет,

e-mail: alfiyakh83@gmail.com

ГИЛЯЗОВА Ирина Ришатовна – к.б.н., Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, e-mail: gilyasova_irina@mail.ru

ПРОКОФЬЕВА Дарья Симоновна – к.б.н., Башкирский государственный университет,

e-mail: Dager-glade@yandex.ru

МУНАСЫПОВ Фарит Рашитович – д.м.н., Республиканский клинический онкологический диспансер, e-mail: alfiyakh83@gmail.com

ХУСНУТДИНОВ, Шамиль Масгутович – д.м.н., Республиканский клинический онкологический диспансер, e-mail: alfiyakh83@gmail.com

РАХИМОВ Радмир Радимович – к.м.н., Республиканский клинический онкологический диспансер, e-mail: radmir-rr@mail.ru

САКАЕВА Дина Дамировна – д.м.н., Республиканский клинический онкологический диспансер, e-mail: D_sakaeva@mail.ru

ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна – д.м.н., Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Башкирский государственный университет, e-mail: elzakh@mail.ru

Полученные результаты подтверждают роль полиморфного варианта rs16260 гена *CDH1* в развитии злокачественных опухолей желудка для жителей Республики Башкортостан. Обнаруженные ассоциации могут быть востребованы для определения специфических молекулярных маркеров рака желудка, а также для разработки на их основе тестов ранней диагностики опухолей, что особенно актуально для семей с высоким риском развития рака.

Ключевые слова: рак желудка, ген *CDH1*, ассоциация, аллель, полиморфный вариант.

Введение. Известно, что в патогенез рака желудка (РЖ), также как и для большинства распространенных форм рака, вовлечены одновременно как средовые, так и генетические факторы. Тенденции последних десятилетий направлены на все большее внимание генетическим факторам, которые не только определяют индивидуальный риск развития РЖ, но и необходимы для понимания процессов канцерогенеза в целом. Около 5-10% случаев РЖ имеют семейную историю [1]. Молекулярной причиной предрасположенности к РЖ с высоким риском (70-83%) являются наследуемые мутации в ряде генов [2]. Специфическим геном-супрессором семейного РЖ считают ген *CDH1*, кодирующий трансмембранный кальций-зависимый гликопротеин Е-кадгерин. Ген *CDH1* локализован на 16-ой хромосоме, в позиции 16q22.1, включает 16 экзонов и 15 интронов, имеет протяженность приблизительно 100 000 п. н. геномной ДНК, которые транскрибируются в 4 500 нуклеотидов мРНК [3]. Молекула Е-кадгерина включает 909 аминокислот (728 аминокислот зрелого пептида). Этот белок обеспечивает адгезивные межклеточные контакты эпителиальных клеток, организует межклеточные связи, имеет большое значение для установления клеточной полярности и поддержания нормальной морфологии тканей и точной дифференцировки [3]. Изменения молекулы Е-кадгерина могут вызывать рассеянный рост опухоли, снижение количества межклеточных связей и повышать подвижность опухолевых клеток [4]. Частота генетических aberrаций в *CDH1* варьирует в зависимости от этнической принадлежности изучаемой выборки. Выявление нарушений гена *CDH1* обеспечивает объективный критерий для формирования групп риска развития РЖ с целью его профилактики и своевременной диагностики в случае возникно-

вения заболевания. Целью данной работы является поиск ассоциации аллелей полиморфного варианта -160C>A (rs16260), находящегося в промоторной области гена *CDH1*, с риском развития рака желудка.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы ДНК больных РЖ и здоровых доноров в возрасте от 25 до 88 лет, проживающих в г. Уфа Республики Башкортостан (РБ). Группа больных состояла из 221 человека с клинически установленным диагнозом «рак желудка», находящихся на лечении в ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер». Согласно этнической принадлежности группу больных пациентов представляли 100 русских, 97 татар, 19 башкир и 5 индивидов другой национальности. В качестве контроля исследована группа здоровых доноров без каких-либо признаков заболеваний желудочно-кишечного тракта, состоящая из 350 человек различной этнической принадлежности (164 русских, 146 татар, 33 башкира и 7 индивидов другой национальности). Распределение по половому признаку среди больных было следующим: мужчин – 125, женщин – 96, среди индивидов контрольной группы: мужчин – 205, женщин – 145. Кроме того, группа больных РЖ была разделена на подгруппы в зависимости от степени дифференцировки опухоли (высоко- и умереннодифференцированный РЖ – 90 пациентов и малодифференцированный, либо недифференцированный РЖ – 121 пациент), а также стадии развития заболевания (1 стадия – 12 человек, 2 стадия – 39, 3 стадия – 148 и 4 стадия – 17 человек). Все испытуемые прошли анкетирование, учитывающее национальную принадлежность до трех поколений, год рождения, статус курения, тип питания, наличие у близких родственников отягощенности по онкологическим

Данные об используемой в работе эндонуклеазе рестрикции, последовательности праймеров, номенклатуре аллелей анализируемого ДНК-локуса

Полиморфный вариант, dbSNP	Праймеры, 5' – 3'	Эндонуклеаза рестрикции, аллели, размер фрагментов
-160C>A, rs16260	GCCCCGACTTGTCTCTCTAC GGCCACAGCCAATCAGCA	HincII, С – 447 п.н. А – 367 + 80 п.н.

заболеваниям, а также подписали информационное согласие на участие в исследовании.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом последовательной фенольно-хлороформной экстракции по Мэтью [5]. Амплификацию ДНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на амплификаторе «GeneAmp PCR System 2720» производства компании «Applied Biosystems» (США). Определение нуклеотидной замены проводили методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ-анализ). Данные о локусе, последовательности специфичных олигонуклеотидных праймеров, названии эндонуклеазы рестрикции и размерах амплифицируемых фрагментов представлены в таблице 1 (табл. 1).

Результаты ПЦР и ПДРФ-анализа оценивали методом электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с применением программного обеспечения MS Office Excel. При попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля применялся критерий χ^2 для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йейтса на непрерывность (<http://www.biometrika.tomsk.ru/>). При обнаружении статистически значимых различий ($p < 0,05$) между исследуемыми выборками проводилась оценка показателя отношения шансов (odds ratio, OR), а также границ его 95%-ного доверительного интервала (CI 95%) [6].

Результаты и обсуждение. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs16260 гена *CDH1* среди больных РЖ и здоровых доноров из РБ представлено в таблице 2 (табл. 2).

Проведенный анализ показал достоверные различия в распределении частот аллелей и генотипов rs16260 гена *CDH1* между больными РЖ и здоровыми донорами в зависимости от их этнической принадлежности. Оказалось, что для русских маркерами повышенного риска развития злокачественных опухолей желудка является аллель rs16260*С, выявленный в 81,50% случаев у больных и в 73,48% случаев – у индивидов контрольной группы ($\chi^2=4,02$; $p=0,04$; OR=1,59; 95%CI 1,03-2,45), и образованный им гомозиготный генотип rs16260*С/С, встречающийся среди пациентов с частотой 65,00%, а в контроле – с частотой 51,22% ($\chi^2=4,25$; $p=0,04$; OR=1,77; 95%CI 1,06-2,95). При этом аллель rs16260*А достоверно чаще обнаружен в контрольной группе (в 26,52% случаев), чем в описываемой группе больных (в 18,50% случаев) и, следовательно, может считаться маркером пониженного риска развития РЖ среди русских ($\chi^2=4,02$; $p=0,04$; OR=0,63; 95%CI 0,41-0,97). Среди татар выявлен маркер повышенного риска развития злокачественных новообразований желудка, им оказался гомозиготный генотип rs16260*А/А, встречающийся среди больных РЖ с частотой 8,25%, а в группе здоровых доноров – с частотой 0,68% ($\chi^2=7,35$; $p=0,007$; OR=13,03; 95%CI 1,60-105,95).

Разделение выборки больных и контроля по половому признаку показало, что у женщин с РЖ гетерозиготный генотип rs16260*С/А

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs16260 гена CDH1 у больных РЖ и здоровых доноров

Выборка		Генотипы			Аллели		N
		CC	CA	AA	C	A	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Больные РЖ	Русские	65 (65,00)	33 (33,00)	2 (2,00)	163 (81,50)	37 (18,50)	100
	Татары	58 (59,79)	31 (31,96)	8 (8,25)	147 (75,77)	47 (24,23)	97
	Мужчины	73 (58,40)	46 (36,80)	6 (4,80)	192 (76,80)	58 (23,20)	125
	Женщины	62 (64,58)	28 (29,17)	6 (6,25)	152 (79,17)	40 (20,83)	96
	В целом	135 (61,09)	74 (33,48)	12 (5,43)	344 (77,83)	98 (22,17)	221
Контроль	Русские	84 (51,22)	73 (44,51)	7 (4,27)	241 (73,48)	87 (26,52)	164
	Татары	88 (60,27)	57 (39,04)	1 (0,68)	233 (79,79)	59 (20,21)	146
	Мужчины	115 (56,10)	81 (39,51)	9 (4,39)	311 (75,85)	99 (24,15)	205
	Женщины	79 (54,48)	64 (44,14)	2 (1,38)	222 (76,55)	68 (23,45)	145
	В целом	194 (55,43)	145 (41,43)	11 (3,14)	533 (76,14)	167 (23,86)	350

Примечание к табл.: n – численности групп; N – объем выборки.

встречается гораздо реже (в 29,17% случаев), чем у женщин контрольной группы (в 44,14% случаев), следовательно, гетерозиготный генотип rs16260*C/A является маркером пониженного риска развития РЖ для женщин нашего региона ($\chi^2=4,87$; $p=0,027$; OR=0,52; 95%CI 0,30-0,90). При этом выявлено, что гомозиготный генотип rs16260*A/A, напротив, чаще встречается среди женщин больных РЖ (в 6,25% случаев), чем среди здоровых (в 1,38% случаев) и мог бы быть идентифицирован, как маркер повышенного риска развития изучаемой патологии для данной группы испытуемых, однако различия не достигли уровня статистической значимости ($p>0,05$).

Кроме этого, нами установлено, что у пациентов с недифференцированным, либо малодифференцированным РЖ чаще встречается гомозиготный генотип rs16260*C/C ($\chi^2=5,15$; $p=0,023$; OR=1,69; 95%CI 1,09-2,61) и реже встречается гетерозиготный генотип rs16260*C/A ($\chi^2=7,07$; $p=0,008$; OR=0,53; 95%CI 0,34-0,83) по сравнению с контрольной выборкой.

Существует множество научных работ, посвященных изучению влияния полиморфного варианта rs16260 гена CDH1 на риск раз-

вития онкопатологий желудка, однако полученные исследователями данные весьма противоречивы. Так в 2017 г. Menbari M. N. с соавторами опубликовали результаты исследования, в котором не обнаружили взаимосвязи между полиморфным вариантом промоторной области -160C>A гена CDH1 и предрасположенностью к РЖ Курдского населения Ирана [7]. При изучении популяции Западной Мексики Bustos-Carpinteiro A. R. с коллегами также не обнаружили значимой ассоциации аллелей полиморфного варианта -160C>A гена CDH1 с риском развития диффузного, либо кишечного РЖ [8]. В результате другого исследования были получены данные, свидетельствующие о том, что носительство аллеля rs16260*A значимо повышает риск развития РЖ диффузного типа для жителей о. Тайвань [9]. Достоверную связь полиморфного варианта -160C>A гена CDH1 со злокачественными новообразованиями кардии желудка как в азиатских, так и в европейских популяциях показали Jing H. с коллегами, опубликовав результаты проведенного мета-анализа. При этом значимая ассоциация с некардиальным РЖ была показана только для азиатской подгруппы [10].

Причины расхождения данных относительно ассоциации аллелей и генотипов полиморфного варианта -160C>A гена *CDH1* с риском развития РЖ до сих пор не ясны, однако они свидетельствуют о важности учета этнической принадлежности анализируемых групп при интерпретации полученных результатов. В связи с этим необходимы дальнейшие глубокие научные исследования, которые призваны более подробно определить вклад генетических изменений *CDH1* в развитие и прогрессирование злокачественных опухолей в различных популяциях мира.

Заключение. РЖ относится к группе гетерогенных заболеваний, в основе которых находится комплекс генетических нарушений, определяющих свойство неконтролируемого роста опухоли и способность к метастазированию. Достижения в молекулярной биологии последних десятилетий оказали огромное влияние на понимание природы инициализации и прогрессирования злокачественных новообразований. В результате проведенного нами исследования выявлены маркеры повышенного риска развития рака желудка для русских - аллель rs16260*C и генотип rs16260*C/C гена *CDH1*, для татар - генотип rs16260*A/A. Кроме этого, показано, что у пациентов с недифференцированным, либо мало дифференцированным РЖ чаще встречается гомозиготный генотип rs16260*C/C и реже встречается гетерозиготный генотип rs16260*C/A по сравнению с контрольной выборкой. Дальнейшее изучение этой проблемы пополнит знания об особенностях мутационного процесса в разных популяциях и будет способствовать практической диагностике наследственной предрасположенности к РЖ.

Исследование поддержано РФФИ (грант №17-44-020497 p_a) и программой поддержки биоресурсных коллекций ФАНО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Степанов И.В., Завьялова М.В., Григорьева Е.С., Букурова Ю.А., Афанасьев С.Г., Чердынцева Н.В. Клинико-морфологические и молекулярно-ге-

нетические особенности интестинального и диффузного типов карцином желудка // Сибирский онкологический журнал. 2010. № 4 (40). С. 55-66.

2. Baniak N., Senger J.L., Ahmed S., Kanthan S.C., Kanthan R. Gastric biomarkers: a global review // World J. Surg. Oncol. 2016. V. 14. № 1. P. 212. doi: 10.1186/s12957-016-0969-3

3. Anbiaee R., Mojir Sheibani K., Torbati P., Jaam H. Abnormal expression of E-Cadherin in gastric adenocarcinoma, and its correlation with tumor histopathology and Helicobacter pylori infection // Iran Red. Crescent. Med. J. 2013. V. 15. № 3. P. 218-222. doi: 10.5812/ircmj.4032

4. Wang H-D., Ren J., Zhang L. CDH1 germline mutation in hereditary gastric carcinoma // World J. Gastroenterol. 2004. V. 10. № 21. P. 3088-3093.

5. Mathew C.G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Methods Mol. Biol. 1985. V. 2. P. 31-34. doi: 10.1385/0-89603-064-4:31

6. Schlesselman J. Case-Control Studies: Design, Conduct, Analysis / New York, Oxford: Oxford Univ. Press, 1982. P. 58-96.

7. Menbari M.N., Nasser S., Menbari N., Mehdiabadi R., Alipur Y., Roshani D. The -160 (C>A) CDH1 Gene Promoter Polymorphism and Its Relationship with Survival of Patients with Gastric Cancer in Kurdistan // Asian Pac. J. Cancer Prev. 2017. V. 18. № 6. P. 1561-1565.

8. Bustos-Carpinteyro A.R., Delgado-Figueroa N., Santiago-Luna E., Magaña-Torres M.T., Sánchez-López J.Y. Association between the CDH1 -472delA and -160C>A polymorphisms and diffuse and intestinal gastric cancer in a Mexican population // Genet. Mol. Res. 2016. V. 15. № 3. doi: 10.4238/gmr.15038715

9. Chu C.M., Chen C.J., Chan D.C., Wu H.S., Liu Y.C., Shen C.Y., Chang T.M., Yu J.C., Harn H.J., Yu C.P., Yang M.H. CDH1 polymorphisms and haplotypes in sporadic diffuse and intestinal gastric cancer: a case-control study based on direct sequencing analysis // World J. Surg. Oncol. 2014. V. 12. № 80. doi: 10.1186/1477-7819-12-80

10. Jing H., Dai F., Zhao C., Yang J., Li L., Kota P., Mao L., Xiang K., Zheng C., Yang J. Association of genetic variants in and promoter hypermethylation of CDH1 with gastric cancer: a meta-analysis // Medicine (Baltimore). 2014. V. 93. № 19:e107. doi: 10.1097/MD.000000000000107

References

1. Stepanov I.V., Zavyalova M.V., Grigorieva E.S., Bukurova Y.A., Afanasyev S.G., Cherdyntseva

N.V. Clinico-morphological and molecular-genetic features of intestinal and diffuse types of carcinoma of stomach // Siberian Oncological Journal. 2010. № 4 (40). P. 55-66.

2. Baniak N., Senger J.L., Ahmed S., Kanthan S.C., Kanthan R. Gastric biomarkers: a global review // World J. Surg. Oncol. 2016. V. 14. № 1. P. 212. doi: 10.1186/s12957-016-0969-3

3. Anbiaee R., Mojir Sheibani K., Torbati P., Jaam H. Abnormal expression of E-Cadherin in gastric adenocarcinoma, and its correlation with tumor histopathology and Helicobacter pylori infection // Iran Red. Crescent. Med. J. 2013. V. 15. № 3. P. 218-222. doi: 10.5812/ircmj.4032

4. Wang H-D., Ren J., Zhang L. CDH1 germline mutation in hereditary gastric carcinoma // World J. Gastroenterol. 2004. V. 10. № 21. P. 3088-3093.

5. Mathew C.G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Methods Mol. Biol. 1985. V. 2. P. 31-34. doi: 10.1385/0-89603-064-4:31

6. Schlesselman J. Case-Control Studies: Design, Conduct, Analysis / New York, Oxford: Oxford Univ. Press, 1982. P. 58-96.

7. Menbari M.N., Nasseri S., Menbari N., Mehdiabadi R., Alipur Y., Roshani D. The -160 (C>A)

CDH1 Gene Promoter Polymorphism and Its Relationship with Survival of Patients with Gastric Cancer in Kurdistan // Asian Pac. J. Cancer Prev. 2017. V. 18. № 6. P. 1561-1565.

8. Bustos-Carpinteyro A.R., Delgado-Figueroa N., Santiago-Luna E., Magaña-Torres M.T., Sánchez-López J.Y. Association between the CDH1 -472delA and -160C>A polymorphisms and diffuse and intestinal gastric cancer in a Mexican population // Genet. Mol. Res. 2016. V. 15. № 3. doi: 10.4238/gmr.15038715

9. Chu C.M., Chen C.J., Chan D.C., Wu H.S., Liu Y.C., Shen C.Y., Chang T.M., Yu J.C., Harn H.J., Yu C.P., Yang M.H. CDH1 polymorphisms and haplotypes in sporadic diffuse and intestinal gastric cancer: a case-control study based on direct sequencing analysis // World J. Surg. Oncol. 2014. V. 12. № 80. doi: 10.1186/1477-7819-12-80

10. Jing H., Dai F., Zhao C., Yang J., Li L., Kota P., Mao L., Xiang K., Zheng C., Yang J. Association of genetic variants in and promoter hypermethylation of CDH1 with gastric cancer: a meta-analysis // Medicine (Baltimore). 2014. V. 93. № 19:e107. doi: 10.1097/M D.0000000000000107



THE STUDY OF THE ASSOCIATION OF ALLELES AND GENOTYPES OF POLYMORPHIC VARIANT OF THE PROMOTER REGION OF THE *CDH1* GENE WITH THE RISK OF DEVELOPING GASTRIC CANCER

© L.F. Yusupova¹, A.Kh. Nurgalieva¹, I.R. Gilyazova², D.S. Prokofyeva¹, F.R. Munasypov³, Sh.M. Khusnutdinov³, R.R. Rakhimov³, D.D. Sakaeva³, E.K. Khusnutdinova^{1,2}

¹ Bashkir State University,

32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

² Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,

71, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

³ Republican Clinical Oncology Center,

73/1 prospekt Oktyabrya, 450000, Ufa, Russian Federation

Gastric cancer is a malignant tumor of the human gastric mucosa, characterized by high metastatic potential and poor prognosis. In the structure of oncological diseases in Russia, cancer of this localization steadily takes a leading position. The most important candidate gene for familial gastric cancer is the *CDH1* gene, which encodes the transmembrane calcium-dependent glycoprotein E-cadherin. The loss of E-cadherin expression can be due to various genetic aberrations of the *CDH1* gene. In particular, changes in the promoter region can lead to epigenetic silence and inactivation of the *CDH1* gene, which in turn can play a role in the progression of cancer.

In this work, the frequency distribution of alleles and genotypes of the polymorphic variant located in the promoter region of the *CDHI* gene at position -160C>A (rs16260) is analyzed in residents of the Republic of Bashkortostan. The study involved 221 patients with established diagnosis of «gastric cancer», as well as 350 unrelated healthy individuals living in the Republic of Bashkortostan. Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by sequential phenol-chloroform extraction. Amplification of DNA, determination of nucleotide substitution was carried out by PCR-RFLP.

The analysis revealed that the allele rs16260*C and the homozygous genotype rs16260*C/C of the *CDHI* gene are markers of increased risk of developing gastric malignancies for the Russian, and the allele rs16260*A is a marker of reduced risk for this group of subjects. Among the Tatars, was found a marker of increased risk of gastric oncology development, it was a homozygous genotype rs16260*A/A of the *CDHI* gene. It is shown that among the women of our region the genotype rs16260*C/A is significantly more frequent in individuals of the control group than in patients with gastric cancer.

The obtained results confirm the role of the polymorphic variant rs16260 of the *CDHI* gene in the development of malignant tumors of the stomach for residents of the Republic of Bashkortostan. Detected associations can be used to identify specific molecular markers of gastric cancer, as well as for developing on their basis tests of early diagnosis of tumors, which is especially important for families with a high risk of developing cancer.

Key words: gastric cancer, *CDHI* gene, association, allele, polymorphic variant.

УДК 581.143.6; 581.2.07; 632.938

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-5-3-117-122

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ И ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТ НА АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

© Л.Г. Яруллина, Г.Ф. Бурханова, А.В. Сорокань, В.О. Цветков,
Р.И. Ибрагимов, И.В. Максимов

В современных условиях высокой антропогенной нагрузки на агроэкосистемы остро встает вопрос экологически безопасного растениеводства, требующего новых подходов к защите растений от патогенов. Благодаря исследованиям молекулярных механизмов фитоиммунитета установлено, что в зависимости от стратегии питания патогена растения в ответ на заражение активируют различные сигнальные системы, обеспечивающие оптимальную защиту. Салициловая кислота (СК) и жасмоновая кислота (ЖК) являются сигнальными молекулами, механизм защитного действия которых связан с индукцией генерации активных форм кислорода (АФК) в растительных тканях. Эти вещества, сами не обладая антимикробной активностью, стимулируют защитные реакции клеток растений посредством активации синтеза ряда связанных с патогенезом белков. В данной работе изучали влияние СК и ЖК на устойчивость листьев картофеля к инфицированию возбудителем фитофтороза (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary), накопление в них H₂O₂ и изменение транскрипционной активности генов ингибиторов гидролаз. Выявлено, что обработка СК и ЖК способствовала повышению устойчивости картофеля к заражению *Ph. infestans*, накоплению в них H₂O₂ и усилению транскрипционной активности генов ингибиторов гидролаз. При этом ЖК оказывала более значительное стимулирующее действие как на продукцию пероксида водорода, так и на транскрипционную активность гена ингибитора протеиназы.

Полученные данные позволяют говорить о том, что активация синтеза ингибиторов гидролаз в растениях картофеля под воздействием СК и ЖК может служить одним из факторов формирования их устойчивости к *Ph. infestans*, в том числе через усиление генерации H₂O₂. Это указывает на возможность регуляции активности данной группы соединений путем экзогенных воздействий, в том числе в результате обработки растений индукторами устойчивости.

Ключевые слова: картофель, *Phytophthora infestans*, гидролитические ферменты и их ингибиторы, салициловая и жасмоновая кислоты, индуцированная устойчивость.

Введение. В современных условиях высокой антропогенной нагрузки на агроэкосистемы остро встает вопрос экологически безопасного растениеводства, требующего новых подходов к

ЯРУЛЛИНА Любовь Георгиевна – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Башкирский государственный университет, e-mail: yarullina@bk.ru

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

СОРОКАНЬ Антонина Вячеславовна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, e-mail: fortyanns@googlemail.ru

ЦВЕТКОВ Вячеслав Олегович – к.б.н., Башкирский государственный университет, e-mail: zv347@ya.ru

ИБРАГИМОВ Ринат Исмагилович – к.б.н., Башкирский государственный университет, e-mail: IBRAGIMOV56@yandex.ru

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

защите растений от патогенов. Благодаря исследованиям молекулярных механизмов фитоиммунитета установлено, что в зависимости от стратегии питания патогена растения в ответ на заражение активируют различные сигнальные системы, обеспечивающие оптимальную защиту.

Салициловая кислота (СК) и жасмоновая кислота (ЖК) являются сигнальными молекулами, механизм защитного действия которых связан с индукцией генерации активных форм кислорода (АФК) в растительных тканях. Эти вещества, сами не обладая антимикробной активностью, стимулируют защитные реакции клеток растений посредством активации синтеза ряда связанных с патогенезом белков, в том числе и ингибиторов гидролаз патогенов [1]. Поскольку СК и ЖК положительно влияют на устойчивость растений к ряду вредоносных заболеваний и способствуют повышению их продуктивности, эти соединения находят широкое применение в растениеводстве [2].

Фитофтороз – одно из опаснейших заболеваний картофеля, поражающее практически все части растения. Возбудитель фитофтороза – оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary является патогеном, на начальных стадиях болезни проявляющим свойства биотрофа, а позднее переходит на некротрофный тип питания, т.е. проявляет гембиотрофные свойства. Устойчивость картофеля к возбудителю фитофтороза связывают с реакцией сверхчувствительности (СВЧ-реакция). Предполагается, что в этом процессе важную роль играют АФК, обладающие в низких концентрациях свойствами сигнальных молекул, а в высоких – проявляющие прямой биоцидный эффект [3].

Показано участие ингибиторов гидролаз в защитных реакциях растений к различным фитопатогенным микроорганизмам [4]. Вероятно, снижение уровня гидролитической активности ферментов является важной частью приспособительных механизмов растительного организма, в первую очередь, при инфицировании патогенными микроорганизмами.

Исследование изменений продукции пероксида водорода и экспрессии генов ингибиторов гидролаз в тканях, обработанных СК и ЖК, на фоне заражения растений картофеля возбу-

телем фитофтороза представляет несомненный научный и практический интерес.

Материалы и методы.

Объекты исследования. Объектом исследований были пробирочные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Ранняя Роза. Растения *in vitro* культивировали в течение 30 суток на агаризованной среде Мурасиге и Скуга (МС), содержащей СК или ЖК в конечных концентрациях 10^{-6} М и 10^{-7} М соответственно. Растения инфицировали путем нанесения 5 мкл суспензии зооспор (10^5 спор/мл) на лист. Контролем служили неинфицированные и инфицированные растения, растущие на среде МС.

Для получения зооспор возбудитель фитофтороза *Ph. infestans* (штамм Башкирский) выращивали в пробирках на картофельно-глюкозной среде в течение 11 суток. Затем зооспорангии оомицета заливали дистиллированной водой и выдерживали 45 мин при 4 °С и 45 мин при комнатной температуре. Концентрацию зооспор определяли в камере Горяева. Развитие болезни наблюдали в течение пяти суток и оценивали по четырехбалльной шкале, где листья без симптомов фитофтороза оценивали как 0 баллов, наличие симптомов болезни и поражение листа от 1 до 25% как 1, от 26 до 50% как 2; от 51 до 75% как 3 и более 75% - 4.

Определение концентрации перекиси водорода. Для определения концентрации H_2O_2 к 500 мкл реагента, содержащего 0.074% соль Мора в 5.81% серной кислоте и 0.009% ксиленоловый оранжевый в 1.82% раствора сорбита (в соотношении 1:100) добавляли 50 мкл супернатанта предварительно гомогенизированного и отцентрифугированного опытного образца, после чего оставляли для инкубации при комнатной температуре на 45 мин. Перед измерением образцы центрифугировали при 8000 г в течение 10 мин, затем измеряли оптическую плотность супернатанта образовавшегося комплекса при длине волны 560 нм на спектрофотометре Biospec-Mini (Shimadzu, Япония). Концентрацию H_2O_2 определяли по предварительно построенной калибровочной кривой.

Выделение тотальной РНК из листьев картофеля, зафиксированных в жидком азоте, проводили с использованием тризола согласно

протоколу фирмы-поставщика (“Sigma”, Германия). Содержание нуклеиновых кислот измеряли при A260/A280 на спектрофотометре Smart Spec Plus (“Bio-Rad, США”), предварительно растворив образцы в Трис–ЭДТА-буфере. Для получения кДНК на основе РНК изучаемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы, согласно протоколу фирмы-поставщика (“Синтол”, Россия). Анализ накопления транскриптов генов ингибитора амилазы XM006351484 и ингибитора протеиназы JX683427 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). Изменения в транскрипционной активности генов (оценка числа копий мРНК для каждого гена) определяли относительного референсного гена *St_act* («ген домашнего хозяйства», актин X55749) с помощью программного обеспечения “iCycler iQ5 Real-Time Detection System software” (“Bio-Rad”, США).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерной программы StatSoft Statistica 6.0. Эксперименты включали не менее трех биологических повторов при анализе биохимических показателей и не менее 15 повторов при анализе транскрипционной активности. На рисунках и в таблицах приведены средние значения и их стандартные ошибки.

Результаты и обсуждение. Влияние СК и ЖК на развитие *Ph. infestans*. Исследования показали, что в необработанных контрольных листьях симптомы развития болезни проявлялись через 48 ч после инфицирования в виде бурых пятен, которые постепенно увеличивались в ходе развития патогена (табл. 1).

Обработка СК и ЖК снижала степень развития фитофтороза. В вариантах с обработкой небольшие бурые пятна появлялись на листьях только через 72 ч после инокуляции (табл. 1). В дальнейшем в варианте с обработкой растений СК количество пятен несколько возрастало, а в варианте с предобработкой растений ЖК изме-

нялось незначительно. Полученные данные свидетельствуют о том, что СК и ЖК повышали устойчивость растений картофеля к *Ph. infestans*.

Т а б л и ц а 1

Влияние салициловой и жасмоновой кислот на развитие *Ph. infestans* на листьях картофеля

Время после инокуляции, ч	Индекс развития болезни		
	Контроль	СК	ЖК
48	0,6±0,02	-	-
72	1,5±0,03	0,2±0,01	0,3±0,01
96	1,9±0,07	0,7±0,04	0,6±0,02
120	2,5±0,09	1,2±0,05	0,8±0,04

Влияние СК и ЖК на содержание пероксида водорода в растениях картофеля при инфицировании *Ph. infestans*. Результаты проведенных исследований показали, что инфицирование, обработка СК и ЖК повышали уровень H₂O₂ в растениях картофеля (табл. 2). ЖК оказывала более значительное стимулирующее действие на продукцию пероксида водорода по сравнению с СК как в незараженных, так и зараженных растениях. Так, через 48 ч после инокуляции уровень H₂O₂ в варианте с предобработкой ЖК превышал аналогичный показатель контрольных растений в 2 раза (табл. 2).

Образование АФК является одним из наиболее ранних ответов растительных клеток

Т а б л и ц а 2

Изменение содержания H₂O₂ в растениях картофеля при обработке салициловой и жасмоновой кислотами и инфицировании *Ph. infestans*

Штаммы <i>Ph. infestans</i>	Время после инокуляции, ч / H ₂ O ₂ , мкмоль/г сырого веса		
	24	48	72
Контроль	2.3±0.1	3.3±0.2	2.6±0.1
Инфицирование	2.8±0.2	3.9±0.3	2.1±0.2
СК	3,1±0,1	4,1±0,3	2,6±0,2
СК+ <i>Ph. infestans</i>	3,9±0,2	6,4±0,5	2,8±0,1
ЖК	3,5±0,2	5,7±0,4	3,9±0,2
ЖК+ <i>Ph. infestans</i>	4,3±0,3	7,8±0,6	6,7±0,5

на контакт с патогеном, в результате чего индуцируются защитные реакции растения, в том числе, синтез PR-белков [5].

Анализ транскрипционной активности генов ингибиторов гидролаз. На рис. 1 представлены данные об изменении транскрипционной активности гена ингибитора амилазы в листьях картофеля под влиянием обработки СК и ЖК и заражения *Ph. infestans*. Исследования показали, что СК и ЖК оказывали стимулирующее действие на транскрипционную активность гена ингибитора амилазы в незараженных растениях картофеля, но особенно – при заражении (рис. 1). Так, через 24 после инфицирования *Ph. infestans* в растениях картофеля уровень транскрипционной активности гена ингибитора амилазы повышался в 3 раза (рис. 1).

В растениях, предобработанных СК и ЖК, при инфицировании индуцировался высокий уровень транскрипционной активности гена амилазы, который сохранялся в течение 48 ч (рис. 1). Вероятно, в ответ на инфицирование *Ph. infestans* в растениях картофеля могут синтезироваться *de novo* ингибиторы ферментов, которые способны подавлять активность амилаз [6]. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что предобработка растений СК и ЖК активирует процессы синтеза этих ингибиторов.

Схожие результаты получены нами и при исследовании транскрипционной активности гена ингибитора протеиназы. Так, инфицирование листьев картофеля *Ph. infestans* приводило к двукратному повышению уровня транскрипционной активности гена ингибитора протеиназы уже через 6 ч после инокуляции (рис. 2). Причем такой высокий уровень транскрипционной активности гена ингибитора протеиназы в инфицированных растениях сохранялся на протяжении 48 ч.

Предобработка растений СК и ЖК оказывала значительное стимулирующее действие на активность транскрипции гена ингибитора протеиназы как в незараженных растениях, так и при инфицировании (рис. 3). В варианте с предобработкой СК и ЖК и последующим инфицированием *Ph. infestans* транскрипционная активность гена ингибитора протеиназы через 48 ч после заражения превышала уровень контрольного варианта в шесть раз (рис. 2).

Белки-ингибиторы составляют особую группу пептидов растений, объединяемых общей способностью ингибировать ферментативную активность путем взаимодействия с энзимами с последующим формированием стехиометрического комплекса [7]. Образование ингибиторов протеаз происходит в растении в ответ на инфицирование патогенами и насекомыми-

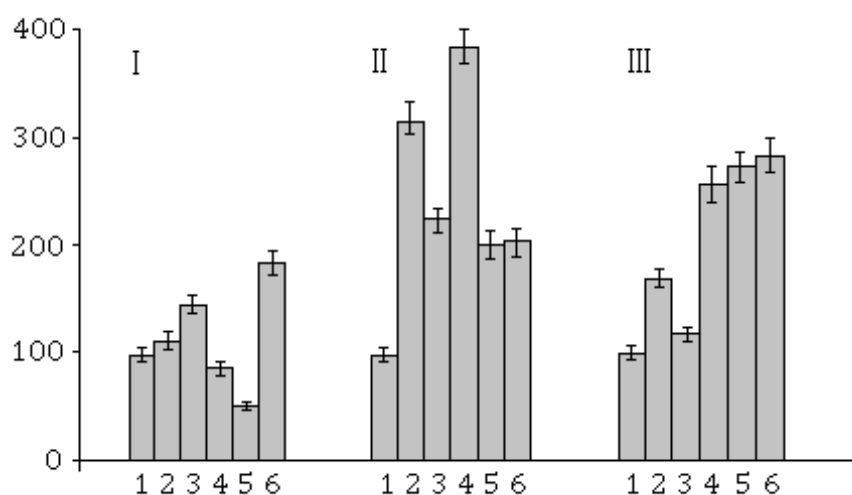


Рис. 1. Изменение транскрипционной активности гена ингибитора амилазы в листьях картофеля под влиянием обработки СК и ЖК и заражения *Ph. infestans*, в % к контролю (100%). 1 - контроль; 2 - *Ph. infestans*; 3 - обработка СК; 4 - СК+ *Ph. infestans*; 5 - обработка ЖК; 6 - ЖК + *Ph. infestans*. I - 6 ч, II - 24 ч, III - 48 ч после инокуляции

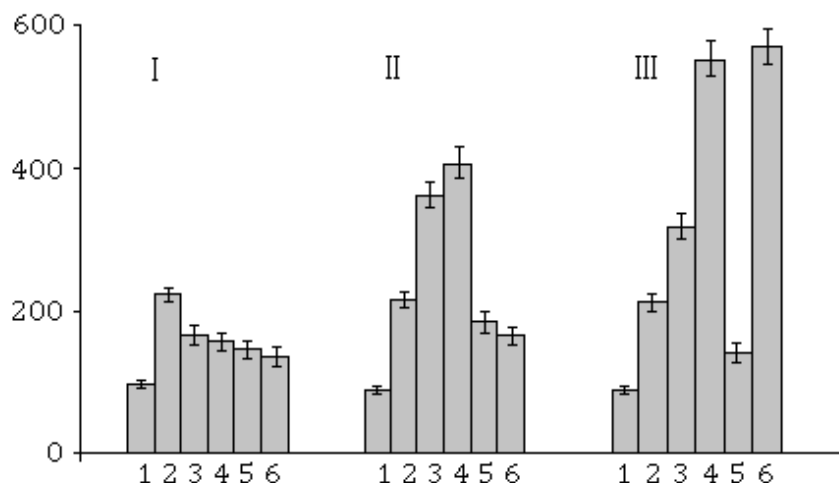


Рис. 2. Изменение транскрипционной активности гена ингибитора протеиназы в растениях картофеля под влиянием обработки СК и ЖК и заражения *Ph. infestans*, в % к контролю (100 %). 1 - контроль; 2 - *Ph. infestans*; 3 - обработка СК; 4 - СК+ *Ph. infestans*; 5 - обработка ЖК; 6 - ЖК + *Ph. infestans*. I - 6 ч, II - 24 ч, III - 48 ч после инокуляции

вредителями [8]. Ингибиторы белковой природы избирательно взаимодействуют с амилазами и образуют неактивные комплексы «амилаза – ингибитор» [9]. Ключевую роль в инициации защитной реакции играет мембранный рецептор системин, белок с молекулярной массой около 160 кДа. Реагируя на поранение, он вызывает деполяризацию мембраны, что приводит к открытию ионных каналов и резкому повышению уровня внутриклеточного содержания ионов кальция. В результате активируются МАР-киназы и фосфолипазы, и в ходе ряда реакций образуется жасмоновая кислота, которая, вероятно, и служит активатором транскрипции генов защитных белков [10].

Полученные данные позволяют говорить о том, что активация синтеза ингибиторов гидролаз в тканях растений картофеля под воздействием СК и ЖК может служить одним из факторов формирования их устойчивости к *Ph. infestans*, в том числе в присутствии H_2O_2 . Это указывает на возможность регуляции активности данной группы соединений путем экзогенных воздействий, в том числе в результате обработки растений индукторами устойчивости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яруллина Л.Г., Ахатова А.Р., Касимова Р.И.

Гидролитические ферменты и их белковые ингибиторы в регуляции взаимоотношений растений с патогенами // Физиология растений. 2016. Т. 63, № 2. С. 205-217.

2. Плотникова Л.Я. Влияние бензотиодазола – индуктора системной приобретенной устойчивости – на патогенез бурой ржавчины пшеницы // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 571-580.

3. Shetty N.P., Jorgensen H.J.L., Jensen J.D., Collinge D.B., Shetty H.S. Roles of reactive oxygen species in interaction between plants and pathogen // Eur. J. Plant Pathol. 2008. V. 121. P. 267-280.

4. Кудрявцева Н.Н., Софьин А.В., Ревина Т.А., Гвоздева Е.Л., Иевлева Е.В., Валуева Т.А. Секретция протеолитических ферментов тремя фитопатогенными микроорганизмами // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. С. 513-521.

5. Яруллина Л.Г., Касимова Р.И., Максимов И.В. Сигнальные молекулы в регуляции защитного ответа растений пшеницы на инфицирование *Septoria nodorum* // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 5, № 5. С. 531-537.

6. Silva T.M., Damasio A.R., Maller A., Michelin M., Squina F.M., Jorge J.A., Teixeira M. Polizeli purification, partial characterization, and covalent immobilization-stabilization of an extracellular α -amylase from *Aspergillus niger* // Folia Microbiol. 2013. V. 58. P. 495-502.

7. Воронкова М.В. Исследование активности ингибиторов протеиназ в листьях картофеля // Защита и карантин растений. 2014. № 10. С. 45-46.

8. Feng T., Nyffenegger C., Hojrup P., Vidal

Melgosa S., Yan K., Ulrik Fangel J., Meyer A.S., Kirpekar F. Characterization of an extension-modifying metalloprotease: N-terminal processing and substrate cleavage pattern of *Pectobacterium carotovorum* // *Prt. Appl Microbiol Biotechnol.* 2014. V. 98 (24). P. 10077-10089.

9. Kalve N.D., Lomate P.R., Hivrale V.K. A proteinaceous thermo labile α -amylase inhibitor from *Albi-*

zia lebeck with inhibitory potential toward insect amylases // *Arthropod – Plant Interactions.* 2012. V. 6. P. 213-220.

10. Яковлева В.Г., Егорова А.М., Тарчевский И.А. Протеомный анализ влияния метилжасмоната на корни проростков гороха // *Доклады академии наук.* 2013. Т. 449. № 2. С. 236-239.



THE INFLUENCE OF SALICYLIC AND JASMONIC ACIDS ON THE ACTIVITY OF INHIBITORS OF HYDROLYTIC ENZYMES IN POTATO PLANTS DURING INFECTION OF *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

© L. Yarullina^{1,2}, G. Burkhanova¹, A. Sorokan¹, V. Tsvetkov², R. Ibragimov², I. Maksimov¹

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

² Bashkir State University,
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

In modern conditions of high anthropogenic load on agroecosystems, the issue of environmentally safe crop production, requiring new approaches to plant protection from pathogens, is acute. Due to studies of the molecular mechanisms of phytoimmunity, it was found that depending on the strategy of feeding the pathogen, plants in response to infection activate various signal systems that provide optimal protection. Salicylic acid (SC) and Jasmine acid (LC) are signal molecules, the mechanism of protective action of which is associated with the induction of the generation of reactive oxygen species (ROS) in plant tissues. These substances, themselves without antimicrobial activity, stimulate protective reactions of plant cells by activating the synthesis of a number of proteins associated with pathogenesis. In this paper, we studied the effect of SC and LC on the resistance of potato leaves to infection with the pathogen *Phytophthora* (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary), the accumulation of H₂O₂ in them and the change in transcriptional activity of genes of hydrolase inhibitors. It was found that the treatment of SC and LC contributed to the increase of potato resistance to *Ph. infestans* and to the accumulation of H₂O₂ and increased transcriptional activity of genes of inhibitors of hydrolases. At the same time, the LC had a more significant stimulating effect on both the production of hydrogen peroxide and the transcriptional activity of the proteinase inhibitor gene.

The data obtained suggest that the activation of synthesis of hydrolase inhibitors in potato plants under the influence of SC and LC can serve as one of the factors of their pH resistance formation. *infestans*, including through enhanced H₂O₂ generation. This indicates the possibility of regulation of the activity of this group of compounds by exogenous influences, including as a result of treatment of plants by inducers of stability.

Key words: potato, *Phytophthora infestans*, hydrolytic enzymes and their inhibitors, salicylic and jasmonic acid, induced resistance.

ИЗВЕСТИЯ УФИМСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

2018. № 3(5)

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

URL: <http://www.sciencerb.ru>

Ответственный секретарь: Н.В. Милицкая

Верстка: Т.И. Лукманов

© Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение Уфимский федеральный исследовательский
центр Российской академии наук (УФИЦ РАН), 2018

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 умещающейся 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 косоугольного 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. 12,4. Уч.-изд. л. 14,1.
Тираж 50 экз. Заказ № _____
Свободная цена

Адрес издателя: 450098, Россия, РБ,
г. Уфа, бульвар Давлеткильдеева, д. 5/2

Отпечатано с готового оригинал-макета

Адрес: _____

