

Министерство образования и науки РФ
Башкирский государственный университет



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

МАТЕРИАЛЫ ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

(ПОСВЯЩЕННОЙ 50-ЛЕТИЮ КАФЕДРЫ
БИОХИМИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ)

25-27 сентября 2013 г.

Уфа
РИЦ БашГУ
2013

УДК 575:577:60
ББК 28.0
С56

*Печатается по решению кафедры биохимии и биотехнологии
ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет»*

Редакционная коллегия:

д.б.н., профессор **Р.И.Ибрагимов** (отв. ред.)
д. б. н., профессор **М.И.Гарипова**
к. б. н. **И.А. Шпирная**
к. б. н. **В.О. Цветков**
к. б. н. **И.А. Умаров**

Современные проблемы биохимии и биотехнологии:

С56 Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием (посвященной 50-летию кафедры биохимии и биотехнологии) – Уфа: РИЦ БашГУ, 2013.—216 с.

В сборнике представлены материалы докладов участников Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы биохимии и биотехнологии». Статьи приводятся в авторской редакции. Авторы несут ответственность за патентную чистоту, достоверность и точность приведенных фактов, цитат, экономико-статистических данных, собственных имен, географических названий и прочих сведений, а также за разглашение данных, не подлежащих открытой публикации.

Издание подготовлено при поддержке гранта РФФИ № 13-04-06088 на проведение конференции.

ISBN 978-5-7477-3307-7

УДК 575:577:60
ББК 28.0

ISBN 978-5-7477-3307-7

© БашГУ, 2013

Оглавление

Ибрагимов Р.И. АКАДЕМИК КОНАРЕВ В.Г. И ПРОФЕССОР АХМЕТОВ Р.Р. - ОСНОВОПОЛОЖНИКИ НАУКИ И ОБРАЗОВАНИЯ В ОБЛАСТИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ В БАШКИРИИ	9
Гилязетдинов Ш.Я., Ибрагимов Р.И., Умаров И.А. О ВКЛАДЕ ПРОФЕССОРА Р. Р. АХМЕТОВА В РАЗВИТИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ	13
ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ	
Беньковская Г.В., Никоноров Ю.М. УСТОЙЧИВОСТЬ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ В ЛАБОРАТОРНЫХ ЛИНИЯХ <i>MUSCA DOMESTICA L.</i> (DIPTERA, MUSCIDAЕ)	18
Виноградов А.В., Резайкин А.В., Ивлева Е.К., Сергеев А.Г. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ДЕТЕКЦИИ МУТАЦИЙ ГЕНА <i>ASXL1</i> ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ МЕТОДОМ ПРЯМОГО АВТОМАТИЧЕСКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ	20
Гилязова И.Р., Кутлыева Л.Р., Павлов В.Н., Халиуллин А.А., Загидуллин А.А., Климентова Е.А., Хуснутдинова Э.К. РОЛЬ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА <i>VHL</i> В РАЗВИТИИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПОЧКИ	23
Дивашук М.Г., Климушина М.В., Карлов Г.И. СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГАПЛОТИПОВ ГЕНА <i>WAXY</i> ПЫРЕЯ СРЕДНЕГО (<i>Thinopyrum intermedium</i>)	26
Ильясов Р.А., Прощалыкин М.Ю., Поскряков А.В., Лелей А.С., Николенко А.Г. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ КИТАЙСКОЙ ВОСКОВОЙ ПЧЕЛЫ <i>APIS CERANA FABRICIUS, 1793</i> НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РОССИИ	29
Каримов Д.Д., Эрдман В.В., Сомова Р.Ш., Насибуллин Т.Р., Мустафина О.Е. ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ <i>ALU</i> -ЭЛЕМЕНТОВ СО СТАРЕНИЕМ	33
Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Юнусбаев Б.Б., Рамазанова Н.Н., Мухтарова Л.А., Загидуллин Ш.З., Эткина Э.И., Хуснутдинова Э.К. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ	35
Кацы Е.И., Петрова Л.П. ПЦР-СКАНИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ БАКТЕРИЙ <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> ДИКОГО ТИПА И ИХ ДЕРИВАТОВ СО СПОНТАННЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ В СТРУКТУРЕ O-АНТИГЕНА	38
Кочешкова А.А., Дивашук М.Г., Крупин П.Ю., Карлов Г.И. КЛОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ <i>VIVIPAROUS-1</i> У ДИКОРАСТУЩИХ СОРОДИЧЕЙ ПШЕНИЦЫ	42

Комахин Р.А., Милюкова Н.А., Комахина В.В., Криницына А.А., Левина Т.А., Жученко А.А. АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ КРОССИНГОВЕРА У ГИБРИДОВ ТОМАТА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ SPO11-1 A. THALIANA И SPO11 S. CEREVISIA, И СЕГРЕГАЦИИ АЛЛЕЛЕЙ СРЕДИ ИХ ПОТОМСТВА	45
Налян А.Г., Ибрагимов Р.И., Ван-Клей Д., Ван-Клей А. ЗАВИСИМОСТЬ СТРУКТУРЫ СООБЩЕСТВ РИЗОСФЕРНЫХ ГРИБОВ ДИКОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ ОТ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК ГЕНОВ 18S-РРНК	50
Пенкин Л.Н., Китаев К.А., Сурина Е.В., Беньковская Г.В. ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ИНСЕКТИЦИДАМ В ПОПУЛЯЦИЯХ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА НА ЮЖНОМ УРАЛЕ	52
Почтовый А.А., Карлов Г.И., Дивашук М.Г. СОЗДАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ НА ГЕНЫ ДРЕВ ПЫРЕЙНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПОВЫШЕНИЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ В ГЕНОМАХ ЗЛАКОВ	56
Хидиятова И.М., Ахмадеева Г.Н., Гилязова И.Р., Байтимеров А.Р., Магжанов Р.В., Хуснутдинова Э.К. МАРКЕРЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА	59
Чемерис А.В. ПОЯВЛЕНИЕ НОВЫХ СКОРОСТНЫХ МЕТОДОВ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК ИЗМЕНИТ ВСЮ БИОЛОГИЧЕСКУЮ НАУКУ	62

МЕДИЦИНСКАЯ БИОХИМИЯ

Аньшакова В.В., Наумова К.Н., Степанова А.В., Васильев П.П. КОМПЛЕКСНЫЕ БАД НА ОСНОВЕ СЕВЕРНОГО БИОСЫРЬЯ В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОМ СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ ФИЗКУЛЬТУРНО-СПОРТИВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ	68
Башкатов С.А., Баязитова А.Р. ВЛИЯНИЕ БОЛЬШИХ ДОЗ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА	72
Гильмутдинова Л.Т., Фархутдинов Р.Г., Маракаева Е.А. УМЕНЬШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕЧЕНОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ У РАБОТНИКОВ, СВЯЗАННЫХ С ВРЕДНЫМИ УСЛОВИЯМИ ТРУДА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ФИТОСБОРА	75
Гарипова М.И., Усманова Р.Р., Ишмухаметов А.А., Габдрахманов А.И. ВЫДЕЛЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ СИНТЕЗА ПРОСТАГЛАНДИНА E2 КОМПЛЕКСА МИКРОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ	78

Гарипова М.И., Усманова Р.Р., Веселов С.Ю., Зинатуллина Л.Р., Шигапова А.И., Новоселова Е.И. ЗАКОНОМЕРНОСТИ ТРАНСПОРТА ГИДРОФИЛЬНЫХ ГОРМОНОВ В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА	79
Даутова А.З., Усманова С.Р., Рыскова А.А., Шамратова В.Г. ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС И ЛИПИДНЫЙ СПЕКТР У ЮНОШЕЙ С РАЗНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ ПОДГОТОВКОЙ	82
Корсун В.Ф., Корсун Е.В., Лахтин М.В. ЛЕКТИНЫ И СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	84
Махмутьева Ю.М., Гиматдинова Е.В., Веселов С.Ю. ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ КОМПЛЕКСЫ АУТОАНТИТЕЛ С АНТИГЕНАМИ ГРУППЫ ПРОГОРМОНА ПРОКАЛЬЦИТОНИНА У ДЕТЕЙ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ	88
Мингазов Р.С., Вахитов А.К., Баширова Р.М., Саяхова И.Д. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЛЯЦИОННОЙ БАЗЫ ДАННЫХ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЗАДАЧ В ГЕПАТОЛОГИИ	91
Орлов А.А., Кустов П.А., Красоткина Ю.В. ФАРМАКОКИНЕТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО КОАГУЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА VII ЧЕЛОВЕКА У КРОЛИКОВ	94
Тимофеев С.М., Степанова А.В., Аньшакова В.В. ВИТАМИН B12 В ЛИШАЙНИКОВОМ СЫРЬЕ И В БИОПРЕПАРАТАХ НА ЕГО ОСНОВЕ	97
БИОТЕХНОЛОГИЯ	
Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф., Лукманова К.А., Кузьмина Л.Ю., Бойко Т.Ф. СИНТЕЗ ЦИКЛИЧЕСКИХ ЛИПОПЕПТИДОВ БАКТЕРИЯМИ VACILLUS SUBTILIS ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ДЕРМАТОМИЦЕТАМИ	100
Бережнева З.А., Шпирная И.А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРУТОВЫХ ГРИБОВ В ФАРМАКОЛОГИИ	104
Бережнева З.А., Бережнев В.Е., Цветков В.О., Шпирная И.А., Ибрагимов Р.И. ПЛОДОВЫЕ ТЕЛА ТРУТОВЫХ ГРИБОВ – ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ АМИЛАЗ	110
Гильманшина К. А. ПРИМЕНЕНИЕ БИОСУРФАКТАНТОВ В НЕФТЯНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ	113
Калимуллина А.Р., Григориади А.С. ВЛИЯНИЕ КОЖНЫХ ВЫДЕЛЕНИЙ RANA RIDIBUNDA НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ И ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРОЙ ЛЕСНОЙ ПОЧВЫ	115

Канюка Е.Ю. КОНЦЕНТРАЦИЯ КРЕАТИНИНА В РАЗНЫХ МЫШЦАХ СВИНЕЙ	118
Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. СОВМЕЩЕНИЕ ДВУХ ПРОЦЕССОВ: ОЧИЩЕНИЕ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЦИТОКИНОВ	120
Кулуев Б.Р. СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С УВЕЛИЧЕННЫМИ И УМЕНЬШЕННЫМИ РАЗМЕРАМИ ОРГАНОВ	123
Кустов П.А., Бодягин В.В., Милехин Д.А., Красоткина Ю.В. ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКООЧИЩЕННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО КОАГУЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА VII ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГИПОПРОКОНВЕРТИНЕМИИ	127
Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алешкин А.В., Афанасьев С.С., Корсун В.Ф. СИСТЕМЫ ПСЕВДОПОЛИСАХАРИДЫ-СВЯЗЫВАЮЩИХ И (ГЛИКО)ОКСИДАЗЫ-СОДЕРЖАЩИХ ФРАКЦИЙ РАСТЕНИЙ МЕДИЦИНСКОГО ЗНАЧЕНИЯ: ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИ РАЗДЕЛЕННЫЕ МЕМБРАННЫЕ ФОРМЫ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЕЙ В ЖИВОМ ИЗОБРАЖЕНИИ	130
Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Алешкин А.В., Байракова А.Л., Корсун В.Ф. АНТИМИКРОБНЫЕ СТРАТЕГИИ НА ОСНОВЕ СИНЕРГИСТИЧЕСКИХ СИСТЕМНЫХ ФАКТОРОВ: ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ АНТИМИКРОБНЫЕ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЛЕКТИНЫ, ФИТОЛЕКТИНЫ, В СОЧЕТАНИИ С АНТИБИОТИКАМИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ	131
Нигматуллина Л.Р., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х. ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПОВЕРХНОСТНОГО АГГЛУТИНИНА PAP A, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩЕГО РИЗОБИИ С КОРНЯМИ РАСТЕНИЙ	135
Нургалева Э.З. МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН CLAVATA3 A. THALIANA	137
Петров В. В. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ PMA1 H ⁺ -АТРАЗЫ ДРОЖЖЕЙ: РОЛЬ ТРАНСМЕМБРАННЫХ СЕГМЕНТОВ M6 И M8	140
Оркодашвили А.М., Вершинина З.Р., Нигматуллина Л.Р., Лутфуллин А.З., Баймиев Ал.Х. СОЗДАНИЕ НОВЫХ АССОЦИАТИВНЫХ СИМБИОЗОВ МЕЖДУ СЛАДКИМ ПЕРЦЕМ И РИЗОБИЯМИ, ОБЛАДАЮЩИМИ ФУНГИСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ	143
Саитова З.Р., Фархутдинов Р.Г. ЛИШАЙНИКОВЫЕ КИСЛОТЫ КАК ВОЗМОЖНЫЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ МАРКЕР В ЛИХЕНОИНДИКАЦИИ	147
Yamaleeva A.A., Usachev S.A., Yamaleev O.A. ON POSSIBLE APPLICATIONS OF THE ELLIPTIC OSCILLATOR MODEL IN A BIOCHEMICAL PROCESS	150

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

Баширова Р.М., Данилова Е.Д., Грицаенко Д.И., Галкин Е.Г., Кудашкина Н.В. БИОГЕННЫЕ ФТАЛАТЫ В РАСТЕНИЯХ – ПОКАЗАТЕЛЬ АКТИВНОСТИ ЭНДОФИТОВ	154
Веселов Д.С., Веселов С.Ю. РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА КЛЕТОК РАСТЯЖЕНИЕМ В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ НАЗЕМНЫХ РАСТЕНИЙ К УСЛОВИЯМ ОБИТАНИЯ	156
Григориади А.С., Гареева А.Р., Лопатин Н.В. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕФТЕШЛАМОВОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ФИТОРЕМЕДИАНТА TAGETES ERECTA L.	160
Данилова Е.Д., Долотовский И.М., Баширова Р.М. ИНТЕНСИВНОСТЬ МИКОРИЗООБРАЗОВАНИЯ ПЯТИЛИСТНИКА КУСТАРНИКОВОГО RENTARHYLLOIDES FRUTICOSA (L.) O.SCHWARZ	163
Зарипова А.А., Манчу Я.В., Фархутдинов Р.Г. ОСОБЕННОСТИ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ARNICA MONTANA L.	167
Иванов Р.С., Вафина Г.Х., Терещенко Л.М., Иванова Э.А. АКТИВНОСТЬ АРГ-Х-ПРОТЕОЛИЗА В СУПРАСТРУКТУРАХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ПРИ ИНДУКЦИИ РОСТОВОГО МОРФОГЕНЕЗА ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ	170
Ласточкина О.В., Ильясова Е.Ю., Широков А.В., Пусенкова Л.И. ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ШТАММОВ BACILLUS SUBTILIS НА ПОКАЗАТЕЛИ РОСТА ПШЕНИЦЫ ПРИ ЗАСОЛЕНИИ СРЕДЫ	172
Миронова Л.Н., Реут А.А., Юлбарисова Р.Р. ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ХОСТА В РЕЗУЛЬТАТЕ ОБРАБОТКИ РЕГУЛЯТОРАМИ РОСТА	175
Колеснева Е.В., Бакакина Ю.С., Дубовская Л.В., Вологовский И.Д. УЧАСТИЕ ЦИКЛИЧЕСКОГО ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА В РЕАЛИЗАЦИИ ДЕЙСТВИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В РАСТЕНИЯХ	178
Курамшина З. М., Смирнова Ю. В., Хайруллин Р. М. ПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ БАКТЕРИЙ BACILLUS SUBTILIS шт. 26Д ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ КАДМИЯ НА РАСТЕНИЯ SINAPIS ALBA	181
Фархутдинов Р.Г., Шафикова В.М. ИСЛЕДОВАНИЕ ФУНГИЦИДНЫХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ И ПРИМЕНЕНИЕ ФИТОСБОРА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АСКОСФЕРОЗА У ПЧЕЛ	186

Умаров И.А., Халиков Р.М., Исаев Р.Ф., Ибрагимов Р.И. ПОЛУЧЕНИЕ ОКСИЛИПИНОВЫХ ФРАКЦИЙ ИЗ СЕМЯН ЛЬНА, СТИМУЛИРУЮЩИХ ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАСТЕНИЙ	189
Феклистова И.Н. ИНДУКЦИЯ УСТОЙЧИВОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР СЕМЕЙСТВА BRASSICACEAE К АЛЬТЕРНАРИОЗУ 1-ОКСИФЕНАЗИНОМ	194
Юмагужина З.М., Шпирная И.А., Цветков В.О., Ибрагимов Р.И. ТОЛЕРАНТНОСТЬ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ И РЖИ К ДЕЙСТВИЮ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ	198
Щербаков А. В., Черепенко Н.Д., Усманов И.Ю. ПЛАСТИЧНОСТЬ СОСТАВА ФЛАВОНОИДОВ, НАКАПЛИВАЕМЫХ РАСТЕНИЯМИ ПОЛЫНИ СОЛЯНКОВИДНОЙ НА СОЛОНЧАКАХ БАШКИРСКОГО ЗАУРАЛЬЯ	201
Щербаков А. В., Федорова Т.П., Усманов И.Ю. ПЛАСТИЧНОСТЬ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ОСНОВНОГО И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО МЕТАБОЛИЗМА РАСТЕНИЙ	203
Ямалеева А.А., Набеева Р.А., Усачев С.А., Гималетдинова Г.С., Газизова Г.Ч., Гайсина Р.А., Ямалеев О.А., Ишмухаметов С.С. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ТОЛЕРАНТНОСТИ РАСТЕНИЙ К ФИТОМИКОПАТОГЕНАМ И ПЕСТИЦИДАМ	206
Умаров И.А., Яруллина Л.М., Ибрагимов Р.И. АНАЛИЗ АГРЕССИВНЫХ СВОЙСТВ ГРИБОВ РОДА <i>FUSARIUM</i> ИЗ РАЗЛИЧНЫХ АГРОБИОЦЕНОЗОВ ЮЖНОГО УРАЛА	210
Авторский указатель	214

**АКАДЕМИК КОНАРЕВ В.Г И ПРОФЕССОР АХМЕТОВ Р. Р. –
ОСНОВОПОЛОЖНИКИ НАУКИ И ОБРАЗОВАНИЯ
В ОБЛАСТИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ В БАШКИРИИ**

Ибрагимов Р.И.

Башкирский государственный университет, г. Уфа

Первые целенаправленные научно-исследовательские работы в области физико-химической биологии на территории нашей Республики начали проводиться в Институте Агробиологии (Институт биологии УНЦ РАН) при Башкирском филиале АН СССР. Организация этих исследований связана с именем В.Г. Конарева, назначенного весной 1956 г. директором этого Института.

Хочу коротко осветить предыдущий путь этого выдающегося ученого и человека, который, несмотря на все трудности и преграды того времени, упорно занимался своим любимым делом.

В.Г. Конарев родился 23 декабря 1915 года в д. Голубовка Оренбургской области. Как пишет он в своих воспоминаниях, биохимией как наукой он увлекся еще в Сорочинском животноводческом техникуме, когда прочитал купленный им по любознательности учебник по биохимии. Он узнал очень много интересного и неожиданного для себя, например, был очень удивлен, что вода – не просто химическое соединение, а сложный меняющийся в зависимости от условий компонент живого вещества. На химико-биологический факультет Куйбышевского педагогического института в 1934 году Василий Григорьевич поступал сознательно и целенаправленно, чтобы заниматься новой малоисследованной областью биологии. Уже в это время проявлялись характерные черты будущего ученого – целеустремленность и упорство в достижении целей. Его, как сдавшего все экзамены на отлично, зачислили на физико-математический факультет, считавшийся наиболее престижным – конкурс на него был высоким. Однако Василий Григорьевич добился, чтобы его перевели на химико-биологический факультет в соответствии его заявлением.

После окончания Института в 1938 году Конарев В.Г. был рекомендован Ученым Советом Института в аспирантуру. В рекомендации было указано, что выпускник обладает знаниями и эрудицией, достойной начинающего молодого ученого. В.Г. решается поступать в аспирантуру ВИРа на специальность «Биохимия». Однако ему отказывают, т.к. конкурс был высокий, а у него не «профильное» педагогическое образование. Василий Григорьевич и в этом случае добивается своего: он предоставляет в дирекцию ВИРа свои студенческие научные работы и положительные отзывы профессоров на них. Большую роль на этом этапе жизни В.Г. сыграл Н.И. Вавилов, возглавлявший тогда ВИР. Он обещал принять в аспирантуру всех претендентов, сдавших биохимию на «отлично». Из 12 человек таких оказалось только двое, в т.ч. и В.Г. Конарев. Вавилов был председателем экзаменационной комиссии и лично участвовал в приеме экзаменов. Именно Вавилов предложил Конареву заняться белками семян зерновых. Как мы знаем, на протяжении всей жизни семена злаковых оставались для него одним из главных и любимых научных объектов.

Василий Григорьевич успешно окончил аспирантуру, подготовил диссертационную работу, но не успел защититься: началась Великая Отечественная война. До 1942 года он находился в блокадном Ленинграде, вместе с другим сотрудниками занимался спасением уникальных коллекций ВИРа. В феврале 1942 он вместе с ВИР был эвакуирован в г. Омск, в мае был призван в армию и стал курсантом военного училища. С января 1943 года Конарев В.Г. воевал на Западном и 1-м Белорусском фронтах. В качестве командира взвода, командира роты Василий Григорьевич был отважным офицером и хорошим командиром для своих бойцов. Он был дважды ранен, четырежды контужен, за личную отвагу и доблесть

награжден боевыми медалями и орденами. Неудивительно, что и в мирное время, при преодолении многочисленных жизненных препятствий, Василий Григорьевич проявлял решительность и храбрость, присущую только боевым офицерам.

После демобилизации в ноябре 1945 года Конарев В.Г. был направлен на работу в Крым – в Никитский ботанический сад. В июне 1946 года в Одесском госуниверситете состоялась защита кандидатской диссертации, которая была подготовлена еще до войны. В сентябре 1946 года он возвращается в родной Оренбург, где работает в педагогическом университете заведующим кафедрой ботаники и проректором по научной работе. Именно в этот период Василий Григорьевич начинает разрабатывать идеи о роли нуклеиновых кислот в морфогенетических процессах, о связи структурного состояния этих молекул с функциональным состоянием органоидов клетки. В его докторской диссертации, защищенной 1954 году в Институте биохимии им. А.Н. Баха АН СССР, на защиту выносятся новые, революционные для этого времени представления о том, что основные функции нуклеиновых кислот могут реализоваться только с участием белковых молекул. Эти идеи о физиологической роли нуклеиновых кислот были опубликованы и в первой его монографии «Нуклеиновые кислоты и морфогенез растений», вышедшей в издательстве «Высшая школа» в 1959 году. Автором подчеркивается первостепенная значимость нуклеиновых кислот в биосинтезе белков, их постоянное взаимодействие с белками ядра и цитоплазмы.

Талант Василия Григорьевича как ученого-исследователя и организатора научных исследований и образовательного процесса в полной мере проявляется в уфимский период его жизни. В 1956 году он был назначен директором Института агробиологии (впоследствии Института биологии) Башкирского филиала АН СССР. До этого времени сотрудники Института занимались прикладными агрономическими исследованиями. Перед Конаревым В.Г. стояла задача создания научно-исследовательского учреждения, позволяющего проводить фундаментальные биологические исследования. В первый же год пребывания он организовал в Институте лабораторию биохимии и цитохимии растений, которая впоследствии стала Отделом. Были внесены коррективы в планы и стиль работы сотрудников Института. Необходимо было преодолеть «нуклеинобоязнь», которая была тогда распространена у ученых-биологов и партийных администраторов. За короткое время Василий Григорьевичу удается это сделать. В этот период он занимается не только научно-организационной работой, но и проводит «агитационную» работу по внедрению новых идей среди ученых - специалистов сельского хозяйства, административных работников. В частности, в 1958 году он выступает на I съезде специалистов сельского хозяйства Башкирской АССР, где доказывает необходимость внедрения научных достижений в практику сельского хозяйства. Институт периодически издает тематические сборники по результатам исследований: «Вопросы биологии, физиологии и биохимии кукурузы» (1958 г); «Биология нуклеинового обмена у растений» (1959 г); Биохимия и физиология формирования урожая кукурузы (1960 г).

В 1961 году Башкирский филиал АН СССР был расформирован, и Отдел биохимии и цитохимии был передан в Башкирский госуниверситет. Василий Григорьевич становится заведующим Отделом и начинает работы по организации соответствующей кафедры. Официально кафедра биохимии цитохимии была утверждена приказом Минобразования РСФСР в 1963 году.

С появлением кафедры активизируются работы по разработке учебников, учебных пособий, программ лабораторных и лекционных занятий. В 1966 г. в издательстве Высшая школа выходит учебник «Цитохимия и гистохимия растений», которая стала настольной книгой для многих поколений студентов и аспирантов. Это книга была составлена на основе лекций, читаемых Конаревым В.Г. на биологическом факультете БашГУ. Как раз в этот период Уфа стала ведущим научным центром в СССР по исследованию нуклеиновых кислот

растений. Неслучайно первые три конференции (1958, 1962, 1966 гг.) по нуклеиновым кислотам были организованы и проведены в г. Уфа под руководством Конарева В.Г. Эти конференции сыграли огромную роль в дальнейшем развитии научных исследований по биохимии растений и явились основой для развития новой науки – молекулярной биологии. Так, вопросами, разработка которых открывала огромные перспективы, на конференции были названы: механизмы регуляции биосинтеза ДНК и РНК, регуляция функциональной активности этих молекул; механизмы влияния факторов внешней среды на нуклеиновый обмен и морфогенетическую функцию НК.

В 1967 году, по решению Президиума АН СССР, Василий Григорьевич возвращается в ВИР, в Ленинград, где ему поручается инициировать и возглавить исследования по биохимии и молекулярной биологии. Он возглавляет новую, созданную им лабораторию «Белка и нуклеиновых кислот», которая впоследствии вырастает во всемирно-известный Отдел молекулярной биологии ВИРА.

В г. Уфа научное направление продолжают коллеги (Курамшин Г.С., Амирханов С.Н.) и многочисленные ученики В.Г. Конарева: Ахметов Р.Р., Гилязетдинов Ш.Я., Сердюк Л.С., Юмагужина Х.А., Милицкая М.Ф., Вахитов В.А., Ямалеев А.М., Шаяхметов И.Ф., Ямалеева А.А., Ивлева Л.А., Камалетдинова М.А., Иштирякова Ф.К.

Заведующим Отделом биохимии и цитохимии, зав. кафедрой биохимии и цитохимии в Университете становится один из талантливых учеников Конарева В.Г. – Ахметов Радик Рахимьянович.

Ахметов Р.Р. родился 3 марта 1933 года в д. Улькунды Дуванского района БАССР. После окончания школы учился в Дуванском сельскохозяйственном техникуме и работал агрономом в Дуванском и Бирском районах БАССР. В 1955-1959 гг. учился и окончил с отличием Башкирский сельскохозяйственный институт с присвоением квалификации «агроном-ученый». Весь последующий период жизни Радика Рахимьяновича связан и посвящен научной деятельности и подготовке научно-педагогических кадров в Башкирском государственном университете и в институтах Академии наук.

После окончания института он стал первым уфимским аспирантом профессора В. Г. Конарева. В 1963 году защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему «Физико-химическое состояние РНК в растительной клетке». Необходимо отметить, что Радик Рахимьянович внес огромный вклад в официальное признание физико-химической биологии в нашей республике, в сохранение и поступательное развитие созданного научного Отдела биохимии и цитохимии, кафедры биохимии и цитохимии БашГУ. Как известно, в 50-60 годы XX века биологическая наука в СССР переживала тяжелый период вследствие политического и административного насаждения так называемой «Мичуринской биологии» академика Т.Д. Лысенко. После отъезда в Ленинград авторитетного В.Г. Конарева в Уфе неоднократно предпринимались попытки ликвидации ОБЦ и, соответственно, кафедры как самостоятельных научно-образовательных структур под надуманным предлогом исключительной фундаментальности исследований без практических разработок для сельского хозяйства. Ахметов Р.Р., как очень хороший советский функционер, с помощью руководства вновь организованного Башкирского филиала АН СССР добивается в Москве сохранения Отдела биохимии и цитохимии в составе БФ АН СССР как отдельного научного подразделения. В это время закладывается фундамент стратегического развития ОБЦ, позволившего превратить это учреждение в один из ведущих Институтов РАН в области физико-химической биологии в нашей стране. Как известно, в 1999 году этот отдел, под руководством еще одного выдающегося ученика В.Г. Конарева, академика В.А. Вахитова, был реорганизован в Институт биохимии и генетики УНЦ РАН.

Несмотря на занятость административно-организационной деятельностью, в этот период Ахметов Р.Р. интенсивно занимается исследовательской работой. В 1975 году он защищает диссертацию на степень доктора биологических наук на тему «Структурная организация и функциональная активность хроматина клеточных ядер растений». Эта работа явилась одной из пионерских диссертаций в Советском Союзе в области молекулярной биологии, хотя эта специальность в биологии в то время еще официально не была оформлена.

Научные исследования Р.Р. Ахметова отличались оригинальностью, актуальностью, фундаментальностью. Главное его внимание и научные интересы были сосредоточены на изучении структурной и функциональной организации нуклеопротеидных надмолекулярных структур, составляющих основу всего живого. Большинство его работ в этом плане являлись поисковыми, пионерскими. В частности, Ахметовым Р.Р. были получены электронно-микроскопические снимки организации ядерного материала, которая впоследствии получила название «нуклеосомы». Не удивительно, что многие идеи, замыслы Радика Рахимьяновича имели весьма плодотворное продолжение в научных трудах отечественных и зарубежных ученых. Благодаря усилиям Радика Рахимьяновича, его опыту, организаторским способностям, научному предвидению кафедра биохимии и биотехнологии в настоящее время является одним из ведущих центров подготовки специалистов в области физико-химической биологии. За 50 кафедра выпустила более 1000 специалистов, около 100 из них защитили кандидатские диссертации, более 30 выпускников стали докторами наук. Многие из них в настоящее время возглавляют научные направления в научно-исследовательских и образовательных учреждениях нашей страны и за рубежом: Ямалеев А.М., Чемерис А.В., Хуснутдинова Э.К., Кудоярова Г.Р., Шакирова Ф.М., Мустафина О.Е., Ахунов Э.Д., Мартынова А.В. и др.

Радик Рахимьянович пользовался огромным авторитетом в научном сообществе. Наряду с Конаревым В.Г. и Вахитовым В.А. он по праву он считается одним из организаторов исследований по экспериментальной биологии в Республике Башкортостан, особенно по ее перспективным направлениям, таким как клеточная и молекулярная биология, молекулярная генетика, биотехнология. В настоящее время исследования по этим направлениям получили широкое развитие в институтах УНЦ РАН, АН Республики Башкортостан, РАСХН, в ВУЗах Республики.

Р.Р. Ахметов – автор ряда методов и методических разработок, руководств по микротехнике, цитохимии, биотехнологии. По результатам исследований им опубликовано в соавторстве около 200 работ, в т.ч. несколько монографий, более 13 изобретений и патентов. Он был одним из организаторов Уфимского отделения Всесоюзного общества биохимиков и Башкирского отделения Всесоюзного общества генетиков, селекционеров им. Н.И. Вавилова.

УДК 574.3:575.2

**О ВКЛАДЕ ПРОФЕССОРА Р. Р. АХМЕТОВА В РАЗВИТИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ
О БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ
РАСТЕНИЙ**¹Гилязетдинов Ш.Я., ²Ибрагимов Р.И., ²Умаров И.А.¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа²Башкирский государственный университет, г. Уфа

Глобальные климатические изменения и сопряженные с ними техногенные процессы заставляют посмотреть на проблему онтогенетической адаптации культурных растений по новому, с учетом достижений молекулярной биологии в исследовании механизмов эпигенетической изменчивости. Как известно, эпигенетическая изменчивость – это общебиологическое явление. Если вкратце рассмотреть суть этого феномена на растениях, то заключается оно в том, что под воздействием определенного экологического фактора (биотической, абиотической, в т.ч. и техногенной природы) изменяется функциональная активность геномов ряда особей в популяциях растений.

Термин «эпигенетика» был предложен К. Уоддингтоном еще в 1947 году и означал «ветвь биологии, изучающую причинные взаимодействия между генами и их продуктами, образующими фенотип» [Малецкий, 2009]. Эпигенетика в первоначальном смысле включала в себя исследование клеточной дифференцировки и морфогенеза. Именно это направление биологической науки в середине XX века начало бурно развиваться в Уфе благодаря, в первую очередь, фундаментальным исследованиям академика В.Г. Конарева, при поддержке выдающихся биологов А.Н. Белозерского и А.П. Генкеля.

В дальнейшем, по мере развития молекулярной биологии, в научный термин «эпигенетика» стали вкладывать иной смысл. Основное понятие эпигенетики – эпиген (эпиаллель) – наследственная единица (циклическая система генов), имеющая не менее двух режимов функционирования подчиненных ей генов и способная сохранять каждый из режимов в последовательном ряду поколений микроорганизмов. Как считает проф. Р.Н. Чураев, ген (аллель) может находиться в двух состояниях: активном и неактивном, и переход гена из одного состояния в другое не обусловлен изменениями его первичной структуры [Чураев, 2006].

В настоящее время ученые располагают рядом моделей с эпигеномной изменчивостью, выражающейся в изменениях ростовой активности надземных органов растений. Например, в экспериментах А. Дарранта [Богданова, 2005] со льном показано, что определенные дозы удобрений, при соответствующих условиях выращивания, вызывают появление мощных высокорослых растений (большой генотроф). Различия размеров сохранялись в последующих поколениях. Установлено также, что обработка семян растений мягкой яровой пшеницы водными растворами никотиновой кислоты индуцирует у пшеницы появление наследуемых эпигеномных изменений, выражающихся в появлении во втором и последующих после обработки поколениях мощных и высокорослых растений с крупным продуктивным колосом. Такие измененные растения остаются стабильны на протяжении более 50 поколений [Богданова, 2005].

В формировании эпигеномной изменчивости большую роль играют и внутренние факторы, определяющие параметры этой изменчивости. К внутренним факторам относятся:

1. Дозовые эффекты генов и амплификации.
2. Стадии развития растения, сопряженные с этапами до и после яровизации.
3. Способы размножения растений.

Так, показано, что генотрофы льна отличаются от исходного сорта повышенным содержанием в

клетках ДНК, а также увеличением количества повторяющихся последовательностей ДНК [Кирикович, 2005].

Одним из первых ученых в нашей стране, привлечших внимание к физиологической роли дозовых эффектов генов и амплификации у культурных растений, и был Радик Рахимьянович Ахметов. Именно благодаря его инициативе ряд ведущих научных сотрудников Отдела биохимии и цитохимии БФ АН СССР и кафедры биохимии и биотехнологии БашГУ многие годы активно занимались проблемой повторяющихся нуклеотидных последовательностей ДНК. В 1965 г. В.Г. Конарев, Ш.Я. Гилязетдинов, В.С. Тютюрев в журнале ДАН опубликовали по рекомендации академика А.Н. Белозерского статью, в которой были представлены данные о разном уровне метилирования цитозина в отдельных фракциях ДНК дифференцирующихся тканей и органов растений.

В настоящее время признано, что в основе эпигенетической изменчивости лежит суперметилирование цитозиновых остатков ДНК, причем не всегда в функционально объяснимых местах локализации генов. Соответственно, при использовании эпимутагена 5-азациитидина растения, наоборот, в отличие от эпимодификаций в виде гигантизма, образуют карлики, меняются характеры цветения, ветвления и морфозов. По данным В.А. Зинченко при постоянной обработке посевов ярового ячменя и пшеницы гербицидами растения становятся менее отзывчивыми на внесение минеральных удобрений и одновременно более устойчивыми к действию неблагоприятных абиотических факторов, сопровождающихся заметным снижением урожая [Зинченко, 2002]. После определенной паузы с обработкой посевов гербицидами исходная чувствительность растений к удобрениям восстанавливается. Однако оказалось, что пшеница менее подвержена действию таких факторов, чем культура ярового ячменя, что связано, вероятно, с полиплоидным характером пшеницы. Сходные эффекты обнаружены в последние годы и при совместном действии на растения токсического тяжелого металла кадмия и УФ-облучения [Зинченко, 2002].

Но самые важные приоритетные исследования, раскрывающие молекулярно-биологические механизмы эпигенетической изменчивости, были выполнены Р.Р. Ахметовым совместно с Э.А. Ивановой еще в 70-80-х годах прошлого века. В этих «пионерских» работах, выполненных с использованием метода радиоактивной метки, было установлено, что гистоновые и негистоновые белки хроматина растений в процессе дифференциации тканей растений модифицируются за счет включения ацетильных, фосфорильных и других групп. Следовательно, такие молекулярно-биологические механизмы, как модификация части нуклеотидов ДНК и аминокислотных остатков белков имеют прямое отношение к явлению активной эпигенетической изменчивости, особенно у растений. Совершенно неслучайно наибольшее содержание 5-метилцитозина в составе ДНК обнаружено именно у растений, характеризующихся неподвижным образом жизни и повышенными адаптивными свойствами.

На основании вышеизложенного можно прийти к актуальному для растениеводства заключению. В современных условиях для повышения устойчивости культурных растений к действию неблагоприятных факторов среды целесообразно новые, экологически пластичные сорта сельскохозяйственных культур возделывать как с использованием антистрессовых препаратов, так и на фоне воздействия в семеноводческом процессе соответствующих агrobiотехнологических мероприятий.

Как видно, фундаментальные открытия, связанные с деятельностью выдающихся ученых, находят применение на практике через определенный промежуток времени, и не всегда современники своевременно способны оценить значимость вклада этих ученых.

Литература

1. Малецкий С.И. Семантическая структура понятий «наследственность» и «эволюция» .- Вавиловский журнал генетики и селекции. -2009. Т. 13. № 4. С. 820-852.
2. Чураев Р.Н. Эпигенетика: генные и эпигенные сети в онто- и филогенезе. - Генетика. 2006. Т. 42. № 9. С. 1276-1296.
3. Богданова, Е. Д. Эпигенетическая изменчивость, индуцированная никотиновой кислотой, у *Triticum aestivum* L . - Эпигенетика растений / Ин-т цитологии и генетики Сиб. Отд. РАН. - Новосибирск. 2005. - С.176 -183
4. Кирикович С.С., Левитес Е.В. Факторы, влияющие на эпигенетическую изменчивость у растений. - Эпигенетика растений / Ин-т цитологии и генетики Сиб. Отд. РАН. - Новосибирск. 2005. - С. 144-161
5. Зинченко В.А. О потенциальных скрытых потерях урожая при применении гербицидов на зерновых культурах // Агро XXI. М., 2002. №2. с.2-3

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 575:613.98

УСТОЙЧИВОСТЬ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ В ЛАБОРАТОРНЫХ ЛИНИЯХ *MUSCA DOMESTICA* L. (DIPTERA, MUSCIDAE)

Беньковская Г.В., Никоноров Ю.М.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Одним из условий поддержания эффективной численности и благополучия популяций в изменяющихся условиях окружающей среды является наличие многокомпонентной сбалансированной внутренней структуры. Однако даже и в относительно стабильных условиях существования лабораторных популяций также действуют те или иные формы отбора, под давлением которых формируется и трансформируется генетическая и фенотипическая структура. Моделирование давления отбора позволяет исследовать процессы динамики популяционной структуры.

Давление отбора в любом направлении вызывает противодействие со стороны популяции как единого целого [Северцов, 2007], т.е. комплекс реакций, направленных на сохранение популяционной структуры. Мы анализировали эти процессы в лабораторных линиях комнатной мухи, производных от линии *Cooper*. Анализ показателей приспособленности показал, что в составе исходной линии сосуществуют группы особей, различающиеся по продолжительности жизни и срокам массовой репродукции.

Лабораторная линия *S*, взятая нами для селекции, имеет высокий уровень полиморфизма. В ее составе удалось выделить не менее 6 групп особей по характеру реакции на стрессовые воздействия. Доля их в структуре популяции варьирует [Беньковская, 2009]. В этой линии была обнаружена и дифференциация по таким показателям приспособленности, как продолжительность жизни и сроки массовой репродукции.

Это проявление подразделенности популяции значительно облегчило проведение наших экспериментов по выделению линий с различной продолжительностью жизни с применением селекции на раннее и позднее репродуктивное усилие, сопряженное, как было показано в работах других исследователей [Reed, Bryant, 2004], с продолжительностью жизни. Метод массового отбора позволил сохранить высокую жизнеспособность линий Sh_{gen} и L_{gen} . Показатели приспособленности (плодовитость, выживание потомства, время развития) на начальных этапах селекции между этими линиями, уже различающимися между собой по продолжительности жизни, не отличаются достоверно от исходной линии [Беньковская, Мустафина, 2012]. Отбор на раннее и позднее репродуктивное усилие позволил выделить гетерогенные линии Sh_{gen} и L_{gen} , для которых максимальная продолжительность жизни в 30-м поколении составляла соответственно 44 и 75 суток.

Для закрепления признака продолжительности жизни в селектируемых линиях проводили индивидуальный отбор. Методом индивидуального отбора по укороченной либо увеличенной продолжительности жизни имаго потомства пар, выбранных из этих линий, созданы инбредные линии *Sh 28* и *L 2* с максимальной продолжительностью жизни в 30-м поколении 38 и 68 суток.

Результаты скрещивания в индивидуальных парах показали, что до 20-го поколения дожили только 2 линии: *Sh28* и *L2*. Эти линии поддерживаются вплоть до 50-го и 40-го поколения соответственно. Причиной такой низкой эффективности скрещивания может являться высокий уровень полиморфизма по иммунохимическим, физиологическим и генетическим параметрам, проявившийся в несовместимости партнеров и наличии генетического груза.

Причиной отсутствия потомства в некоторых парах (11 из 30 пар линии Sh_{gen} и 6 из 25 пар из линии L_{gen} соответственно) могла быть стерильность одного или обоих партнеров, либо их несовместимость. Линии, давшие мало жизнеспособное потомство, погибшее на ранних стадиях онтогенеза, по всей видимости, генетически отягощены.

Гибель потомства в последующих поколениях большинства пар предположительно является следствием того факта, что исходные генотипы в этих парах не могут сформировать полноценный генотип, способный в состоянии инбридинга поддерживать высокую жизнеспособность. При инбредном размножении как выявляется эффект присутствия скрытых до того полуплетальных мутаций, так и индуцируется появление новых мутаций вследствие повышения нестабильности генома, проявляющегося в увеличении частоты внутри- и межхромосомных обменов и вспышках размножения мобильных элементов [Пасюкова, Гвоздев, 1986; Коваленко и др., 2006].

Анализ данных по продолжительности жизни в 20 поколениях гетерогенных и инбредных линий показал, что в их составе сохраняется определенная доля особей с альтернативным выражением признака: в линиях с короткой жизнью обнаружено от 3% (Sh_{28}) до 16% (Sh_{gen}) особей, способных прожить более 30 суток, а в линиях долгоживущих выявлено от 6% (L_{2}) до 33% (L_{gen}) особей, погибающих в течение 10 суток со дня выхода из пупария.

Доказательства накопления генетических различий в процессе селекции между линиями Sh и L были получены уже в экспериментах по выявлению их устойчивости к инсектицидам, реакции на тепловой и световой стресс [Беньковская 2010]. Молекулярно-генетический анализ подтвердил наличие генотипических различий линий Sh_{28} и L_{2} как между собой, так и с исходной линией. Последующий анализ данных о продолжительности жизни в течение 20-го -30-го поколений позволил выявить изменения структуры линий, ведущие к «размыванию» фенотипа (колебания средних значений продолжительности жизни) и к увеличению внутри каждой линии числа групп, различающихся по этому показателю, как в инбредных, так и в гетерогенных линиях. Показатели размаха изменчивости продолжительности жизни позволяют сделать заключение о поддерживаемом высоком уровне изменчивости признака во всех селектируемых линиях. Данные определения числа копий транспозона *Hermes* в инбредных линиях Sh_{28} и L_{2} и исходной линии S дают основание считать вспышку транспозиционной активности одним из источников генерации изменчивости в линиях. Реципрокные скрещивания особей из инбредных линий показали наличие ассортативности при спаривании. Мы считаем, что основными механизмами реализации компенсаторных реакций при отборе по репродуктивному усилию и продолжительности жизни становятся: 1) проявления ассортативности при спаривании, обеспечивающие своего рода репродуктивную изоляцию генетически различных групп, и 2) генерация изменчивости, немалую роль в которой следует отвести активности мобильных элементов генома. Противоположностью направленному (движущему) отбору становятся в лабораторных селектируемых линиях отбор стабилизирующий, элиминирующий неадаптивные отклонения от нормы реакции, и частотнозависимый отбор, направленный на сохранение в структуре популяций малых групп и повышение ценности их генетического вклада.

Литература

1. Беньковская Г. В. Стресс-реакция как механизм реализации адаптивного потенциала особей и популяций насекомых: Дис. докт. биол. наук. Уфа, 2008. С. 243–250.
2. Беньковская Г. В. Возможности и ограничения изменений продолжительности жизни в лабораторном эксперименте // Успехи геронтологии. 2010. Т. 23. №3. С. 442-446.

3. Беньковская Г.В., Мустафина Р.Ш. Выявление новой сцепленной с полом мутации ломкости крыльев (fw) у *Musca domestica* L. с зависимой от возраста экспрессивностью // Генетика. 2012. Т. 49. № 2. С. 266-269.
4. Коваленко Л.В., Захаренко Л.П., Волошина М.А., и др. Поведение транспозонов hobo и P в нестабильной линии *yellow 2-717 Drosophila melanogaster* и ее производных после скрещиваний с лабораторной линией // Генетика. 2006. Т.42. №6. С. 1-9.
5. Пасюкова Е.Г., Гвоздев В.А. Особенности распределения мобильных генетических элементов в хромосомах особей из природных популяций *Drosophila melanogaster*. // Генетика. 1986. Т. 22(12): 2813-2818.
6. Северцов А.С. Эволюционный стазис и прогрессивная эволюция // Мат. Конф. К 100-летию Гос. Дарвиновского музея. Современные проблемы биологической эволюции. Москва, 17-20 сентября 2007 г. М. 2007. С. 70.
7. Reed D. H., Bryant E. H. Phenotypic correlations among fitness and its components in a population of the housefly // J. Evol. Biol. 2004. Vol. 17. № 4. P. 919–923.

УДК: 616-006.446.8

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ДЕТЕКЦИИ МУТАЦИЙ ГЕНА ASXL1 ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ МЕТОДОМ ПРЯМОГО АВТОМАТИЧЕСКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Виноградов А.В., Резайкин А.В., Ивлева Е.К., Сергеев А.Г.

ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздрава России

Актуальность

Мутации гена ASXL1 являются одним из наиболее распространенных вторичных генетических событий при острых лейкозах и миелодиспластическом синдроме, обуславливающих неблагоприятный прогноз и рефрактерность к проводимому лечению [1-4]. Однако, технология детекции этих мутаций, оптимизированная для использования в практическом здравоохранении, пока не разработана, что исключает возможность выполнения полноценной прогностической стратификации таких пациентов на этапе генодиагностики, и, следовательно, затрудняет назначение адекватного химиотерапевтического лечения и оценку риска при планировании трансплантации костного мозга с использованием HLA-совместимого родственного либо неродственного или гаплоидентичного донора.

Цель работы – разработать технологию детекции мутаций гена ASXL1 при острых миелоидных лейкозах (ОМЛ) с использованием метода прямого автоматического секвенирования.

Материалы и методы исследований

Исследованы пробы костного мозга и периферической крови 6 больных ОМЛ в возрасте от 21 до 67 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2012 по 2013 г. Среди них присутствовали следующие морфологические варианты ОМЛ по FAB-классификации: M1, M2, M3, M4, M5, M7 (по одному случаю).

Выделение тотальной РНК проводили методом лизиса клеток с последующим связыванием РНК из раствора с мембраной (силикой) в миницентрифужной колонке при

соответствующей ионной силе с помощью комплекта реагентов "QIAamp RNA Blood Mini Kit»" (QIAGEN, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для проведения реакции обратной транскрипции, с целью получения кДНК на матрице иРНК, использовали ревертазу М-MLV и гексануклеотидные праймеры со случайной последовательностью нуклеотидов ("РЕВЕРТА-Л", ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Целевой участок гена ASXL1 (начальную часть экзона 13, кодирующего богатый глицином участок белка, с прилегающими областями общей протяженностью 1229 п.н.) клонировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в виде одного фрагмента с использованием пары праймеров ASXL-F и ASXL-R (таблица). Позиции всех нуклеотидов указаны относительно начала кодирующей части гена ASXL1 человека (NM_015338, GeneBank).

Таблица

Праймеры, разработанные для амплификации и секвенирования
 целевой части гена ASXL1

Название праймера	Последовательность	Позиция праймеров
ASXL-F	5' CCG GCT TGA AGA TCG TCA 3'	1620 - 1637
ASXL-R	5' GAC CCT CCT CAG CTG TCA AAT C 3'	2827 - 2848
ASXL-S1	5' ACA CCG AAA AGC CAC AGC 3'	1667 - 1684
ASXL-S2	5' ATG GTG GTG AGG CCT GTG 3'	2000 - 2017
ASXL-S3	5' GAG GGG TGG GAG CAG CTT 3'	2795 - 2812

Для проведения ПЦР готовили смесь, включающую следующие компоненты: 4 ед. ДНК-полимеразы ("ДиаТак", ЦНИИ эпидемиологии, Москва), 2 mM смесь dNTP, 10 pM каждого из двух праймеров, реакционный буфер. ПЦР проводили по следующей схеме: 1 цикл - 95°C – 15 минут; 42 цикла - 95°C – 10 секунд, 56°C – 20 секунд, 72°C – 70 секунд и заключительный цикл - 72°C – 10 минут. Для анализа продуктов амплификации использовали электрофорез в 2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

Секвенирование ДНК [5] проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) с использованием реакционной смеси ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.0 по прямой и обратной последовательностям с использованием праймеров ASXL-S1, ASXL-S2 и ASXL-S3 (таблица). Реакцию терминации проводили по следующей схеме: 1 цикл - 95°C – 5 минут и 25 циклов - 95°C – 10 секунд, 60°C – 2 минуты. Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот проводили с использованием компьютерной программы MEGA, версия 5.0.

Также в исследуемой группе всем пациентам выполнен цитогенетический и/или молекулярно-генетический анализ (детекция химерных генов AML1-ETO, CBFB-MYH11, PML-RARA, BCR-ABL) [6]. Кроме того, во всех пробах с использованием технологии прямого автоматического секвенирования на наличие мутаций исследованы экзоны 12-15 и 19-21 гена FLT3, экзоны 9-12 гена NPM1, экзоны 4-11 гена TP53. Во всех пробах, за исключением морфологического варианта М3, исследованы экзоны 18-26 гена DNMT3A, экзоны 7-12 и 16-19 гена KIT, экзон 11 гена TET2, экзоны 6-9 гена WT1 [7]. Также определяли уровень относительной экспрессии генов мРНК генов FLT3 и WT1 методом ПЦР в реальном времени относительно уровня экспрессии референсного гена с-ABL.

Результаты исследования и их обсуждение

Точечная мутация в экзоне 13 гена ASXL1 выявлена в одной пробе при ОМЛ М4 и представляла собой однонуклеотидную инсерцию гуанина по 1935 позиции от начала кодирующей последовательности первого транскрипционного варианта (NM_015338, GeneBank). Выявленная мутация приводила к сдвигу рамки считывания (фрейм-шифт) и трансляции укороченного, функционально неполноценного белка. При этом, в этой же пробе определялась несинонимичная трансверсия С215G в экзоне 4 гена TP53, внутренняя тандемная дупликация кодирующей последовательности юкстамембранного домена гена FLT3, а также несинонимичная транзиция А5284 в экзоне 11 гена TET2, также ассоциированные с неблагоприятным прогнозом. Кариотип лейкозных клеток соответствовал 47, XY, +8 [11] / 46, XY [9] (неблагоприятный прогноз), при этом химерные транскрипты генов AML1-ETO, CBFB-MYH11 и BCR-ABL методом ПЦР выявлены не были. Уровень относительной экспрессии мРНК гена FLT3 составил 23,2%, WT1 – 2,1%.

Таким образом, в описанном случае ОМЛ М4 имело место сочетание неблагоприятных цитогенетических (трисомия хромосомы 8) и молекулярно-генетических прогностических факторов (функционально значимые мутации генов ASXL1, FLT3, TET2, TP53), что на клиническом уровне проявилось резистентностью опухоли к проводимой полихимиотерапии и смертью пациента. Одновременное выявление указанных генетических аномалий свидетельствует, по-видимому, об эволюции лейкозного клона, несущего «условно-иницирующую мутацию», за счет накопления дополнительных молекулярных повреждений, что обусловило снижение эффективности стандартной полихимиотерапии и неблагоприятный прогноз ОМЛ [1-4].

Заключение

Таким образом, разработанная тест-система позволяет эффективно определять точечные мутации гена ASXL1 на этапе генодиагностики ОМЛ с использованием технологии прямого автоматического секвенирования. При этом, наряду с однонуклеотидной инсерцией в экзоне 13 гена ASXL1, в единственной положительной пробе определялись мутации генов FLT3, TET2, TP53 и количественные хромосомные aberrации (трисомия хромосомы 8), что может свидетельствовать об эволюции лейкозного клона посредством накопления дополнительных генетических повреждений и обуславливает снижение эффективности стандартной полихимиотерапии и неблагоприятный прогноз ОМЛ.

Литература

1. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia / Y. Ishikawa, H. Kiyoi, A. Tsujimura et al. // *Eur. Journal of Haematology*. – 2009. – Vol. 83. – P. 90–98.
2. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature / A. Renneville, C. Roumier, V. Biggio et al. // *Leukemia*. – 2008. – Vol. 22. – P. 915–931.
3. Myeloid malignancies: mutations, models and management / Murati A., Brecqueville M., Devillier R. et al. // *BMC Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – P. 304.
4. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2011. – Vol. 4. – P. 36.
5. Секвенирование ДНК / А.В. Чемерис, Э.Д. Ахунов, В.А. Вахитов. – М.: Наука, 1999. – 429 с.
6. Виноградов А.В. Клинико-диагностическое значение генетических аномалий при программном лечении острого миелобластного лейкоза / А.В. Виноградов. Дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук. – Екатеринбург, 2009. – 114 с.
7. Виноградов А.В. Разработка технологии детекции мутаций генов CDKN2A/ARF, FLT3,

KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 при острых миелоидных лейкозах / А.В. Виноградов // Материалы Российской научно-практической конференции с международным участием «Новые методы в онкологической практике», 25-26 июня 2013 г. – Барнаул: АЗБУКА, 2013. – С. 181-182.

УДК 616.6:616-006.6

РОЛЬ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА VHL В РАЗВИТИИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПОЧКИ

Гилязова И.Р.¹, Кутлыева Л.Р.¹, Павлов В.Н.², Халиуллин А.А.², Загидуллин А.А.²,
Климентова Е.А.³, Хуснутдинова Э.К.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН (ИБГ УНЦ РАН)

² Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Башкирский государственный медицинский университет

³ Башкирский государственный университет

Почечно-клеточная карцинома (ПКК) представляет собой злокачественное новообразование почки различных гистологических типов, на долю которого приходится примерно 3% из всех онкологических заболеваний. Ежегодно в мире регистрируют более 200 тысяч новых случаев РП, в России эта цифра составляет 16 тысяч, в республике Башкортостан – 400-450 случаев в год [2]. В России рак почки по темпам прироста онкологической заболеваемости устойчиво занимает 3-е место и в 50% случаев уже имеет или приобретает позднее метастатический характер [1]. Более 80% новообразований почки составляет почечно-клеточный рак. По данным различных авторов, до 4% случаев рака почки (РП) обусловлены наследственной формой заболевания, но большинство случаев носит спорадический характер. Наиболее часто встречаемым гистологическим типом почечно-клеточного рака является светлоклеточный вариант (70-85% случаев) [3].

В последние годы идентифицировано большое количество новых генов, изменения в которых связаны с возникновением и развитием спорадического рака почки. Эти изменения можно выявить с помощью молекулярных технологий и анализировать в качестве потенциальных молекулярно-генетических маркеров ПКК. Одним из основных событий светлоклеточного РП является инактивация гена-супрессора опухолевого роста фон Хиппеля-Линдау (*VHL*, von Hippel–Lindau), локализованного на хромосоме 3p25 [4].

Быстрый и неуклонно продолжающийся рост заболеваемости, неэффективность терапии и высокий уровень смертности – все это превращает РП в актуальную проблему, требующую глубокого и всестороннего изучения. Результаты, полученные при молекулярно-генетическом исследовании РП необходимы для разработки и применения таргетных препаратов, а также для оценки прогноза развития первичной опухоли и заболевания в целом.

Целью данного исследования является изучение инактивации гена *VHL* в результате мутаций, потери гетерозиготности (ЛОН) и метилирования его промотера в опухолевых тканях пациентов со светлоклеточным раком почки.

В работе исследовано 93 парных образца ДНК, выделенных из опухолевой ткани почки и соответствующей ей нормальной почечной паренхимы больных светлоклеточным раком почки, проживающих на территории Республики Башкортостан. Забор образцов проведен в Республиканской клинической больнице им. Куватова и клинике БГМУ г.Уфы сотрудниками кафедры урологии с курсом ИПО ГОУ ВПО «Башкирского государственного медицинского университета» в соответствии с этическими стандартами биоэтического комитета, разработанными Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека».

Выделение геномной ДНК проводили методом последовательной фенольно-хлороформной экстракции. Для анализа мутаций в кодирующей части гена *VHL* было выполнено SSCP-анализ с последующим секвенированием. Анализ ЛОН проводили с использованием микросателлитных локусов D3S1038 и D3S1317, расположенных на хромосоме 3.

По литературным данным, частота соматических мутаций в гене *VHL* у больных спорадическим светлоклеточным раком варьируют в пределах 18-82% случаев [11, 5, 9, 12, 8]. Нами идентифицированы мутации в гене *VHL* у 21 из 93 образцов светлоклеточного рака почки, что составляет 22,6% случаев. Все выявленные мутации были соматическими, присутствовали только в опухолевой ткани и не обнаруживались в нормальной почечной паренхиме и периферической крои больных. Вследствие этого, учитывая также клинические данные, наследственный синдром фон Хиппеля-Линдау у всех пациентов был исключен, и имеющаяся выборка рассматривалась как спорадические случаи ПКК. Десять выявленных нами соматических мутаций не были описаны в литературе ранее.

Возможно, выявленная нами низкая частота мутаций связана с тем, что у некоторых больных имел место *VHL*-независимый путь развития спорадического светлоклеточного рака почки или инактивация *pVHL* произошла другими способами (метилование, потеря гетерозиготности). Кроме того, мы не исключаем, что различия в частотах мутаций могут быть связаны с разными факторами, включая различие между популяциями исследуемых больных, гистопатологию опухоли, соотношение опухолевой и нормальной ДНК в анализируемых образцах или использование разных методов обнаружения мутаций.

При анализе ЛОН обнаружено, что информативность локусов составила для *D3S1038* – 76,3% (71/93), *D3S1317* – 53,8% (50/93). ЛОН в *D3S1038* была обнаружена в 25,3%, в *D3S1317* – 28% (27/83 и 14/50, соответственно) информативных случаев, что сопоставимо с другими опубликованными данными [15, 14, 6, 13]. Аберрантное метилирование CpG-островков промоторной области гена *VHL* обнаружено в 5 образцах ДНК опухолей, что составляет 3,8% случаев. Данные о низкой частоте аберрантного метилирования промоторной области гена *VHL* в опухолевой ткани согласуются с результатами многих работ. Так, в исследованиях Clifford S.C. с соавторами [7] частота гиперметилования промоторного региона гена *VHL* составила 11% (11/99) случаев ПКК, тогда как частота метилирования данного гена в работе Nickerson M.L. с соавторами [9] была значительно ниже (8,3%). Наиболее высокая частота метилирования выявлена Banks R. et al., 2006 с показателем 20,4% случаев спорадической ПКК.

Таким образом, проведенное нами исследование свидетельствует о важной роли гена *VHL* при светлоклеточном РП. Данные, полученные в результате анализа структурных изменений гена *VHL*, могут быть полезными для выбора

наиболее эффективной терапии и решения вопроса о применении таргетных препаратов, применяемых для лечения метастатического рака почки.

Литература

1. Горелов А. И., Солдатенков А. В., Горелов Д. С., Селиванов А. С. Современные аспекты прогнозирования рака почки. // Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер.11 Вып. 4, 2008. С. 153.
2. Носов А.К. Клинические проявления, диагностика и стадирование рака паренхимы почки. Практическая онкология, т. 6, № 3, с. 148-155, 2005.
3. Arjumand W., Suktana S. Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma. // Tumor Biol. 2012. V. 33. P. 9-16.
4. Audenet F., Yates D. R., Cancel-Tassin G., Cussenot O., Rouprêt M. Genetic pathways involved in carcinogenesis of clear cell renal cell carcinoma: genomics towards personalized medicine. // BJU Int. 2011 Oct. 28.
5. Banks R.E., Tirukonda P., Taylor C., Hornigold N., Astuti D., Cohen D., Maher E.R., Stanley A.J., Harnden P., Joyce A., Knowles M., Selby P.J. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. // Cancer Res. 2006. V. 66. P. 2000-2011.
6. Cheng L., MacLennan G.T., Zhang S., Wang M., Zhou M., Tan P.-H., Foster S., Lopez-Beltran A., Montironi R. Evidence for Polyclonal Origin of Multifocal Clear Cell Renal Cell Carcinoma. // Clin. Cancer Res. 2008. V. 14 (24). P. 8087-8093.
7. Clifford S.C., Prowse A.H., Affara N.A., et al. Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) Tumour Suppressor Gene and Allelic Losses at Chromosome Arm 3p in Primary Renal Cell Carcinoma: Evidence for a VHL-Independent Pathway in Clear Cell Renal Tumorigenesis // Genes, Chromosomes and Cancer. – 1998. – V. 22. – P. 200-209.
8. Gossage L., Eisen T. Alterations in VHL as potential biomarkers in renal-cell carcinoma. // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2010. V. 7. P. 277-288.
9. Nickerson M.L. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. // Clin. Cancer Res. 2008. V. 14. P. 4726-4734.
10. Nickerson M.L., Jaeger E., Shi Y., et al. Improved Identification of von Hippel-Lindau Gene Alterations in Clear Cell Renal Tumors // Clin. Cancer Res. – 2008. – V. 14. – P. 4726-4734.
11. Nyhan M.J., Mashad S.M., O'Donovan T.R., Ahmad S., Collins C., Sweeney P., Rogers E., O'Sullivan G.C., McKenna S.L. VHL genetic alteration in ccRCC does not determine deregulation of HIF, CAIX, hnRNP A2/B1 and osteopontin. // Cell Oncol. (Dordr). 2011. V. 34 (3). P. 225-234.
12. Patard J.J., Fergelot P., Karakiewicz P.I., Klatte T., Trinh Q.D., Rioux-Leclercq N., Said J.W., Belldegrun A.S., Pantuck A.J. Low CAIX expression and absence of VHL gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma. // Int. J. Cancer. 2008. V. 123. P. 395-400.
13. Singh R.B., Kadam P.S.A. Investigation of tumor suppressor genes apart from VHL on 3p by deletion mapping in sporadic clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). // Urologic Oncology. 2011.
14. Velickovic M., Delahunt B., Grebe S.K.G. Loss of Heterozygosity at 3p14.2 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Is an Early Event and Is Highly Localized to the FHIT Gene Locus. // Cancer Research. 1999. V. 59. P. 1323-1326.
15. Yoshida M., Yao M., Ishikawa I., Kishida T., Nagashima Y., Kondo K., Nakaigawa N., Hosaka M. Somatic Von Hippel-Lindau Disease Gene Mutation in Clear-Cell Renal Carcinomas Associated With End-Stage Renal Disease/Acquired Cystic Disease of the Kidney. // Genes, chromosomes and cancer. 2002. V. 35. P.359-364.

УДК 577.218:582.951.4

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГАПЛОТИПОВ ГЕНА *Wx* У ПЫРЕЯ СРЕДНЕГО (*Thinopyrum intermedium*)

Дивашук М.Г., Климушина М.В., Карлов Г.И.

Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
Центр молекулярной биотехнологии, Москва 127550
E-mail: divashuk@gmail.com

Введение

Пшеница – важная продовольственная культура, одним из направлений использования которой является получение крахмала, широко применяемого в различных отраслях пищевой и непищевой промышленности. Содержание крахмала в зерновке пшеницы составляет 65-75 % на сухую массу. Физические и химические свойства крахмала зависят от отношения содержания его компонентов: амилозы и амилопектина. GBSSI или белок *Wx* отвечает за синтез амилозы в запасующих тканях зерновых культур. У мягкой пшеницы присутствуют три изоформы белка *Wx*, молекулярный вес которых составляет 59-70 kDa. Они кодируются тремя генами: *Wx-A1* (2,781 п.н.), *Wx-B1* (2,794 п.н.) и *Wx-D1* (2,862 п.н.), каждый из которых состоит из 11 экзонов и 10 интронов [1]. Было обнаружено несколько типов аллелей генов *Wx*, по-разному влияющих на синтез амилозы крахмала. Однако по сравнению с другими запасными белками эндосперма, формирующими качество зерна, у мягкой пшеницы идентифицировано небольшое число функциональных аллелей, отличных от дикого типа [2-4]. Поэтому поиск и вовлечение в селекционный процесс мягкой пшеницы различных аллелей генов *Wx* считается перспективным и позволит получать линии с контролируемым содержанием амилозы.

Дикорастущие сородичи пшеницы являются ценными источниками генетического материала для улучшения пшеницы. Исследование структуры и функции генов *Wx* у дикорастущих сородичей пшеницы имеет значение для изучения эволюции этих хозяйственно-ценных генов и видов в целом, а так же для изучения потенциальной ценности этих генов и перспектив их интрогрессии в геном пшеницы различными методами. Одним из наиболее интересных видов является *Thinopyrum intermedium*. Он является преимущественно гексаплоидным злаком ($2n = 6x = 42$) и имеет большую практическую ценность, как потенциальный донор различных генов устойчивости в геном пшеницы. В литературе так же имеются данные об улучшении качества пшеницы благодаря интрогрессии в ее геном ряда генов *Th. intermedium*.

Одной из важных проблем при направленной интрогрессии каких либо генов от дикорастущих сородичей непосредственно в геном пшеницы является создание молекулярных маркеров. При этом особое внимание должно быть уделено возможности различения пырейных и пшеничных генов в одном геноме.

В связи с этим целью нашей работы было секвенирование гена *Wx* у вида *Thinopyrum intermedium* и создание молекулярного маркера для его идентификации.

Материалы и методы

Растительный материал. В работе использовали семена *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum bessarabicum*, *Ps. strigosa* и сорт мягкой пшеницы Старшина.

Выделение ДНК из проростков проводили по методу Bernatzky и Tanksley [5].

ПЦР, клонирование, секвенирование. В работе использовали следующие праймеры: *WxF3*, *WxVT1R*, *WxBAF*, *WxBAR*, *WxVT1F*, *WxVTR* [6]. Полимеразную цепную реакцию

проводили на Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (“Bio_Rad”, США) при условиях, рекомендуемых авторами праймеров. 25 мкл реакционной смеси содержали: 1xTaq-полимеразный буфер (“Силекс”, Москва), 1.0 U Taq ДНК-полимеразы (“Силекс”, Москва), 200 мкМ каждого dNTP (“Promega”), 0.2 мкМ каждого праймера и 100–150 нг ДНК-матрицы. Концентрация хлорида магния для праймеров 4F, 4R составляла 3.0 мкМ, в остальных случаях – 2.5 мкМ. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2%-ном агарозном геле в трисборатном буферном растворе (ТБЕ). В качестве маркера размеров использовали “100 bp Ladder” (“Fermentas”, Литва). Лигирование амплифицированной ДНК осуществляли в pGEM®-T Easy Vectors. Секвенирование проводили на секвенаторе ABI-3130XL.

Результаты и обсуждение

До настоящего времени полноразмерные последовательности генов *Wx* дикорастущих сородичей отсутствовали. Для получения полноразмерных последовательностей данных генов мы условно поделили ген на три части, каждая примерно по 1000 пн, амплифицировали их, клонировали в вектор pGMT и секвенировали каждую часть гена по отдельности. Нами по литературным данным были отобраны несколько комбинаций праймеров, которые ранее использовали для получения полноразмерных последовательностей генов *Wx* у различных видов пшеницы – твердой, мягкой, спельты.

В результате проведенной работы нами было получены две нуклеотидные последовательности гена *Wx* для *Thinopyrum intermedium*. Одна размером 2685 п.н. и вторая размером 2646 п.н. (рис. 1).

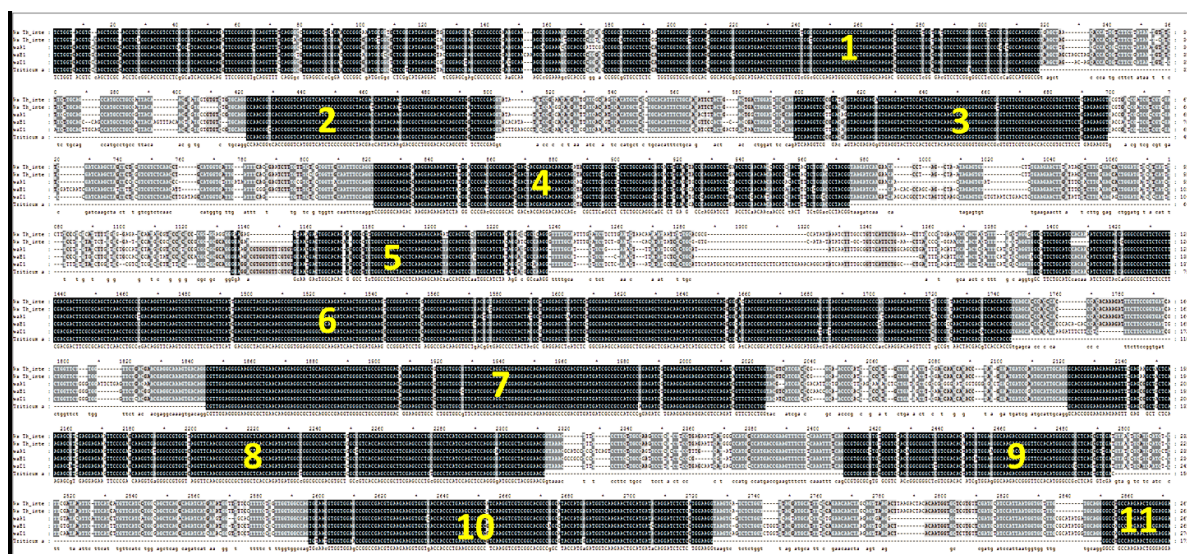


Рисунок 1. Выравнивание последовательностей генов *Waxy Th. intermedium* полученных в нашей работе с последовательностями генов *Wx* мягкой пшеницы. Черным цветом отмечены экзоны, желтыми цифрами обозначены номера экзонов.

В целом, как и ожидалось, наибольшая вариативность наблюдалась в интронах. При этом экзоны оказались достаточно консервативными, и, как правило, отличия составляли однонуклеотидные замены, за исключением начала пятого экзона.

На основе полученных нуклеотидных последовательностей, нами был разработан молекулярный маркер *Th1* позволяющий, отличить гены *Wx* принадлежащие *Th. intermedium* от генов *Wx* мягкой пшеницы. Амплификация при использовании данного маркера наблюдается только с генов *Wx* пырейного происхождения.

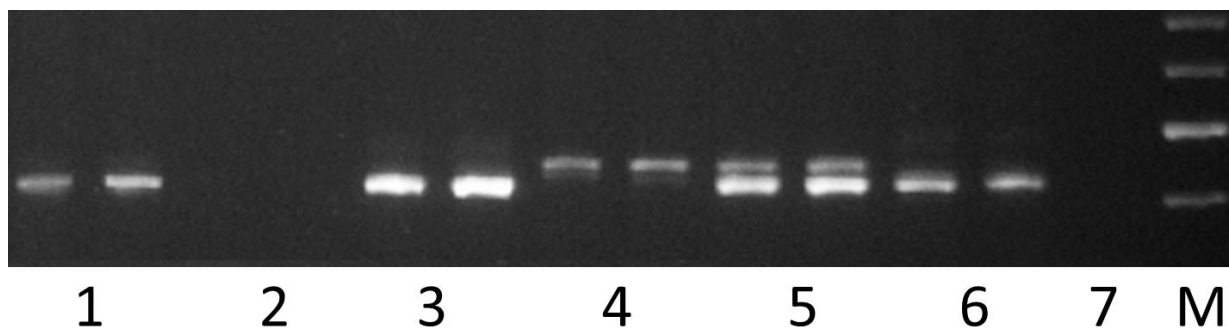


Рисунок 2. Электрофореграмма продуктов амплификации маркера *Th1*. 1, 3 - *Ps. strigosa*; 2 – *T. aestivum* сорт Старшина; 4 - *Thinopyrum bessarabicum*; 5, 6 - *Thinopyrum intermedium*; 7 – отрицательный контроль; М-маркер молекулярных размеров.

Благодаря данным маркерам стало возможно идентифицировать наличие генов пырея в геноме пшенично-пырейных гибридов и оценить возможное влияние данных генов на формирования крахмала. В случае выявления положительного эффекта пырейных генов на крахмал пшеницы, их достаточно легко можно будет интрогрессировать в коммерческие сорта пшеницы с использованием разработанных нами молекулярных маркеров и системы *ph*-мутации.

Работа поддержана грантом Министерства образования Соглашение № 8137 по теме «Молекулярно-генетическая характеристика генов контролирующих синтез амилозы крахмала (*Wx*) у дикорастущих злаков и оценка возможности их использования в улучшении мягкой пшеницы»

Литература

1. Murai J., Taira T., Ohta D. Isolation and characterization of the three *Waxy* genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat // *Gene*. 1999. Vol. 234. P. 71-79.
2. Дивашук М.Г., Климушина М.В., Карлов Г.И. Молекулярно-генетическая характеристика аллеля *Wx-B1e* мягкой пшеницы и применимость ДНК маркеров для его идентификации. *Генетика*. 2011. Т. 47. № 12. С. 1611-1615. (Divashuk M.G., Klimushina M.V., Karlov G.I. Molecular genetic characteristics of the *Wx-B1e* allele from common wheat and applicability of the DNA markers for its identification. *Russian Journal of Genetics*. 2011. Т. 47. № 12. С. 1428-1432).
3. Климушина М.В., Гладких Н.И., Дивашук М.Г., Беспалова Л.А., Васильев А.В., Карлов Г.И. Распределение аллелей генов *Wx* в коллекции мягкой пшеницы краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012. Т. 16. № 1. С. 187-192.
4. Абдулина И.Р., Вафин Р.Р., Ржанова И.В., Гараева А.Л., Асхадуллин Д.Ф., Василова Н.З., Зайнуллин Л.И., Алимова Ф.К. Молекулярная идентификация генотипов яровой пшеницы по аллельным вариантам *Waxy*-генов. *Фундаментальные исследования*. 2013. № 1-1. С. 13-17.
5. Bernatzky R., Tanksley S.D. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences // *Genetics*. 1986. Vol. 112. P. 887–898.
6. Guzman C., Caballero L., Alvarez J.B. Molecular characterization of the *Wx-B1* allelic variants identified in cultivated emmer wheat and comparison with those of durum wheat // *Mol. Breeding*. 2010. Vol. 28. P. 403-411.

УДК 575.17:595.799

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ КИТАЙСКОЙ ВОСКОВОЙ ПЧЕЛЫ *APIS CERANA FABRICIUS, 1793* НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РОССИИ

¹Ильясов Р.А., ²Прощалькин М.Ю., ¹Поскряков А.В., ²Лелей А.С., ¹Николенко А.Г.

¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук,
450054, г.Уфа, Пр.Октября, 71.

²Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г.Владивосток, пр-т 100-летия Владивостоку, 159.
¹e-mail: apismell@hotmail.com

Пчела *Apis cerana* Fabricius, 1793 (индийская, уссурийская, приморская, маньжурская, китайская восковая, азиатская домашняя пчела) распространена преимущественно в Азии [Песенко с соавт., 1989; Прощалькин, 2003]. В литературе всего известно упоминание о 39 подвидах *A.cerana* [Radloff et al., 2010]. М. S. Engel (1999) на основе морфометрических исследований в составе *A.cerana* рассматривал 8 подвидов - *A.c.cerana* Fabricius, 1793 (*A.c.japonica* и *A.c.hainanensis* Hepburn et al., 2001 приравнены к *A.c.cerana*), *A. c. heimifeng* Engel, 1999 (*A.c.abaensis* Hepburn et al., 2001 приравнен к *A.c.heimifeng*), *A.c.indica* Fabricius, 1793 (*A.c.philippina* Skorikov, 1929 приравнен к *A.c.indica*), *A.c.japonica* Fabricius, 1793, *A.c.javana* Enderlein, 1906, *A.c.johni* Skorikov, 1929, *A.c.nuluensis* Tingek, 1996, *A.c.skorikovi* Маа, 1953 (*A.c.himalaya* Smith, 1991 приравнен к *A.c.skorikovi*). Н. R. Hepburn et al. (2001) в составе *A.cerana* рассматривали 9 подвидов - *A.c.cerana*, *A.c.japonica*, *A.c.abaensis*, *A.c.skorikovi*, *A.c.himalayana* Ruttner, 1992, *A.c.hainanensis*, *A.c.philippina*, *A.c.javana*, *A.c.indica*. Таким образом, разными авторами заявлено о существовании в источниках литературы 12 подвидов *A.cerana*: *A.c.cerana*, *A.c.japonica*, *A.c.abaensis*, *A.c.skorikovi*, *A.c.himalayana*, *A.c.heimifeng*, *A.c.hainanensis*, *A.c.philippina*, *A.c.javana*, *A.c.indica*, *A.c.johni*, *A.c.nuluensis*. S. E. Radloff et al. (2010) на основе изучения морфологических параметров *A.cerana* на обширной территории Азии выделили 6 морфокластеров (подвидов) (северный, гималайский, индийский равнинный, индокитайский, филиппинский и индомалайский).

Восковая пчела *A.cerana* внешне сходна с медоносной пчелой *A.mellifera*, но несколько меньше. Медопродуктивность *A.cerana* немного уступает *A.mellifera*. Для гнездования *A.cerana* используют дуплистые деревья, отличаются высокой холодостойкостью: сбор взятка начинается на ранних первоцветах на снегу, а облеты совершают также и в зимнее время. *A.cerana* в Японии, Корее и Китае издавна используют в пчеловодстве. Они очень нервно реагируют на проверку улья, чрезвычайно агрессивны, неспособны выращивать маток из оплодотворенных яиц в безматочных семьях, не могут эффективно противостоять восковой огневке *Galleria mellonella* и в условиях сильного заражения часто покидают гнездо. Все эти особенности делают разведение *A.cerana* более сложным и энергозатратным, по сравнению с разведением *A.mellifera*.

Как и *A.mellifera*, *A.cerana* имеет широкое географическое распространение от умеренных горных регионов до тропических островов в Азии, что привело к возникновению множества подвидов и экотипов. Их естественные ареалы не соприкасаются и не перекрываются [Ruttner et al., 1985]. *A.cerana* является аборигенной в Азии и распространена от Афганистана до Японии, и от России и Китая до Индонезии. *A.cerana* встречается в России на Дальнем Востоке, Афганистане, Иране, Пакистане, Северо-Восточном, Восточном и Южном Китае, Индии, Бангладеше, Мьянме, Корее, Северном Вьетнаме, Тайланде, Бирме и Японии [Engel, 1999; Tanaka et al., 2001; Smith et al., 2004]. На территории Афганистана граница распространения *A.cerana* находится в 600 км от границы распространения *A.mellifera*. *A.cerana* была недавно завезена на острова Папуа-Новой Гвинеи. Обычно на

пасаках *A.mellifera* и *A.cerana* разводятся отдельно из-за наличия межвидовой конкуренции. Есть сведения о совместном разведении на пасаках *A.mellifera* и *A.cerana* в Камбоджи [Yoshikawa, Ohgushi, 1965], на Соломоновых островах [Anderson et al., 2012], в Пакистане [Muzaffar, Ahmad, 1990], на Тайване, в Японии и Китае [Sakagami, 1959; Juntawong, Pechhacker, 1994; Yang, 2005; Yang et al., 2011], во Вьетнаме [Tan, Binh, 1994]. При совместном разведении на пасеке этих двух видов пчел восковая пчела вступает в конкурентные отношения с медоносными пчелами и вытесняется более конкурентоспособной медоносной пчелой с пасеки [Песенко с соавт., 1989; Tan, Binh, 1994; Moritz, Naertel, Neumann, 2005].

На территории России ареал *A.cerana* очень узкий - юг Дальнего Востока - 7 районов Приморского и 2 района Хабаровского краев. *A.cerana* на данный момент в незначительной численности встречается в лесах Хасанского, Надеждинского, Уссурийского, Кировского, Чугуевского, Дальнереченского и Красноармейского районов Приморского края [Кузнецов, 2005]. Численность китайской восковой пчелы *A.cerana* во всех районах Приморского края очень низкая. Наиболее высокая численность *A.cerana* отмечена только в Хасанском районе в заказнике «Барсовый» и заповеднике «Кедровая падь» [Филаткин, 1992; Кузнецов, 1999; Кузнецов, 2002]. Кроме того, *A.cerana* встречается на юге Хабаровского края и Амурской области [Лелей, 1995; Ганин, 1999]. Кроме того, возможно, *A.cerana* сохранилась на острове Сахалин [Филаткин, 1992].

В последнее время наблюдается резкое сокращение ареала и катастрофическое снижение численности дальневосточной популяции китайской восковой пчелы в уссурийской тайге в результате пожаров, вырубок широколиственных лесов и обработок леса от насекомых-вредителей. Но самым главным лимитирующим фактором является браконьерское бортничество [Филаткин, 1992]. На данный момент численность *A.cerana* в России достигла критически низкого уровня - в природе осталось не более 40 семей [Песенко с соавт., 1989]. На территории Китая численность популяции *A.cerana* также быстро сокращается в результате загрязнения окружающей среды и конкуренции с *A.m.mellifera*, завезенной в Китай в 1896 году [Yang, 2005; Ji et al., 2011].

Без применения специальных охранных мер китайская восковая пчела не сможет выжить и исчезнет из фауны России. Изучение образа жизни китайской восковой пчелы, структуры генофонда ее популяции и внутривидовых микроэволюционных процессов будет способствовать осуществлению эффективных мероприятий по ее защите, размножению и сохранению ее популяции в России. Цель данной работы показать внутреннюю структуру популяции восковой пчелы на Дальнем Востоке России используя генетические маркеры – нуклеотидный полиморфизм локуса COI мтДНК.

В работе были использованы рабочие особи китайской восковой пчелы *A.cerana* собранные сотрудниками дальневосточного института почвоведения – Кузнецовым В.Н., Лелеем А.С., Прощалыкиным М.Ю.

Таблица 1

Объем выборки *Apis cerana* в Приморском крае

Край	Район	Место	Число семей
Приморский	Хасанский	г. Владивосток, Академгородок	1
Приморский	Хасанский	Заповедник Кедровая Падь	2
Приморский	Хасанский	п. Барабаш	1
Приморский	Хасанский	п. Ромашка	5
Приморский	Хасанский	с. Овчинниково	1
Всего			10

Полимеразную цепную реакцию проводили с универсальными праймерами для локуса COI мтДНК F-LCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAGATATTGG-3') и R-LCO2198 (5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') [Folmer et al., 1994], продукты которой были просеквенированы. На основе сравнительного кластерного анализа нуклеотидных последовательностей локуса COI мтДНК китайской восковой пчелы методом ближайшего соседа была построена дендрограмма генетических отношений *A. cerana* разных популяций. На дендрограмме представители *A. cerana* дальневосточной популяции кластеризуются в основном отдельно от представителей других популяций и подразделяется на 4 группы, где в 1 группу вошли пчелы с заповедника Кедровая Падь и п. Ромашка. Во 2 группу вошли представители п. Барабаш, п. Ромашка и с. Овчинниково. В 3 группу выделяется единственный представитель с п. Ромашка. Четвертая группа объединяет представителей пчел с Академгородка, заповедника Кедровая Падь, п. Ромашка и представителей приморской, корейской и японской популяций *A. cerana*. Представители каждого вида пчел группируются отдельно. *A. cerana* и *A. nuluensis* из Малайзии имеют очень большое генетическое сходство по сравнению с другими видами.

Таким образом, в дальневосточной популяции восковой пчелы *A. cerana* мы обнаружили 4 генетические группы. Наибольшее генетическое сходство с другими азиатскими популяциями *A. cerana* наблюдалось у представителей пчел из Академгородка, заповедника Кедровая Падь, п. Ромашка. Наибольшее генетическое разнообразие наблюдалось в популяции пчел п. Ромашка, представители которой не группируются вместе в один кластер. Для сохранения полноценной популяции восковой пчелы в России необходимо сохранить представителей всех четырех генетических групп.

Литература

1. Ганин, Г. Н. Китайская восковая пчела (индийская пчела) *Apis cerana cerana* Fabricius, 1793 // Красная книга Хабаровского края. Хабаровск, 1999. С. 426 - 427.
2. Кузнецов, В. Н. О состоянии популяций китайской восковой пчелы *Apis cerana cerana* F. (*Hymenoptera, Apidae*) в Приморском крае // Исследование и конструирование ландшафтов Дальнего Востока и Сибири. В. 4. Владивосток, 1999. С. 202 - 212.
3. Кузнецов, В. Н. Китайская восковая пчела *Apis cerana cerana* F. (*Hymenoptera, Apidae*) на Дальнем Востоке России, 2005. 55 с.
4. Кузнецов, В. Н. Китайская восковая пчела *Apis cerana cerana* F. (*Hymenoptera, Apidae*) в Приморском крае. Владивосток, 2002. 42 с.
5. Лелей, А. С. *Apis* L. / В кн.: П. А. Лер (ред.). Определитель насекомых Дальнего Востока России. Т. 4. Сетчатокрылообразные, скорпионницы, перепончатокрылые. Ч. 1. СПб: Наука, 1995. С. 580 - 590.
6. Песенко, Ю. А., Лелей, А. С., Радченко, В. Г., Филаткин, Г. Н. Китайская восковая пчела *Apis cerana cerana* F. (*Hymenoptera, Apidae*) на Дальнем Востоке СССР // Энтомол. обозрение. Т. 68, В. 3, 1989. С. 527 - 548.
7. Прощалыкин, М. Ю. Пчелы (*Hymenoptera, Apoidea*) Дальнего Востока России. Учебное пособие. Владивосток, 2003. 52 с.
8. Филаткин, Г. Н. Охрана и рациональное использование аборигенной пчелы (*Apis cerana cerana* F.) на Дальнем Востоке СССР // Чтения памяти Алексея Ивановича Куренцова. В. I - II. Владивосток, 1992. С. 117 - 124.
9. Anderson, D. L., Annand, N., Lacey, M., Ete, S. Control of Asian honey bees in Solomon Islands. Canberra, ACT: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), 2012. 321 p.
10. Enderlein, G. Neue Honigbienen und Beitrage zur Kenntnis der Verbreitung der gattung *Apis* // Stett. Entomol. Zeit. V. 67, 1906. P. 331 - 344.

11. Engel, M. S. The taxonomy of recent and fossil honey bees (*Hymenoptera: Apidae; Apis*). // J. Hymenopt. Res. V. 8. (2), 1999. P. 165 - 195.
12. Fabricius, J. C. Entomologia systematica Hafniae. V. 2, 1793. 519 p.
13. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. V. 3, 1994. P. 294 – 299.
14. Hepburn, H. R., Smith, D. R., Radloff, S. E., Otis, G. W. Intraspecific categories of *Apis cerana*: morphometric, allozymal and mtDNA diversity // Apidologie. V. 32, 2001. P. 3 – 23.
15. Ji, T., Yin, L., Chen, G.-H. Genetic diversity and population structure of Chinese honeybees (*Apis cerana*) under microsatellite markers // African Journal of Biotechnology. V. 10 (9), 2011. P. 1712 - 1720.
16. Juntawong, N., Pechhacker, H. *Apis mellifera* versus *Apis cerana* in the north of Thailand. Bees For Development Journal. V. 30, 1994. P. 6 – 7.
17. Maa, T. An inquiry into the systematics of the tribus *Apidaini* or honeybees // Treubia. V. 21, 1953. P. 525-640.
18. Moritz, R. F. A., Haertel, S., Neumann, P. Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity // Ecoscience. V. 12 (3), 2005. P. 289 - 301.
19. Muzaffar, N., Ahmad, R. *Apis* spp. (*Hymenoptera, Apidae*) and their distribution in Pakistan // Pakistan Journal of Agricultural Research. V. 11 (1), 1990. P. 65 - 69.
20. Radloff, S. E., Hepburn, C., Hepburn, H. R., Fuchs, S., Hadisoelilo, S., Tan, K., Engel, M. S., Kuznetsov, V. Population structure and classification of *Apis cerana* // Apidologie. V. 41, 2010. P. 589 – 601.
21. Ruttner, F. Naturgeschichte der Honigbienen, Ehrenwirth. Munich, 1992. 455 p.
22. Ruttner, F., Pourasghar, D., Kauhausen, D. Die Honigbienen des Iran. 2. *Apis mellifera meda* Skorikow, die Persische Biene // Apidologie. V. 16, 1985. P. 241 - 264.
23. Sakagami, S. F. Some Interspecific Relations Between Japanese and European Honeybees // Journal of Animal Ecology. V. 28 (1), 1959. P. 51 - 68.
24. Skorikov A. S. Eine neue Basis für eine Revision der Gattung *Apis* L. // Rep. Appl. Entomol. V. 4. Leningrad, 1929. P. 249 – 270.
25. Smith, D. R. Mitochondrial DNA and honey bee biogeography // in: Smith D.R. (Ed.), Diversity in the Genus *Apis*. Westview Press, Boulder, 1991. P. 131 – 176.
26. Smith, D. R., Warrit, N., Hepburn, H. R. *Apis cerana* from Myanmar. (Burma): unusual distribution of mitochondrial lineages // Apidologie. V. 35, 2004. P. 637 - 644.
27. Tan, N. Q., Binh, P. T. Harmony or conflict? *Apis mellifera* and *Apis cerana* in Southern Vietnam // Beekeeping & Development. V. 32, 1994. P. 4 - 7.
28. Tanaka, T., Roubik, D. W., Kato, M., Liew, F., Gunsalam, G. Phylogenetic position of *Apis nuluensis* of northern Borneo and phylogeography of *A. cerana* as inferred from mitochondrial DNA sequences // Insects soc. V. 48, 2001. P. 44 - 51.
29. Yang, G. H. Harm of introducing the western honey bee *Apis mellifera* L. to the Chinese honey bee *Apis mellifera* F. and its ecological impact // Kun chong xue bao. V. 48 (3), 2005. P. 401 – 406.
30. Yang, M.-X., Tan, K., Radloff, S. E., Hepburn, H. R. Interspecific interactions among Asian Honeybees // In H. R. Hepburn, S. E. Radloff (Eds.), Honeybees of Asia. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 2011. P. 445 – 472.
31. Yoshikawa, K., Ohgushi, R. Tropical Beekeeping in Cambodia // Journal of Biology. V. 16, 1965. P. 81 - 88.

УДК 575

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ALU-ЭЛЕМЕНТОВ СО СТАРЕНИЕМ

Каримов Д.Д., Эрдман В.В., Сомова Р.Ш., Насибуллин Т.Р., Мустафина О.Е.
karriden@gmail.com

Институт Биохимии и Генетики Уфимского Научного Центра РАН, Уфа.

Предложено множество определений феномена старения и гипотез о причинах и механизмах его развития как процесса. Среди них особое внимание привлекает гипотеза о роли нестабильности генома в старении. Предполагается, что нестабильность генома соматических клеток оказывает глубокое влияние на экспрессию генов, что приводит к нарушению происходящих в клетке процессов, остановке клеточного роста, дегенерации и атрофии клеток и тканей, к старению организма в целом. Одним из пусковых механизмов, опосредующих нестабильность генома и изменение уровня экспрессии генов является активация *Alu*-элементов под влиянием факторов среды (Brahmachari S.K. et al., 2004; Grover D., 2003, Laperriere D. et al., 2007, Witherspoon D.J. et al., 2009). *Alu*-элементы относятся к классу коротких диспергированных нуклеотидных элементов. Геном человека содержит приблизительно 1 миллион копий ретропозонов семейства *Alu*, разбросанных по геному далеко не случайным образом. Рассеянные по геному *Alu*-элементы служат “субстратами” для гомологичной рекомбинации.

В популяциях человека широко представлен инсерционно-делеционный полиморфизм, обусловленный вставкой или выпадением *Alu*-элементов. Поэтому правомерен вопрос, может ли *Alu*-инсерционный полиморфизм влиять на вариабельность продолжительности жизни человека.

Цель исследования состояла в анализе ассоциаций *Alu*-инсерционных локусов со старением и долголетием человека.

Материалы и методы

В работе была использована выборка из 1611 человек, возрастом 20 – 109 лет, этнических татар, проживающих в республике Башкортостан. Выделение ДНК из цельной венозной крови осуществлялось методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование по полиморфным *Alu*-инсерционным локусам Ya5ac1986 гена *COL13A1* (10q21.3), Ya5-MLS19 гена *LAMA2* (6q22.33), Ya5ACE гена *ACE* (17q23.3), Ya5ac2013 гена *TEAD1* (11p15.2), TRA25 гена *PLAT* (8p11.21) проводилось методом ПЦР; статистический анализ полученных результатов производился с использованием программного обеспечения SPSS V. 13.0. Для сравнения частот аллелей и генотипов в разных возрастных группах использовался точный двусторонний тест Фишера.

Результаты и обсуждение

Охарактеризовано распределение частот генотипов и аллелей по *Alu*-элементам Ya5ac2013 в гене *TEAD1* и TRA25 в гене *PLAT*. При подразделении общей выборки индивидов по гендерным и возрастным особенностям не выявлено статистически значимых различий по частотам генотипов и аллелей между отдельными группами.

Обнаружена ассоциация с возрастом полиморфного *Alu*-инсерционного локуса Ya5ac1986 (dbRIP ID: 1000040) у женщин. Этот полиморфный *Alu*-элемент локализован в хромосоме 10 (chr10:71280182-71280182) в интроне 3 гена *COL13A1* (10q21.3).

Частоты обнаружения генотипов *COL13A1**I*I, *COL13A1**I*D и *COL13A1**D*D в

общей выборке лиц в возрасте от 20 до 109 лет составили 40.19%, 24.43% и 35.38%, аллелей *COL13A1C* и *COL13A1*D* – соответственно 52.40% и 47.60%. Эмпирическое распределение частот генотипов соответствует теоретически ожидаемому ($\chi^2=1.108$, $P=0.440$). Анализ результатов типирования с учетом гендерных и возрастных особенностей показал следующее. В выборке женщин группа долгожительниц отличалась от групп женщин старческого возраста по частоте генотипа *COL13A1*I*D* (10.14% против 22.05%, $p=0.002$), пожилого возраста по частотам генотипов *COL13A1*I*I* (51.35% и 25.36%, $p<0.001$) и *COL13A1*I*D* (10.14% и 37.80%, $p<0.001$), зрелого второго возраста по частоте генотипа *COL13A1*I*D* (10.14% против 26.53%, $p=0.008$). В тоже время были не схожи между собой и группы женщин старческого и пожилого возраста по частотам генотипов *COL13A1*I*I* (43.81% и 25.36%, $p<0.001$) и *COL13A1*I*D* (22.05% и 37.80%, $p<0.001$). Логистический регрессионный анализ позволил обнаружить тот факт, что среди женщин генотип *COL13A1*I*I* ассоциирован с возрастом в диапазоне от 57 до 109 лет ($OR=1.046$, $p<0.001$), генотип *COL13A1*I*D* – в диапазоне от 56 до 109 лет ($OR=0.948$, $P= p<0.001$). Таким образом, прослеживается в старческом возрасте и возрасте долголетия снижение частоты гетерозиготного генотипа *COL13A1*I*D* и повышение частоты гомозиготного генотипа *COL13A1*I*I*.

Выявлена ассоциация с возрастом полиморфного Alu-инсерционного локуса Ya5-MLS19 (dbRIP ID: 1000227, chr6:129778784-129779077), который локализован в интроне 41 гена *LAMA2* (6q22.33), у женщин. Шансы дожития до возраста долголетия выше у носителей генотипа *LAMA2*I*D*.

В общей выборке лиц в возрасте от 20 до 109 лет частоты обнаружения генотипов *LAMA2*I*I*, *LAMA2*I*D* и *LAMA2*D*D* составили 8.12%, 34.12% и 57.76%, аллелей *LAMA2*I* и *LAMA2*D* – соответственно 25.18% и 74.82%. Как показало сопоставление по частотам генотипов и аллелей разных возрастных групп, в группе женщин в возрасте 90 лет и старше повышена частота генотипа *LAMA2*I*D* по сравнению с группой женщин старческого (46.30% против 33.79%, $p=0.008$) и зрелого второго возраста (46.30% против 21.54%, $p=0.001$), а также понижена частота генотипа *LAMA2*D*D* относительно таковой среди женщин старческого (40.74% против 55.86%, $p=0.002$) и второго зрелого возраста (40.74% против 70.77%, $p<0.001$); соответственно в возрасте долголетия наблюдается снижение частоты аллеля *LAMA2*D* (63.89% против 72.75% в группе лиц старческого, $p=0.004$; 63.89% против 81.54% в группе лиц второго зрелого возраста, $p<0.001$). Согласно результатам логистического регрессионного анализа анализируемый полиморфный локус у женщин ассоциирован с возрастом в диапазоне 56-109 лет. Шансы обнаружения в возрасте после 55 лет носителей генотипа *LAMA2*I*D* возрастают ($OR=1.016$, CI_{OR} : 1.01 – 1.03, $p=0.002$), а носителей генотипа *LAMA2*D*D* снижаются ($OR=0.981$, CI_{OR} : 0.971 – 0.990, $p<0.001$). Можно полагать шансы дожития до возраста долголетия выше у женщин, носителей генотипа *LAMA2*I*D*.

Показано, что происходит снижение частоты носителей генотипа, гомозиготного по делеции Alu-элемента Ya5ACE (dbRIP ID: 1000093, chr17:58919634-58919634), среди долгожителей женского и мужского пола. Данный полиморфный Alu-элемент локализован в интроне 16 гена *ACE* (rs1799752, 17q23.3).

В выборке лиц 20-109 лет, не дифференцированной по возрасту и полу, аллели *ACE*I* и *ACE*D* представлены с частотами 47.89% и 52.11%, а генотипы *ACE*I*I*, *ACE*I*D* и *ACE*D*D* – с частотами 23.34%, 49.10% и 27.56% соответственно. Эмпирическое распределение частот генотипов соответствует теоретически ожидаемому ($\chi^2=0.180$, $P=0.915$). Между группами мужчин и женщин не выявлено различий по распределению частот генотипов ($\chi^2=1.309$, $P=0.507$). В группе долгожителей генотип *ACE*D*D* выявлен в меньшем числе случаев (20.00%), чем среди лиц пожилого (28.99%, $p=0.036$), и старческого (30.77%, $p=0.007$) возраста. В то же время частота обнаружения носителей гетерозиготного

генотипа *ACE**I/*D среди долгожителей выше, чем среди стариков (55.44% и 45.32%. $p=0.033$). Снижение частоты генотипа *ACE**D/*D отмечалось среди долгожителей женского и мужского пола. Как показали результаты логистического регрессионного анализа, шансы обнаружения носителей генотипа *ACE**D/*D уменьшаются среди мужчин в возрасте после 75 лет ($OR=0.935$, CI_{OR} : 0.878 – 0.997), среди женщин в возрасте старше 76 лет ($OR=0.953$, CI_{OR} : 0.921 – 0.986).

Таким образом, результаты сравнительного анализа в группах лиц разного возраста распределений частот аллелей и генотипов по полиморфным Alu-инсерционным локусам, локализованным в интронах генов *COL13A1* (Ya5ac1986), *LAMA2* (Ya5-MLS19), *ACE* (Ya5ACE), свидетельствуют о роли Alu-инсерций в вариабельности продолжительности жизни человека.

Литература

1. Brahmachari, S.K., Grover, D., Majumder, P.P., Mukerji, M. (2004). Non-random distribution of Alu elements in human: novel insights from analysis of the complete genome. In: Proceeding of the fourth international conference bioinformatics of genom regulation and structure (BGRS 2004). 1, 38-41.
2. Grover, D., Partha, P. Majumder, P.P., Rao, C., Brahmachari, S.K., Mukerji, M. (2003). Nonrandom Distribution of Alu Elements in Genes of Various Functional Categories: Insight from Analysis of Human Chromosomes 21 and 22. *Mol. Biol. Evol.* 20, 1420-1424.
3. Laperriere, D., Wang, T.T., White, J.H., Mader, S. (2007). Widespread Alu repeat-driven expansion of consensus DR2 retinoic acid response elements during primate evolution. *BMC Genomics* 8, 23, doi:10.1186/1471-2164-8-23
4. Witherspoon, D.J., Wtkins, W.S., Zhang, Y., Xing, J., Tolpinrud, W.L., Hedges, D.J., Batzer, M.A., Jorde, L.B. (2009). Alu repeats increase local recombination rates. *BMC Genomics* 10, 530 doi:10.1186/1471-2164-10-530

УДК 575.113:616.248

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Карунас А.С.^{1,2}, Федорова Ю.Ю.¹, Юнусбаев Б.Б.¹, Рамазанова Н.Н.³, Мухтарова Л.А.³,
Загидуллин Ш.З.³, Эткина Э.И.³, Хуснутдинова Э.К.^{1,2}.

¹ ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук (ИБГ УНЦ РАН), Уфа, 450054; e-mail: carunas@list.ru;

² ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет» (БашГУ), Уфа, 450074;

³ ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (БГМУ), Уфа, 450000.

Бронхиальная астма (БА) – хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, развивающееся при взаимодействии многочисленных факторов окружающей среды и наследственной предрасположенности. В мире насчитывается около 300 млн. больных БА, распространенность данной патологии в разных странах варьирует от 1 до 18% [GINA, 2012]. Согласно данным Российского респираторного общества, в России распространенность БА среди детей составляет от 5,6 до 12,1%, среди взрослых – 5,6-7,3%, а общее количество

больных БА в России приближается к 7 млн. (ФЦП РФ «Бронхиальная астма» на 2011-2015 годы).

Во всем мире ведется активный поиск генов, отвечающих за формирование предрасположенности к БА. К настоящему времени выполнены анализы ассоциации БА и других АЗ с полиморфными вариантами сотен генов-кандидатов. Проведено более 20 полногеномных анализов сцепления БА и атопии. Выявлены хромосомные области, тесно сцепленные с развитием БА, идентифицированы позиционно-клонированные гены БА (*ADAM33*, *DPP10*, *GPR154 (GPRA)*, *PHF11*, *HLA-G*, *CYFIP2*, *IRAK3*) [Holloway et al., 2010; March et al., 2011].

Начиная с 2007 г., в различных популяциях мира проведены полногеномные анализы ассоциации (GWAS) БА, в результате которых обнаружены новые гены, ассоциированные с развитием БА у индивидов европейского происхождения – *ORDML3*, *GSDMB*, *DENND1B*, *PDE4D*, *RAD50*, *IL1RL1/IL18R1*, *HLA-DQ*, *IL33*, *IL6R*, *SMAD3* и *IL2RB*; африканского происхождения – *ADRA1B*, *PRNP* и *DPP10*; мексиканцев – *TLE4*, корейцев – *CTNNA3*, японцев – *TSLP*, *WDR36* (<http://www.genome.gov/GWASStudies/>).

В целом, генетические исследования показали, что в этиопатогенезе БА принимает участие множество функционально взаимосвязанных генов. [Holloway et al., 2010; Meng et al., 2010; Michel et al., 2010; March et al., 2011]. Среди них гены цитокинов, главного комплекса гистосовместимости, β 2-адренорецепторов, ферментов биотрансформации ксенобиотиков, гены образ-распознающих рецепторов, позиционно-клонированные и обнаруженные при GWAS гены.

Целью настоящей работы явился поиск генетических маркеров риска развития БА в Республике Башкортостан (РБ). Материалом для исследования служили образцы ДНК 358 неродственных больных бронхиальной астмой различной этнической принадлежности (160 русских, 125 татар и 73 башкира) и 369 индивидов контрольной группы (152 русских, 117 татар, 100 башкир). Полногеномное генотипирование 61000 полиморфных локусов проведено с использованием Illumina Human610 quad array (Illumina) в рамках проекта Шестой рамочной программы Евросоюза GABRIEL (контракт № LSHB-CT-2006-018996). Полногеномный анализ ассоциации полиморфных локусов выполнен с помощью пакета программ PLINK 1.06.

Установлена статистически значимая ассоциация ($p \leq 4,79 \times 10^{-7}$) пяти ОНП, локализованных на 17 хромосоме в области 17q12-q21, с развитием БА. В этой области хромосомы 17 локализованы гены *GSDMB* и *ORMDL3*. Полиморфный ДНК-локус с наиболее высоким уровнем ассоциации с БА (rs7216389) расположен в первом интроне гена гасдермина В *GSDMB* ($p = 1,01 \times 10^{-7}$). Обнаруженная ассоциация с детской БА (возраст манифестации <18 лет) была более выраженной ($p = 1,97 \times 10^{-6}$ для rs7216389), чем с БА с более поздним возрастом манифестации ($p = 1,8 \times 10^{-4}$ для rs7216389). Роль гасдермина В в развитии БА ясна не до конца, однако известно, что он принимает участие в терминальной дифференцировке эпителиальных клеток [Carl-McGrath et al., 2008]. Ассоциация БА с данной областью была впервые выявлена у детей из Германии и Великобритании [Moffatt et al., 2007]. К настоящему времени проведен целый ряд работ, в которых установлена ассоциация ОНП области 17q12-q21 с БА в различных европейских и азиатских популяциях [Bouzigon et al., 2008; Hirota et al., 2008; Sleiman et al., 2008; Leung et al., 2009; Halapi et al., 2010; Moffatt et al., 2010; Vinia et al., 2011; Yu et al., 2011].

Кроме этого, в проведенном нами полногеномном анализе ассоциации впервые обнаружена выраженная ассоциация БА с ОНП, локализованными в областях 9p13 (в гене *B4GALT*) и 7p12.3 (в гене *IGFBP3*). Ген *B4GALT1* кодирует две изоформы белка бета1,4-галактозилтрансферазы. Обе изоформы экспрессируются в моноцитарных дендритных клетках и CD4(+) Т-лимфоцитах человека и являются одними из ключевых молекул клеточной адгезии, участвующими во взаимодействии дендритных клеток с Т-лимфоцитами.

Предполагается, что длинная изоформа может активно участвовать в дифференциации и функционировании Th1/Th2 клеток [Han et al., 2009]. Ген *IGFBP3* кодирует белок 3, связывающий инсулиноподобные факторы роста IGF-I и IGF-II. В ряде работ было выявлено, что инсулиноподобные факторы роста активируются при воспалении дыхательных путей и индуцируют пролиферацию и дифференциацию мезенхимальных клеток, стимулируя выработку коллагена, ангиогенез и гиперплазию гладкомышечных клеток – основных процессов, происходящих при ремоделировании легких [Veraldi et al., 2009].

При полногеномном анализе ассоциации, проведенном нами в отдельных этнических группах, выявлены этноспецифические маркеры риска развития БА. У русских установлена значительная ассоциация БА с полиморфными локусами гена *MUC19*, кодирующего гелепродуцирующий муцин 19 и локализованного в области 12q12. *MUC19* экспрессируется в клетках подслизистых желез трахеи и слюнных желез, участвует в формировании селективного слизистого барьера между клетками эпителия дыхательных путей и внешней средой [Zhu L. et al., 2011].

У татар с наиболее высоким уровнем значимости с БА были ассоциированы ОНП, расположенные в области 15q26.3, в которой локализован ген рецептора инсулиноподобного роста 1 (*IGF1R*). Ген *IGF1R* экспрессируется практически во всех тканях. Рецептор IGF1R взаимодействует с инсулино-подобными факторами роста, участвующими в пролиферации, дифференциации, апоптозе клеток и ремоделировании дыхательных путей [Veraldi et al., 2009].

У башкир выявлена значимая ассоциация с ОНП гена *GRIA1* (5q33), кодирующего субъединицу AMPA – ионотропного рецептора глутамата. Предполагается, что глутаматные рецепторы могут быть одними из регуляторов активации Т-клеток при иммунном ответе. Установлено, что дендритные клетки секретируют глутамат, необходимый при взаимодействии Т-лимфоцитов и дендритных клеток [Pacheco et al., 2006].

Таким образом, проведенное полногеномное исследование однонуклеотидных полиморфных вариантов у больных БА и индивидов контрольной группы показало наличие ассоциации БА с полногеномным уровнем значимости ($p < 4,79 \times 10^{-7}$) с ОНП, локализованными в области 17q12-q21 (гены *GSDMB* и *ORMDL3*) и, по данным литературы, ассоциированными с развитием БА в популяциях различного этнического происхождения. Впервые обнаружена выраженная ассоциация БА с ОНП, локализованными в областях 9p13 (в гене *B4GALT1*) и 7p12.3 (в гене *IGFBP3*). Идентифицированы этноспецифические маркеры риска развития БА у русских, татар и башкир.

Литература

1. GINA 2012 Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. <http://www.ginasthma.org>.
2. Holloway J.W., Yang I.A., Holgate S.T. Genetics of allergic disease // J Allergy Clin Immunol. – 2010. – V.125. – P.81-94.
3. Meng J.F., Rosenwasser L.J. Unraveling the genetic basis of asthma and allergic diseases // Allergy Asthma Immunol Res. – 2010. – V.2 (4). – P.215-27.
4. Michel S., Liang L., Depner M., et al. Unifying candidate gene and GWAS Approaches in Asthma // PLoS One. – 2010. – V.5(11). – e13894.
5. March M.E., Sleiman P.M., Hakonarson H. The genetics of asthma and allergic disorders // Discov Med. – 2011. – V.11 (56). – P.35-45.
6. Carl-McGrath S., Schneider-Stock R., Ebert M. and Rocken C. Differential expression and localisation of gasdermin-like (GSDML), a novel member of the cancer-associated GSDMDC protein family, in neoplastic and nonneoplastic gastric, hepatic, and colon tissues // Pathology. – 2008. – V. 40. – P. 13–24.

7. Moffatt M.F., Kabesch M., Liang L. et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma // Nature. – 2007. – V. 448. – P. 470-473.
8. Bouzigon E., Corda E., Aschard H. et al. Effect of 17q12-q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma // N Engl J Med. – 2008. – V.359 (19). – P.1985-1994.
9. Hirota T., Harada M., Sakashita M., et al. Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population // J Allergy Clin Immunol. – 2008. – V.121(3). – P. 769-770
10. Sleiman P.M., Annaiah K., Imielinski M. et al. ORMDL3 variants associated with asthma susceptibility in North Americans of European ancestry // J Allergy Clin Immunol. – 2008. – V.122 (6). – P.1225-1227.
11. Leung T.F., Sy H.Y., Ng M.C. et al. Asthma and atopy are associated with chromosome 17q12-q21 markers in Chinese children // Allergy. – 2009. – V.64 (4). – P. 621-628.
12. Halapi E., Gudbjartsson D.F., Jonsdottir G.M. et al. A sequence variant on 17q12-q21 is associated with age at onset and severity of asthma // Eur J Hum Genet. – 2010. – V.18. – P.902-908.
13. Moffatt M.F., Gut I.G., Demenais F. et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma // N Engl J Med. – 2010. – V.363 (13). – P. 1211-1221.
14. Binia A., Khorasani N., Bhavsar P.K. et al. Chromosome 17q12-q21 SNP and severe asthma // J Hum Genet. – 2011. – V.56 (1). – P.97-98.
15. Yu J., Kang M.J., Kim B.J. et al. Polymorphisms in GSDMA and GSDMB are associated with asthma susceptibility, atopy and BHR // Pediatr Pulmonol. – 2011. – V.46 (7). – P.701-708.
16. Veraldi K.L., Gibson B.T., Yasuoka H., et al. Role of insulin-like growth factor binding protein-3 in allergic airway remodeling // Am J Respir Crit Care Med. – 2009. – V.180 (7). – P.611-617.
17. Han Y., Zhou X., Ji Y. et al. Expression of beta-1,4-galactosyltransferase-I affects cellular adhesion in human peripheral blood CD4+ T cells // Cell Immunol. – 2010. – V. 262(1). – P.11-17.
18. Zhu L., Lee P., Yu D. et al. Cloning and Characterization of Human MUC19 Gene // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2011 – V.45 (2). – P.348-358.
19. Pacheco R., Gallart T., Lluís C., Franco R. Role of glutamate on T-cell mediated immunity // Journal of Neuroimmunology. – 2007. – V.185. – P. 9-19.

УДК 579.253.42:575.224.42

ПЦР-СКАНИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ДИКОГО ТИПА И ИХ ДЕРИВАТОВ СО СПОНТАННЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ В СТРУКТУРЕ О-АНТИГЕНА

Кацы Е.И., Петрова Л.П.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

Альфа-протеобактерии рода *Azospirillum* стали объектом интенсивных генетических, биохимических и экологических исследований, благодаря их способности вступать во взаимовыгодные ассоциации с широким кругом растений [2]. Практически все известные

штаммы азоспирилл несут плазмиды, по-видимому, играющие важную роль во взаимодействии этих бактерий с растениями. В ряде мегаплазмид азоспирилл выявлены гены “домашнего хозяйства”; некоторые плазмиды не удается элиминировать, что также предполагает их существенную роль в определении жизнеспособности хозяйских клеток [13, 14]. Плазмиды детерминируют биогенез клеточной оболочки, синтез жгутиков и подвижность, образование биопленок, устойчивость к ксенобиотикам, продукцию биологически активных вторичных метаболитов и другие признаки, потенциально важные для выживания азоспирилл в почве и фитосфере [13, 14]. Спонтанные плазмидные перестройки, по-видимому, вносят существенный вклад в обеспечение генетической и физиологической пластичности азоспирилл [4, 10, 11, 13, 18–20].

Основными полимерами клеточной поверхности азоспирилл являются липополисахариды (ЛПС), состоящие из липида А, корового олигосахарида и О-специфического полисахарида (ОПС) [16]. В нуклеотидных последовательностях 90-МДа плазмиды (p90, или pRhico) [23] типового штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 [22], 85- (p85) и 120-МДа плазмид (p120, или AZOBR_p6) и других крупных плазмид [12, 15, 24] факультативного эндофита *A. brasilense* Sp245 [3] выявлены многочисленные открытые рамки считывания, кодирующие предсказанные ферменты синтеза полисахаридов (ПС).

У идентифицированного ранее деривата *A. brasilense* Sp245 (штамм Sp245.5), спонтанно утратившего 85- и 120-МДа репликоны при образовании новой ~270-МДа плазмиды после многолетнего хранения бактерий при комнатной температуре, структура ЛПС претерпела радикальные изменения. Клетки Sp245.5 продуцируют более гетерогенный ЛПС, не взаимодействующий с поликлональными антителами, специфичными к ЛПС штамма Sp245 [10]. В отличие от пента-D-рамнанового ОПС *A. brasilense* Sp245 [7] повторяющееся звено ОПС деривата Sp245.5 является дисахаридом, состоящим из остатков N-ацетил-D-галактозамина и N-ацетил-D-маннозаминуруновой кислоты [9].

Типовой штамм *A. brasilense* Sp7 также может претерпевать спонтанные плазмидные перестройки, приводящие к изменениям в структуре ЛПС. Плаزمида с молекулярной массой 115 МДа (p115) штамма Sp7 родственна p85 [1, 10], а pRhico, подобно p120/AZOBR_p6, кодирует разнообразные ферменты синтеза ПС [23]. Спонтанные дериваты штамма Sp7, утратившие p115 и содержащие измененную pRhico, в отличие от родительского штамма, в ЛПС которого выявлены так называемые R- и S-антигены, продуцируют ЛПС с неиммуногенным R-антигеном (штамм Cd), гибридным RS-антигеном (штамм Sp7.K2), дефектным S- (штамм Sp7.4) или R-антигеном (штамм Sp7.6) [17–20].

Целью настоящей работы был сравнительный анализ структуры геномов штаммов *A. brasilense* Sp245 и Sp7 и их вариантов с измененными О-антигенами, что необходимо для выяснения молекулярно-генетических причин спонтанного появления бактерий с новой структурой клеточной поверхности.

В наши задачи входило следующее:

1. Биоинформационный анализ данных о первичной структуре генома штамма *A. brasilense* Sp245 и плазмиды pRhico штамма *A. brasilense* Sp7; идентификация районов, кодирующих гликозилтрансферазы, гликозилполимеразы, ферменты синтеза активированных сахаров и другие ферменты, необходимые для биосинтеза пента-D-рамнана или ОПС с новым дисахаридным звеном в клетках штаммов Sp245 и Sp245.5, соответственно, и для синтеза ЛПС в клетках штамма Sp7.

2. Разработка праймеров, специфичных к генам-мишеням, выбранным в результате выполнения 1-й задачи, и их применение в ПЦР на ДНК исходных штаммов и их вариантов по структуре ЛПС.

3. Анализ различий в структуре ДНК штаммов *A. brasilense* Sp245 и Sp7 дикого типа и их спонтанных вариантов по структуре О-антигена в ПЦР с праймерами к консервативным нуклеотидным повторам в бактериальных ДНК.

В результате разработаны 59 пар плазмидоспецифичных праймеров и подобраны условия амплификации, позволяющие проводить быстрое и корректное ПЦР-сканирование геномов штаммов *A. brasilense* Sp245 и Sp7 дикого типа и их вариантов со спонтанными изменениями в структуре О-антигена.

С помощью сравнительного ПЦР-анализа ДНК *A. brasilense* Sp245 и Sp7 и их вариантов по структуре ЛПС с 38 парами праймеров к плазмиде AZOBR_p6, являющейся “резервуаром” нескольких десятков генов, по-видимому, существенных для синтеза пента-D-рамнанового ОПС, 6 и 3 парами праймеров к плазмидам AZOBR_p5 и AZOBR_p3, соответственно, кодирующим предсказанные ферменты иного пути биосинтеза ОПС, 7 парами праймеров к p85 и 5 парами праймеров к pRhico выявлены локусы, утраченные или претерпевшие реорганизацию в ходе геномных перестроек, приведших к продукции клетками азоспирилл нового или модифицированных ЛПС.

Идентифицированы несколько пар праймеров, специфичных к определенным участкам плазмид AZOBR_p6 и p85 штамма *A. brasilense* Sp245, использование которых в ПЦР на ДНК *A. brasilense* Sp7 также позволяет получать продукты амплификации ожидаемого размера, что свидетельствует о наличии в геномах штаммов Sp245 и Sp7 высокомолекулярных районов.

На примере *A. brasilense* Sp245 и Sp7 и их спонтанных вариантов подтверждена информативность ПЦР с праймерами к консервативным нуклеотидным повторам (BOX, ERIC, RAPD, REP [5, 6, 21]) для целей сравнительного анализа геномов близкородственных штаммов бактерий.

Таким образом, использование в исследованиях оригинальных вариантов штаммов *A. brasilense* Sp245 и Sp7 с охарактеризованными изменениями в химической и/или антигенной структуре ЛПС позволило получить новые сведения о масштабе спонтанных перестроек бактериальных геномов, сопровождающихся появлением бактерий с новыми свойствами клеточной поверхности.

Полученные нами ранее данные о присутствии в 120-МДа плазмидах штаммов *A. brasilense* Sp245, SR75 и Sp107, продуцирующих идентичный пента-D-рамнановый ОПС, высокомолекулярных сегментов, содержащих гены синтеза ПС [8, 12], позволяют предположить, что ОПС деривата Sp245.5, образованный дисахаридными повторяющимися звеньями, является более древней структурой. В процессе эволюции ризосферные штаммы *A. brasilense* могли получить в результате горизонтального переноса комплекс генов, обуславливающих синтез пента-D-рамнанового ОПС, который, вероятно, обеспечил бактерии преимуществами при установлении контактов с растениями.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 12-04-00262-а.

Литература

1. Кацы, Е.И. Плазмида p85 *Azospirillum brasilense* Sp245: Изучение круга возможных хозяев и несовместимости с плазмидами *Azospirillum brasilense* Sp7 [Текст] / Е.И. Кацы // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1992. – № 9–10. – С. 8–11.
2. Кацы, Е.И. Молекулярная генетика ассоциативного взаимодействия бактерий и растений: состояние и перспективы исследований [Текст] / Е.И. Кацы; под ред. В.В. Игнатова. – М.: Наука, 2007. – 86 с.
3. Baldani, V.L.D. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat [Текст] / V.L.D. Baldani, J.I. Baldani, J. Döbereiner // Can. J. Microbiol. – 1983. – Vol. 29. – P. 924–929.
4. Borisov, I.V. Changes in *Azospirillum brasilense* motility and the effect of wheat seedling exudates [Текст] / I.V. Borisov [et al.] // Microbiol. Res. – 2009. – Vol. 164. – P. 578–587.

5. de Bruijn, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria [Текст] / F.J. de Bruijn // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – Vol. 58. – P. 2180–2187.
6. Fancelli, S. Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of *Azospirillum* strains in soil microcosms [Текст] / S. Fancelli [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – Vol. 49. – P. 221–225.
7. Fedonenko, Y.P. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245 [Текст] / Y.P. Fedonenko [et al.] // Carbohydr. Res. – 2002. – Vol. 337. – P. 869–872.
8. Fedonenko, Yu.P. Determination of the structure of the repeated unit of the *Azospirillum brasilense* SR75 O-specific polysaccharide and homology of the *lps* loci in the plasmids of *Azospirillum brasilense* strains SR75 and Sp245 / Yu.P. Fedonenko [et al.] // Microbiology. – 2005. – Vol. 74. – P. 542–548.
9. Fedonenko, Yu.P. The structure of the O-specific polysaccharide from a mutant of nitrogen-fixing rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 with an altered plasmid content [Текст] / Yu.P. Fedonenko [et al.] // Russ. J. Bioorg. Chem. – 2010. – Vol. 36. – P. 219–223.
10. Katsy, E.I. The use of fragments of the 85- and 120-MDa plasmids of *Azospirillum brasilense* Sp245 to study the plasmid rearrangement in this bacterium and to search for homologous sequences in plasmids of *Azospirillum brasilense* Sp7 [Текст] / E.I. Katsy [et al.] // Russ. J. Genet. – 2002. – Vol. 38. – P. 124–131.
11. Katsy, E.I. Mobile elements of an *Azospirillum brasilense* Sp245 85-MDa plasmid involved in replicon fusions [Текст] / E.I. Katsy, A.G. Prilipov // Plasmid. – 2009. – Vol. 62. – P. 22–29.
12. Katsy, E.I. Analysis of *Azospirillum brasilense* plasmid loci coding for (lipo)polysaccharide synthesis enzymes [Текст] / E.I. Katsy [et al.] // Microbiology. – 2010. – Vol. 79. – P. 216–222.
13. Katsy, E.I. Plasmid plasticity in the plant-associated bacteria of the genus *Azospirillum* [Текст] / E.I. Katsy; ed. D.K. Maheshwari // Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses. – Berlin [etc.]: Springer, 2011. – P. 139–157.
14. Katsy, E.I. Plasmids as indispensable components of *Azospirillum* genomes [Текст] / E.I. Katsy; eds. F.E.R. Gonzales, M.I. Lopez // Plasmids: Genetics, Applications and Health. – New York: Nova Science Publishers, 2012. – P. 57–77.
15. Katsy, E.I. Involvement of a 120-MDa plasmid of *Azospirillum brasilense* Sp245 in production of lipopolysaccharides [Текст] / E.I. Katsy [et al.] // Plasmid. – 1998. – Vol. 40. – P. 73–83.
16. Knirel, Y.A. Structure of O-antigens [Текст] / Y.A. Knirel; eds Y.A. Knirel, M.A. Valvano // Bacterial lipopolysaccharides: structure, chemical synthesis, biogenesis and interaction with host cells. – Berlin [etc.]: Springer, 2011. – P. 41–116.
17. Matora, L.Yu. Study of immunochemical heterogeneity of *Azospirillum brasilense* lipopolysaccharides [Текст] / L.Yu. Matora, G.L. Burygin, S.Yu. Shchyogolev // Microbiology. – 2008. – Vol. 77. – P. 166–170.
18. Petrova, L.P. Analysis of DNA, a number of cultural and morphological properties, and lipopolysaccharide structure in closely related strains of *Azospirillum brasilense* [Текст] / L.P. Petrova [et al.] // Microbiology. – 2005. – Vol. 74. – P. 188–193.
19. Petrova, L.P. Plasmid rearrangements in *Azospirillum brasilense* [Текст] / L.P. Petrova, I.V. Borisov, E.I. Katsy // Microbiology. – 2005. – Vol. 74. – P. 495–497.
20. Petrova, L.P. Plasmid rearrangements and alterations in *Azospirillum brasilense* biofilm formation [Текст] / L.P. Petrova, A.V. Shelud'ko, E.I. Katsy // Microbiology. – 2010. – Vol. 79. – P. 121–124.
21. Rademaker, J.L.W. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR fingerprinting [Текст] / J.L.W. Rademaker, F.J. Louws, F.J. de Bruijn; eds. A.D.L.

- Akkermans [et al.] // *Molecular Microbial Ecology Manual*. – Dordrecht: Kluwer, 1998. – Suppl. 3. – P. 1–26.
22. Tarrand, J.X. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. [Текст] / J.X. Tarrand, N.E. Krieg, J. Döbereiner // *Can. J. Microbiol.* – 1978. – Vol. 24. – P. 967–980.
23. Vanbleu, E. Structural analysis of the pRhico plasmid of *Azospirillum brasilense* Sp7 and phenotypical characterization of pRhico genes involved in cell surface composition [Текст]: PhD Thesis. – Leuven, 2005. – 157 p.
24. Wisniewski-Dyé, F. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments [Текст] / F. Wisniewski-Dyé [et al.] // *PLoS Genetics*. – 2011. – Vol. 7. – P. e1002430.

УДК 631.421.1

КЛОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ *VIVIPAROUS-1* У ДИКОРАСТУЩИХ СОРОДИЧЕЙ ПШЕНИЦЫ

Кочешкова А.А., Дивашук М.Г., Крупин П.Ю., Карлов Г.И.

Центр молекулярной биотехнологии. ФГБОУ ВПО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», г. Москва, Россия, e-mail: alina.kocheshkova@gmail.com

Введение

Предуборочное прорастание зерновых является проблемой, которая приводит к потерям урожая и качества конечной продукции [1]. Предуборочное прорастание, как правило, возникает в ответ на влажные условия и связано с ранним прерыванием покоя семян. [2] Ген *Viviparous-1(Vp-1)* является основным регулятором позднего развития эмбриона у многих злаковых культур и имеет две различные функции: обеспечение созревания зародыша и регуляция перехода в покой. [2,3]. У мягкой пшеницы были клонированы и секвенированы три гена гомолога *Vp-1* и показано, что каждый из них потенциально кодирует полноразмерную цепь аминокислот [4]. У устойчивых к предуборочному прорастанию генотипов каждый из генов *Vp-1* функционирует как транскрипционный фактор и играет важную роль в детерминации покоя семян, тогда как у высокочувствительных к прорастанию сортов их роль менее значительна [5]. McKibbin и др. (2002) сообщили, что неправильный сплайсинг пре-мРНК *TaVp1* происходит вокруг домена В3, приводя к синтезу абберантных мРНК с наличием стоп-кодонов в открытой рамке считывания (*ORF*) [6]. Неправильный сплайсинг был также обнаружен в большинстве последовательностей гена *Vp-1* у диплоидных и тетраплоидных предков мягкой пшеницы, это позволяет предположить, что пшеница унаследовала его структуру еще до доместикации [7].

Анализ структуры и функционирования гена *Vp-1* у различных злаков может дать новые сведения о механизмах взаимодействия генетических систем в организме, а также понять принципы регуляции важнейшего процесса – толерантности к прорастанию на

корню. Все это в целом позволит разработать биоинженерные и другие подходы к регуляции прорастания зерновых на корню.

Таким образом, исследования гена *Vp1* у диких сородичей пшеницы могут послужить как для изучения функционирования данного гена у различных видов, что приблизит нас к пониманию всех сторон его функциональных особенностей, так и в дальнейшем для направленного трансгенеза или отдаленной гибридизации для интрогрессии в пшеницу генов, обеспечивающих устойчивость её к прорастанию на корню. Ранее, нами были клонированы и секвенированы участки генов-ортологов *Vp-1* включающие два последних интрона и экзона генов [8, 9].

Целью нашей работы было клонирование, секвенирование и сравнительный анализ четвертого-пятого экзонов и третьего-четвертого интронов гена *Vp-1* у следующих видов дикорастущих сородичей пшеницы: *Thinopyrum elongatum*, *Pseudoroegneria stripifolia*, *Dasypyrum villosum*, *Thinopyrum bessarabicum*, *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum ponticum*.

Материалы и методы

Растительный материал. В работе использовали образцы *Thinopyrum elongatum* (PI 401007), *Pseudoroegneria stripifolia* (W621759), *Dasypyrum villosum* (W621717), *Th. bessarabicum* (PI 531711), *Th. intermedium* PI 547312 и *Th. ponticum* PI 401200 полученные из Germplasm Research International Network.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из молодых листьев и корешков по ранее описанным методикам [8].

ПЦР, клонирование, секвенирование. В работе использовались прямой праймер на ген *Vp-1* пшеницы Vp-1A2F и обратные праймеры подобранные нами на сиквенсы полученные для каждого отдельного вида в предыдущих работах.

Лигирование амплифицированной ДНК осуществляли с помощью pGEM®-T Easy Vectors. Секвенирование выделенных нами плазмид с клонированными последовательностями гена *Vp-1* различных видов дикорастущих злаков осуществлялась на приборе «3130 Genetic Analyzer». Проведение реакции секвенирования осуществлялось с использованием коммерческого набора реагентов для секвенирования ДНК Big Dye Terminator v3.1 Sequencing RR-100 и по протоколам рекомендуемым производителями.

Результаты и обсуждение

На основе нуклеотидных последовательностей гена *Vp-1* полученных нами на предыдущих этапах исследования были разработаны молекулярные маркеры специфичные для каждого вида. В качестве прямого праймера был использован праймер разработанный на ген *Vp1* пшеницы Vp-1A1F.

Нами были клонированы последовательности со следующих видов: *Thinopyrum intermedium* (JJ^SJ^SSS, 2n = 6x = 42), *Thinopyrum elongatum* (EE, 2n = 2x = 14), *Thinopyrum bessarabicum* (E_bE_b, 2n = 2x = 14), *Thinopyrum ponticum* (JJJJJ^SJ^SJ^SJ^S, 2n = 10x = 70), *Pseudoroegneria stripifolia* (S_tS_t 2n = 2x = 14), *Dasypyrum villosum* (VV, 2n = 2x = 14). После проведения секвенирования клонов нами были получены нуклеотидные последовательности, включающие в себя четвертый и пятый экзоны и третий и четвертый интроны гена *Vp-1*.

Для образцов *Thinopyrum elongatum* была получена нуклеотидная последовательность 903 п.н. После секвенирования клонов относящихся к третьему региону гена *Vp-1* вида *Pseudoroegneria stripifolia* была получена нуклеотидная последовательность 1074 п.н. Для разных растений *Dasypyrum villosum* были получены различные нуклеотидные последовательности, которые укладывались в два варианта 957 п.н. и 898 п.н., поэтому мы выделили у *D. villosum* два гаплотипа этого участка гена *Vp-1*. Для образцов *Thinopyrum bessarabicum* были получены различные нуклеотидные последовательности, которые объединялись в две группы 901 п.н. и 921 п.н., поэтому были выделены два аллеля третьего региона гена *Vp-1*. Для образцов *Thinopyrum intermedium* были получены сиквенсы, которые укладывались в шесть вариантов, поэтому мы посчитали целесообразным выделить шесть

гаплотипов этого участка гена *Vp-1*. Для образцов *Thinopyrum ponticum* были получены нуклеотидные последовательности, которые укладывались в четыре варианта. Однако у двух из них были выявлены стоп-кодоны в области экзонов, поэтому у пырея понтийского нами было выделено два гаплотипа гена *Vp-1*.

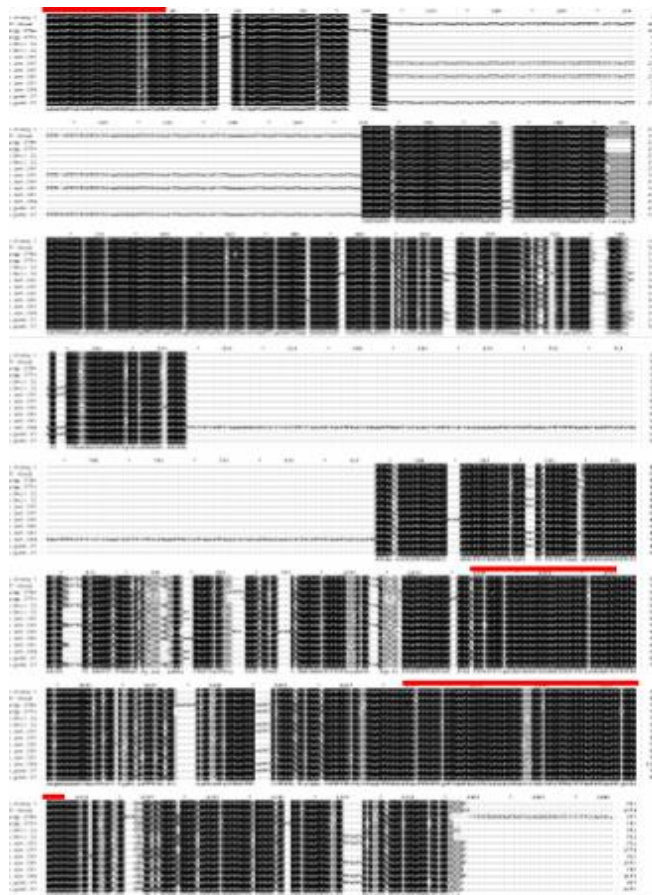


Рисунок 1. Выравнивание полученных нами последовательностей участка гена *Viviparous* у диких сородичей пшеницы. Красным цветом обозначены экзоны.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей полученных нами для гена *Vp-1* на шести видах злаковых представлено на рисунке 1. С помощью анализа в программе BlastX нами были выделены возможные экзоны и интроны. Вариативность в области экзонов определялась лишь одно-нуклеотидными заменами у отдельных видов или гаплотипов. При этом структура интронов значительно различалась как между различными видами, так и внутри одного вида по гаплотипам. Следует отметить, что определенный полиморфизм в интронах у белозерных сортов пшеницы вызывает различия в устойчивости к прорастанию на корню, что связывают с альтернативным сплайсингом [6]. Следовательно, на функционирование гена *Vp-1* оказывает влияние не только информация закодированная в экзонах, но и полиморфизм в интронах.

Выводы:

Получены сиквенсы ортологов гена *Viviparous-1* у 6 видов дикорастущих сородичей пшеницы, которые имеют высококонсервативные последовательности в области экзонов и полиморфны в области интрона.

Выделены по одному гаплотипу *Thinopyrum elongatum* и *Thinopyrum ponticum*, два аллельных варианта у *Dasypirum villosum*, *Thinopyrum bessarabicum* и *Thinopyrum ponticum*. У *Thinopyrum intermedium* выделено шесть гаплотипов.

Литература

1. Chang C., Feng J.M., Si H.Q., Yin B., Zhang H.P., and Ma C.X. (2010) Validating a novel allele of *viviparous-1*(*Vp-1Bf*) associated with high seed dormancy of Chinese wheat landrace, *Wanxianbaimaizi Molecular Breeding*, 25 - P. 517-525
2. Xia, L. Q., Y. Yang, Y. Z. Ma, X. M. Chen, Z. H. He, M. S. Röder, H. D. Jones, P. R. Shewry (2009) What can the *Viviparous-1* gene tell us about wheat pre-harvest sprouting. *Euphytica* 168: 385-394.
3. Zentella R., Yamauchi D., Ho T.H. (2002) Molecular dissection of the gibberellin/abscisic acid signaling pathways by transiently expressed RNA interference in barley aleurone cells. *Plant Cell*. 14, 2289-2301.
4. Gomez-Cadenas, A., Zentella, R., Walker-Simmons, M. K., and Ho, T. H. (2001) Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* 13, 667-679.
5. Крупнов В.А., Сибикеева С.Н., Крупнова О.В. (2010) Генетический контроль покоя и устойчивости к предуборочному прорастанию семян у пшеницы. *С.-х. биол.*, 3: 3-16.
6. McKibbin, R. S., Wilkinson, M. D., Bailey, P. C., Flintham, J. E., Andrew, L. M., Lazzeri, P. A., Gale, M. D., Lenton, J. R., and Holdsworth, M. J. (2002) Transcripts of *Vp-1* homeologues are misspliced in modern wheat and ancestral species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10203-10208.
7. Yang Y., Zhao X.L., Xia L.Q., Chen X.M., Xia X.C., Yu Z., He Z.H., Roder M. (2007) Development and validation of a *Viviparous-1* STS marker for pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats. *Theor. Appl. Genet.* 115: 971-980
8. Дивашук М.Г., Крупин П.Ю., Фесенко И.А., Коротаева А.С., Разумова О.В., Карлов Г.И. Клонирование и анализ интрон-экзонного участка гена *VIVIPAROUS1* у *Thinopyrum intermedium* и *Thinopyrum ponticum*. *Современные проблемы науки и образования*. 2011. № 4. С. 49-49.
9. Дивашук М.Г., Крупин П.Ю., Фесенко И.А., Карлов Г.И. Клонирование и анализ интрон-экзонного участка генов ортологов гена *VIVIPAROUS* некоторых видов диких сородичей пшеницы. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2010. № 2. С. 76-81.

УДК 577.321:577.214:57.052

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ КРОССИНГОВЕРА У ГИБРИДОВ ТОМАТА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ *SPO11-1 A.THALIANA* И *SPO11 S.CEREVISIA*, И СЕГРЕГАЦИИ АЛЛЕЛЕЙ СРЕДИ ИХ ПОТОМСТВА

Комахин Р.А., Милюкова Н.А., Комахина В.В., Криницына А.А., Левина Т.А., Жученко А.А.

ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Россия 127550,
г. Москва, ул. Тимирязевская д.42, e-mail: recombination@iab.ac.ru

Мейотическая рекомбинация играет центральную роль в эволюции эукариотических организмов и является основным источником генетической изменчивости в потомстве гибридов, лежащим в основе традиционных методов селекции растений. Управление мейотической рекомбинацией в селекции растений необходимо для повышения эффективности получения генотипов, содержащих нетрадиционные комбинации генов, а

также для направленного переноса генов из генома дикорастущих видов в хромосомы культурных растений. Выяснение базовых принципов работы молекулярных механизмов мейотической рекомбинации и их регуляции позволит разработать новые подходы для управления биологической изменчивостью в потомстве гибридов.

В мейозе генетическое разнообразие генерируется тремя принципиальными механизмами. Первый механизм основан на независимой рекомбинации гомологичных хромосом при формировании гаплоидных гамет, является основой менделеевской генетики. Два остальных механизма иницируются в мейозе с помощью двухцепочечных разрывов (ДЦР) ДНК, которые по всему геному создаются при участии мейозо-специфичных эндонуклеаз Spo11 [7]. Пути репарации ДЦР с помощью гомологичной рекомбинации расходятся и приводят к разным мейотическим рекомбинационным продуктам. Один путь, известный как double-strand break repair (DSBR), ведет к кроссинговеру (CO), который характеризуется реципрокными обменами между хромосомами, необходимыми для установки физического соединения (хиазм) между гомологами и их правильной сегрегации в анафазе I. Кроссинговер способствует генетическому разнообразию среди потомства путем создания новых комбинаций аллелей, но не влияет на их частоту в популяциях. Второй путь synthesis-dependent strand annealing (SDSA) в результате нереципрочного обмена генетической информацией между хромосомами приводит к некроссоверным рекомбинационным событиям (NCOs) и к отклонениям в наследовании аллелей в популяциях. DSBR и SDSA взаимосвязаны и, возможно, вступают в конкурентные отношения, в основе которых лежит расположение ДЦР вдоль хромосом и частоты их возникновения, которые влияют на характер распределения COs и NCOs, хотя известно, что соседние ДЦР значительно меньше вмешиваются в формирование смежных ДЦР, чем соседние COs [8]. В связи с этим представляет интерес возможность целевого воздействия на мейотические рекомбинационные события на этапе формирования ДЦР с помощью изменения экспрессии генов мейозо-специфичных эндонуклеаз Spo11.

Целью данной работы было изучение эффектов от экспрессии генов *Spo11-1 Arabidopsis thaliana* и *SPO11 Saccharomyces cerevisiae* на мейотические рекомбинационные события у гибридов томатов и на сегрегацию аллелей среди их потомства.

Материалы и методы

Ген *SPO11 S. cerevisiae* был клонирован нами ранее [1]. Ген *SPO11-1 A. thaliana* был любезно предоставлен М. Grelon [6]. Гены *SPO11 S. cerevisiae (scSPO11)* и *SPO11-1 A. thaliana (atSPO11-1)* были клонированы в созданную ранее плазмиду p35S-recA [2], с получением плазмид p35S-scSPO11 и p35S-atSPO11-1, в которых их экспрессия контролировалась конститутивным промотором 35S РНК CaMV. В качестве растительных объектов использованы гомозиготные растения томата сорта Маргلوب (*Aw*, *D* и *Wv*) и линии Mo938 (*aw*, *d* и *wv*), содержащие во второй хромосоме маркерные локусы, имеющие у гибридов F₁ взаимное расположение (*Wv:wv*)-(*D:d*)-(*Aw:aw*) [4]. Трансформацию растений томата проводили согласно опубликованным ранее данным [2].

Результаты и обсуждение

Для получения трансгенных растений, экспрессирующих гены *scSPO11* и *atSPO11-1*, была проведена агробактериальная трансформация семядольных эксплантов томата сорта Маргلوب с использованием плазмид p35S-scSPO11 и p35S-atSPO11-1. В результате с применением каждой генетической конструкции было получено по 27 независимых регенерантов, устойчивых к канамицину в концентрации 100 мг/л. Молекулярно-биологический анализ ДНК регенерантов, проведенный с помощью ПЦР, позволил отобрать из их числа по 19 трансформантов, обозначенных как T₀-scSPO11 и T₀-atSPO11-1, содержащих последовательность целевых генов *scSPO11* или *atSPO11-1*. Анализ тотальной

РНК трансформантов с использованием метода обратной транскрипции с последующей амплификацией кДНК выявил как среди T₀-scSPO11, так и T₀-atSPO11-1, по 16 растений, содержащих мРНК генов *scSPO11* или *atSPO11-1* [3].

Практически все трансгенные растения, экспрессирующие гены *scSPO11* и *atSPO11-1*, морфологически не отличались от нетрансгенных растений сорта Маргلوب, за исключением двух растений T₀-atSPO11-1, на которых не развивались бутоны. Отсутствие явных морфологических различий, вероятно, было связано с тем, что белковые продукты генов *scSPO11* и *atSPO11-1* функциональны только в мейозе или в соматических клетках результаты их активности полностью устраняются репарационными системами.

Для оценки влияния экспрессии генов *scSPO11* или *atSPO11-1* на наследование маркерных генов второй хромосомы томата и кроссинговер между ними растения T₀-scSPO11 и T₀-atSPO11-1 были опылены пыльцой линии Мо938, содержащей во второй хромосоме маркерные рецессивные гены. В результате гибридизации были получены популяции семян F₁ от восьми растений T₀-scSPO11 и семи растений T₀-atSPO11-1. Для последующих исследований были отобраны максимальные по численности популяции, а именно, F₁-scSPO11 № 6, 11, 16 и F₁-atSPO11-1 № 6, 19 и 24.

Молекулярно-биологический анализ ДНК гибридов F₁ позволил отобрать растения, содержащие целевые гены *scSPO11* или *atSPO11-1*. Кроме того, были отобраны нетрансгенные растения F₁, обозначенные как контроль, полученные в результате расщепления при наследовании целевых генов [5].

Методом обратной транскрипции тотальной РНК с последующей амплификацией кДНК было показана экспрессия целевых генов у всех трансгенных гибридов, обозначенных как F₁-scSPO11 и F₁-atSPO11-1 [5]. Со всех трансгенных и контрольных гибридов томата, которые были выращены в теплице в одно время, были получены семена от самоопыления.

Нельзя было исключить предположения, что экспрессия генов *scSPO11* или *atSPO11-1* под контролем сильного и конститутивного промотора CaMV 35S могла приводить к появлению ДЦР в ядрах спермиев или яйцеклеток. Как известно, для репарации ДЦР требуются гомологичные хромосомы, которых нет в гаплоидном наборе гамет. Этот процесс неминуемо привел бы к элиминации трансгенных гамет и к нарушению наследования *scSPO11* или *atSPO11-1* в потомстве гибридов. Для того, чтобы выяснить наследование генов *scSPO11* и *atSPO11-1*, а также для определения числа локусов интеграции Т-ДНК и отсутствия ее локализации во второй хромосоме, было проанализировано с помощью ПЦР по одной популяции F₂ от каждого трансгенного гибрида [5]. Установлено, что три четверти растений в каждой популяции F₂ были трансгенными, следовательно, гены *scSPO11* и *atSPO11-1* нормально передаются потомству, как по материнской, так и по отцовской линии и у всех трансгенных гибридов присутствует инсерция Т-ДНК только в одном локусе генома [5]. Также было показано, что в потомстве всех трансгенных гибридов гены *scSPO11* и *atSPO11-1* наследуются независимо относительно маркерных локусов, т.е. не сцеплены с ними, следовательно, с вероятностью 95 % трансгенные гибриды не содержат инсерции Т-ДНК второй хромосоме.

С целью анализа наследования маркерных генов было проверено соответствие сегрегации аллелей маркерных генов закону Менделя, в соответствии с которым три четверти популяции F₂ должны были иметь доминантные признаки и одна четверть рецессивные. Установлено, что в среднем у 18% популяций F₂ от гибридов F₁-scSPO11 и F₁-atSPO11-1 отсутствовала ожидаемая сегрегация аллелей хотя бы в одном локусе. Причем нарушения сегрегации аллелей в основном затронули локусы *Wv:wv* и *D:d*, но не *Aw:aw*.

Результаты сравнительного анализа г_f между локусами оказались во многом неожиданными (табл.).

Таблица.

Частота рекомбинации между маркерными локусами второй хромосомы у гибридов F₁, экспрессирующих гены *scSPO11* и *atSPO11-1*, и контрольных гибридов

Целевой ген	Гибрид F ₁		Rf ^{wv-d} , %	Rf ^{d-aw} , %
<i>scSPO11</i>	6	1	25.4	38.7
		7	20.8	47.7
		11	19.7	43.1
	11	1	18.9	49.0
		4	19.2	43.6
	16	1	26.0	45.8
		2	22.7	43.8
	всего			21.9±1.0*
<i>atSPO11-1</i>	6	1	28.8	50.7
		6	17.9	53.1
	19	4	18.6	43.3
		7	21.1	43.0
		8	22.8	45.3
	24	4	18.5	46.1
		7	22.2	46.5
		9	26.0	45.3
	всего			22.8±1.1*
контроль	11	3	27.0	47.2
	16	8	27.0	48.4
	6	2	26.4	45.8
	19	2	27.5	42.5
	24	2	25.4	45.2
	всего			26.6±0.3

* - значения, существенно отличающиеся от контроля при p≤0.05.

Как следует из таблицы, частота rf между генами *wv* и *d* не отличалась среди трансгенных гибридов F₁-*scSPO11* (21.9 %) и F₁-*atSPO11-1* (22.7 %), но была существенно ниже, чем у контроля (25.8 %). Хотя некоторые трансгенные гибриды, F₁-*scSPO11* № 6-1 и 16-1, F₁-*atSPO11-1* № 6-1 и 24-9, не отличались от контроля. Возможно, это было обусловлено уровнем экспрессии у гибридов F₁ генов *scSPO11* или *atSPO11-1*, или определялось влиянием других факторов, например, наличием аллелизма среди генов, участвующих у томата в мейотической рекомбинации.

Анализ rf на другом участке второй хромосомы, между генами *aw* и *d* не выявил отличий между трансгенными и контрольными растениями томата, поскольку у всех гибридов она составляла 44-46 %.

Заключение

Экспрессия генов *scSPO11* или *atSPO11-1* под контролем вирусного 4промотора привела к отклонениям в сегрегации аллелей в локусах *Wv:wv* и *D:d*, но не *Aw:aw*. Ранее в аналогичной комбинации скрещивания мы не наблюдали нарушения сегрегации во всех маркерных локусах [4]. Экспрессия генов *scSPO11* и *atSPO11-1* одновременно привела к уменьшению кроссинговера на участке *wv-d*, но не *aw-d*. Заметим, что ранее не было

зафиксировано уменьшения кроссинговер на участке *wv-d* ни у трансгенных, ни у контрольных гибридов томатов [4].

Таким образом, экспрессия генов *scSPO11* или *atSPO11-1* селективно подавляет кроссинговер на участке *wv-d* второй хромосомы томата, одновременно приводя к нарушению сегрегации аллелей в локусах *Wv:wv* и *D:d*. При этом не имеет значение, какой именно трансген был экспрессирован: растительный *atSPO11-1* или дрожжевой *scSPO11*.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 11-04-00873-а.

Литература

1. Комахин, Р.А. Компартиментализация Spo11p в вегетативных клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*/ Р.А. Комахин, В.В. Комахина// Молекулярная биология – 2008. – Т.42., №3. – С. 494-500.
2. Трансгенные растения томата, экспрессирующие гены *recA* и *NLS-recA-licBM3*, как модель для изучения мейотической рекомбинации/ Р.А. Комахин, В.В. Комахина, Н.А. Милюкова и др.// Генетика. – 2010. – Т. 46, №12. – С. 1635-1644.
3. Создание трансгенных гибридов томата, экспрессирующих гены мейоз-специфичных эндонуклеаз *SPO11 Saccharomyces cerevisiae* или *SPO11-1 Arabidopsis thaliana* / Р.А. Комахин, В.В. Комахина, Н.А. Милюкова и др.// Современные аспекты генетической инженерии растений: матер. междунар. науч. конф. – Киев, 2011. – С.33.
4. Комахин, Р.А. Анализ частоты мейотической рекомбинации у трансгенных гибридов томата, экспрессирующих гены *recA* и *NLS-recA-licBM3*/ Р.А. Комахин, В.В. Комахина, Н.А. Милюкова, А.А. Жученко// Генетика. – 2012(а). – Т.48, №1. – С. 30-39.
5. Наследование генов мейоз-специфичных эндонуклеаз *SPO11 Saccharomyces cerevisiae* и *Spo11-1 Arabidopsis thaliana* в потомстве трансгенных растений томата / Р.А. Комахин, Н.А. Милюкова, В.В. Комахина и др.// Достижения и проблемы генетики, селекции и биотехнологии: сб. матер. IX съезда Украинского общества генетиков и селекционеров им. М.И. Вавилова. – 2012(б). – Т. 3. – С. 101-106.
6. Grelon, M. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants/ M. Grelon, D. Vezon, G. Gendrot, G. Pelletier// EMBO J. – 2001. – Vol. 20, №3. – P. 589-600.
7. Keeney, S. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family / S. Keeney, C.N. Giroux, N. Kleckner// Cell. – 1997. – Vol. 88, №3. – P. 375-384.
8. Gene conversion and crossing over along the 405-kb left arm of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VII/ A. Malkova, J. Swanson, M. German, J.H. McCusker et al.// Genetics. – 2004. – Vol. 168, №1 – P. 49-63.

УДК 574:581.5:579.2

ЗАВИСИМОСТЬ СТРУКТУРЫ СООБЩЕСТВ РИЗОСФЕРНЫХ ГРИБОВ ДИКОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ ОТ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК ГЕНОВ 18S -РРНК

Налян А.Г.*, Ибрагимов Р.И.^, Ван-Клей Д.*, Ван-Клей А.*

* Государственный Университет им. Стивена Остина, Техас, США

^ Башкирский Государственный Университет, Уфа, Россия

Пиросеквенированию были подвергнуты образцы ДНК, выделенные из ризосферы (почва и корни) 3-х видов растений-хозяев, отобранных с 9 участков, представляющих различные типы ландшафта естественного леса в восточной части штата Техас (США). Экспериментальные участки для отбора образцов почвы и растений (размер участка 1000 м²) были подобраны в соответствии с разработанной экологической системой классификации национальных лесов западных прибрежных равнин США (Turner, 1999; Van Kley et al., 2007). Участки леса располагались в одной из трех основных типов ландшафта: умеренно-сухие возвышенности с преобладанием сосны с песчаными, глинистыми, суглинистыми почвами (ВПС); умеренно пологие склоны, днище потоков, овраги (УС) и затопляемые поймы рек (ЗП). На каждом участке были определены параметры, отражающие относительное расположение экспериментального участка РСТРОС, (угол склона, высоту над уровнем моря), а также физические и химические параметры почвы: относительное содержание глины, песка, содержание минеральных элементов (N, Mg, K, P, Ca, S), кислотность. Коэффициент РСТРОС определяли по следующей формуле: $100 \times (h_s - h_L) / (h_H - h_s)$, где h_s – высота изучаемого участка, h_L – высота самой низкой точки в радиусе 1 км, h_H – высота самой высокой точки в радиусе 1 км.

В результате пиросеквенирования было получено более 160 тысяч различных последовательностей генов грибов (18S рРНК). Образцы ДНК ризосферы каждого растения - хозяина, по количеству последовательностей генов 18S рРНК статистически не различались ($P = 0,4$), что позволило сравнить ризосферы по относительному обилию таксонов грибов. В таблице 1 представлены данные об относительной доле представителей различных типов грибов в ризосферных сообществах изученных растений. Как видно, наибольшее распространение, имели представители типа *Ascomycota*. Относительная доля микроорганизмов этого типа в изученных образцах ризосферы составляла более 96 %. При этом, ризосферы изученных растений по относительному обилию грибов *Ascomycota* существенно не различались. Представители других типов грибов в ризосфере растений присутствовали в значительно меньших количествах: *Glomeromycota* ~ 5 %, *Basidiomycota* – 0,4 - 1 %, *Chytridiomycota* - 0,1 - 0,38 %. Необходимо отметить, что ризосферы изученных растений имеют значительные различия по относительному изобию грибов этих типов. Так, в ризосфере *S. americana* коэффициент обилия типа *Glomeromycota* был в пять раз выше, чем аналогичный коэффициент типа *Chytridiomycota*. Также этот коэффициент у *S. americana* оказался в пять раз выше, чем коэффициенты обилия грибов *Glomeromycota* в ризосфере двух других видов растений. Представители типа *Basidiomycota* преимущественно были выявлены в ризосфере *S. sessiliflorum*. Коэффициент относительного обилия таксонов с неопределенным систематическим положением было сравнительно одинаковым для всех изученных растений.

Анализ относительного типового обилия грибов при помощи неметрического многомерного масштабирования показал, что сообщества ризосферных грибов изученных растений существенно различаются по составу (по относительному количеству таксонов).

Это видно из рисунка 1, где образцы из ризосферы *T. radicans* расположены в нижней части ординации, образцы из ризосферы *C. sessiliflorum* - в средней части, и образцы из ризосферы *C. americana* - в верхней части диаграммы. Таким образом, разделение образцов по вертикальной оси ординат демонстрирует гетерогенность грибных сообществ в ризосферах изученных растений. Также видно, что ризосфера *C. sessiliflorum* богата представителями типа *Glomeromycota*, в тоже время для ризосфер *T. radicans* и *C. americana* характерно высокое обилие грибов, относящихся к типам *Ascomycota* и *Basidiomycota*. Регрессионный анализ экологических факторов показал, что статистически значимое влияние на состав грибных сообществ (на уровне типов) в ризосферах оказывают: кислотность почвы ($P = 0,042$), содержание песка ($P = 0,038$), РСТРОС ($P = 0,008$), топовлажность ($P = 0,002$), тип ландшафта ($P = 0,041$). Необходимо отметить, что разделение образцов по видам растений на диаграмме было не полным и несколько образцов из разных ризосфер имели сходную структуру грибных сообществ.

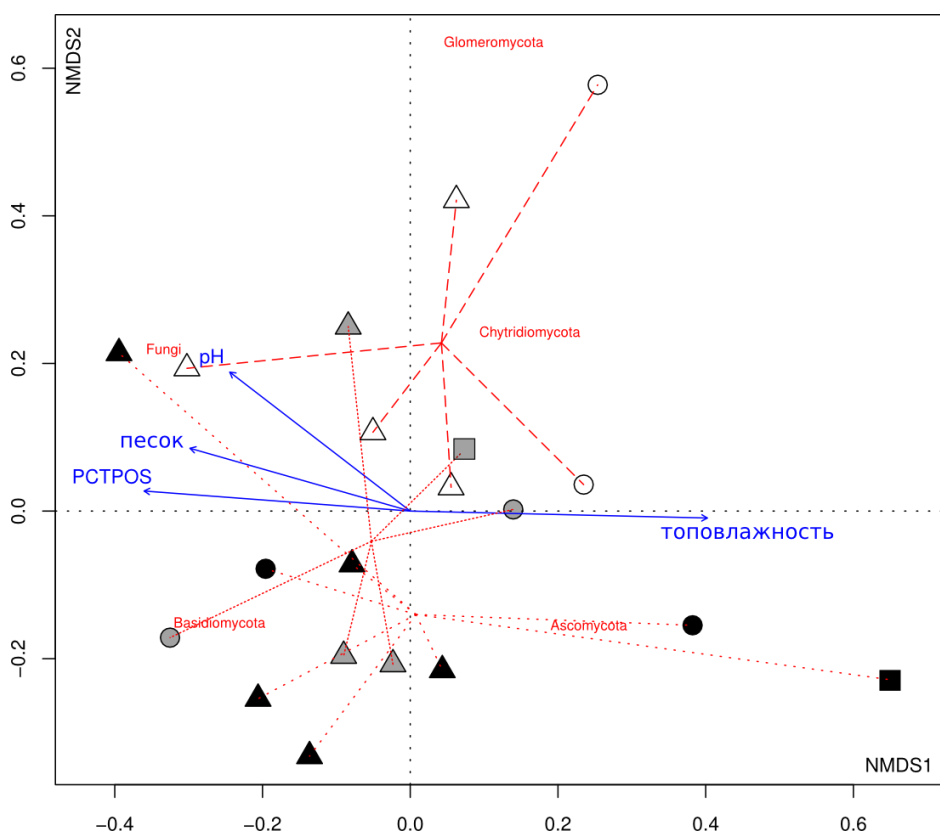


Рис. 1. Результаты неметрического многомерного масштабирования (NMDS) относительной доли обилия типов грибов с использованием коэффициента сходства Брея-Куртиса. Образцы из УС показаны кружками, образцы из ВПС показаны как треугольники, и ЗП как квадраты.

Примечание: Черный цвет - *T. radicans*, серый цвет - *C. sessiliflorum*, белый цвет - *C. americana*. Стрелки показывают направления увеличения значений градиентов.

Этот факт свидетельствует о том, что наряду с фактором растения-хозяина, существенное влияние на формирование структуры микробных сообществ в ризосфере оказывают и экологические факторы. Полученные в результате пиросеквенирования последовательности выявленных типов грибов были подвергнуты дальнейшему анализу.

Таким образом, анализ ДНК методом пиросеквенирования показал высокий уровень генетического разнообразия грибных сообществ в ризосфере дикорастущих растений. В ризосферах *C. americana*, *C. sessiliflorum*, *T. radicans* нами выявлены пять из семи известных типов грибов. Часть обнаруженных последовательностей таксономически не удалось

идентифицировать. Наиболее распространенным типом грибов, равномерно распределенным в ризосферах всех изученных растений, оказались представители типа *Ascomycota*. Относительное обилие типов *Glomeromycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* в почвенных сообществах было невысоким. Наибольшее обилие АМ грибов (*Glomeromycota*) было выявлено в ризосфере *S. americana*. Существенное влияние на формирование структуры микробных сообществ в ризосфере растений оказывает фактор растения-хозяина и специфические экологические факторы. Была определена степень влияния различных экологических факторов на состав и структуру сообществ грибов различных таксономических групп. Состав и структура сообществ *Ascomycota* в наибольшей степени определяются факторами растения-хозяина и содержанием фосфатов в почве. В сообществах *Basidiomycota* доминирующими факторами оказались тип ландшафта и топовлажность. Для грибов *Glomeromycota*, кроме этих двух факторов, важным оказался фактор растения-хозяина. Таксономический состав и структура сообществ грибов типа *Chytridiomycota* в значительной степени зависели от содержания в почвах глины и песка.

УДК 632.7.05

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ИНСЕКТИЦИДАМ В ПОПУЛЯЦИЯХ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА НА ЮЖНОМ УРАЛЕ

Пенкин Л.Н.* , Китаев К.А., Сурина Е.В., Беньковская Г.В.

*Башкирский государственный университет
Институт биохимии и генетики УНЦ РАН

Колорадский жук - вид с продолжающимися процессами видообразования, характеризуется значительным внутривидовым полиморфизмом и экологической пластичностью [1]. Это позволяет ему успешно адаптироваться, в том числе и к антропогенным воздействиям - у колорадского жука на большей части его ареала развилась резистентность почти ко всем используемым на настоящий момент и применявшимся ранее инсектицидам [2].

Заселение территории Южного Урала колорадским жуком проходило в период с 1976 по 1979 гг. [3]. На протяжении этого времени с вредителем вели борьбу с помощью хлорорганических инсектицидов (гамма-изомер ГХЦГ, полихлоркамфен, дилор, деспируль и др.) и фосфорорганических (хлорофос, волатон, дибром, фталофос, фозалон и др.). С 80-х гг. - препаратами из класса синтетических пиретроидов. Исходно заселившие территорию Башкортостана жуки были чувствительны к инсектицидам, и одной - двух обработок за сезон было достаточно для сдерживания численности вредителя [6,8]. К 1996 г. у вредителя начала формироваться устойчивость к пиретроидам: было отмечено появление высокоустойчивых особей. В последующем было показано, что в Башкортостане долговременные бессменные обработки привели к появлению особей с высокой резистентностью [7].

Цель работы: оценка современного состояния резистентности колорадского жука к ряду инсектицидов на Южном Урале. Прослеживание изменения устойчивости к различным классам инсектицидов на протяжении ряда лет.

В качестве объекта исследований были использованы перезимовавшие имаго

колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae) за период 2005 – 2012 гг. Сбор проводили вручную с посадок картофеля на территории Южного Урала (Республика Башкортостан). В экспериментах использовали препараты из нескольких классов соединений - фосфорорганических (актеллик, д.в. - пиримифос-метил, КЭ 500 г/л), пиретроидных (децис, д.в. - дельтаметрин, КЭ 2.5 г/л), неоникотиноиды (актара, д.в. - тиаметоксам, ВДГ 250 г/кг и моспилан, д.в. - ацетамиприд, РП 200 г/кг), нереистоксинов (банкол, д.в. – бенсултап, СП 500г/кг) а так же нового класса фенилпиразолов (регент, д.в. – фипронил, ВДГ 800 г/кг) [4].

Обработку инсектицидами проводили топикальным методом [9]. рабочими растворами в дозе 1 мкл/особь. Растворы наносили микрошприцом марки МШ-1 на вентральную область переднегруди.

Выявление доли устойчивых колорадского жука к инсектицидам проводили с использованием установленной диагностической концентрации (ДК) выбранных препаратов (удвоенное значение $СК_{95}$). Количество (%) выживших особей в экспериментах с применением ДК препаратов принимали за основу для расчётов соотношений чувствительных и резистентных генотипов в локальных популяциях. Долю выживших после обработки диагностической дозой инсектицида считали частотой проявления резистентного генотипа.

Для исследования закономерностей пространственного распределения резистентных генотипов использовали Мантель-тест в программе Passage. Генетическое расстояние между популяциями считали по доле устойчивых особей. Расстояние вычислялось по метрике Эвклида (геометрическое расстояние).

Результаты токсикологических экспериментов за 2005 – 2012 показали, что в отдельные годы доля резистентных особей может сильно варьировать. По данным, приведённым в табл. 1 мы видим, что резистентность к фосфорорганическим инсектицидам у колорадского жука повсеместно распространилась. За наблюдаемый период доля устойчивых особей достигает 90%, но в тоже время в 2010 году их доля составила 21%. Одновременно мы наблюдаем резкое увеличение доли устойчивых к пиретроидам особей, до 61%, которая в 2011 продолжает повышаться и достигает более 80%. Устойчивость к другим классам инсектицидов так же широко варьируется, но как мы видим к неоникотиноидам она не превышает показателя 2009 года в 49%. Высокие показатели устойчивости наблюдаются и к классу нереистоксинов, до 80% в 2009. Несмотря на то, что обработка картофеля инсектицидами класса фенилпиразолов началась сравнительно недавно, в 2009 году средняя доля резистентных генотипов достигла уже 28%. Колебания доли устойчивых особей предположительно можно объяснить вхождением части резистентных особей в многолетнюю диапаузу и зависимостью эффективности действия препаратов от температурных и погодных условий летнего сезона.

Мы провели расчёты корреляции географических расстояний и распределения доли устойчивых особей ко всем классам инсектицидов в популяциях колорадского жука (табл. 2). Отсутствие значимых корреляций показывает, что генетические факторы устойчивости к инсектицидам не распространяются массово в популяциях колорадского жука в результате миграций. Мы считаем, что устойчивость в локальных популяциях формируется большей частью независимо в результате частых повторяющихся обработок инсектицидами. Для подтверждения этого предположения мы рассчитали корреляции географических расстояний и распределения доли устойчивых особей по каждому классу инсектицидов (табл. 3). Мы использовали объединённые данные за три года, чтобы повысить достоверность возможных корреляций. Значимые корреляции отсутствуют во всех случаях независимо от доли устойчивых к каждому инсектициду.

Таблица 1.

Выживаемость имаго колорадского жука на Южном Урале, с поправкой на контроль, после применения инсектицидов в диагностических концентрациях за 2005 – 2012 гг. (учет смертности на 3-и сутки после обработки)

год	ФОС	Пиретроиды	Неоникотиноиды	Фенилпиразолы	Нереистоксинны
2005	0,82±0,05	0,45±0,05	0,19±0,05	-	-
2006	0,83±0,03	-	0,13±0,04	0,01±0,02	-
2007	0,90±0,03	0,59±0,02	0,03±0,02	0,02±0,02	0,18±0,03
2008	0,88±0,04	0,24±0,07	0,30±0,06	0,08±0,04	0,78±0,04
2009	0,63±0,08	0,22±0,06	0,49±0,09	0,28±0,07	0,80±0,08
2010	0,21±0,10	0,61±0,11	0,26±0,15	0,13±0,07	-
2011	0,72±0,08	0,87±0,04	0,14±0,05	0,14±0,07	0,71±0,07
2012	0,84±0,04	0,31±0,05	0,38±0,05	0,05±0,01	0,35±0,06

Таблица 2.

Корреляции географических расстояний и распределения доли устойчивых особей ко всем классам инсектицидов в популяциях колорадского жука (Мантель-тест)

год	значение r	парные корреляции с расстоянием	
		левосторонняя значимость	правосторонняя значимость
2005	-0,16	0,06	0,93
2006	-0,24	0,22	0,77
2007	0,11	0,81	0,19
2008	-0,09	0,31	0,68
2009	-0,20	0,19	0,80
2010	-0,24	0,05	0,94
2011	-0,03	0,43	0,56
2012	-0,23	0,02	0,99

Таблица 3.

Корреляции географических расстояний и распределения доли устойчивых особей по каждому классу инсектицидов за 2010 – 2012 гг. (Мантель-тест)

2010-2012	значение r	парные корреляции с расстоянием	
		левосторонняя значимость	правосторонняя значимость
общая устойчивость	-0,08	0,05	0,94
регент (фенилпиразолы)	-0,09	0,08	0,91
актара (неоникотиноиды)	-0,10	0,03	0,96
актеллик (ФОС)	0,02	0,60	0,30
децис (пиретроиды)	-0,03	0,10	0,80

Устойчивость к инсектицидам в популяциях колорадского жука на территории Южного Урала сохраняется на высоком уровне, хотя и варьирует из года в год. Устойчивость к новым инсектицидам появляется очень быстро. Распространение

устойчивости к инсектицидам происходит не из-за миграций, а из-за частых обработок локальных популяций колорадского жука инсектицидами.

Литература

1. Ушатинская Р.С. Колорадский картофельный жук. Филогения, морфология, физиология, экология, адаптация, естественные враги. М.: Наука, 1981. 377 с.
2. Беньковская, Т.Л., Леонтьева, М.Б., Удалов, И.С., Марданшин, Ю.М., Никоноров С. Стимуляция жизнеспособности имаго колорадского жука летальными дозами инсектицидов как проявление эффектов гормезиса 2010 г. Г.В.
3. Фасулати С.Р. Территориальное расселение колорадского жука в северных районах картофелеводства // Мат-лы Международ. научн.-практ. конф. “Экологические аспекты интенсификации сельскохозяйственного производства”. Пенза, 2002. С. 205-207.
4. The Database of Arthropods Resistant to Pesticides, <http://www.pesticideresistance.org>.
5. Мигранов М.Г. Пиретроиды: отечественные аналоги и их токсикология. Уфа: Принт, 1994. 101 с.
6. Амирханов Д.В., Абрамова Т.Л., Беньковская Г.В. Экологические аспекты применения новых классов инсектицидов для борьбы с колорадским жуком // Экологические аспекты гомеостаза в биоценозе. Уфа, 1986. С. 140-149.
7. Леонтьева Т.Л., Беньковская Г.В., Николенко А.Г. Потеря эффективности пиретроидов против колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. в Башкортостане. // Мат-лы IX-го совещ. “Современное состояние проблемы резистентности вредителей, возбудителей болезней и сорняков к пестицидам в России и сопредельных странах на рубеже XXI века”. СПб., 2000. С. 33-34.
8. Амирханов Д.В. Биолого-токсикологическое обоснование совершенствования химической защиты картофеля от колорадского жука на Южном Урале: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб.: ВИЗР, 1995. 48 с.
9. Рославцева С.А. Особенности развития резистентности и специфичность механизмов резистентности комнатных мух *Musca domestica* к фосфорорганическим инсектицидам: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Ереван, 1976. 40 с.
10. Определение резистентности вредителей сельскохозяйственных культур и зоофагов к пестицидам // Метод. указания / Под ред. Сухорученко Г.И. и др. М.: ВАСХНИЛ, 1990. 79 с.
11. Abbot W.B. A method for computing the effectiveness of an insecticide // J. Econ. Entomol. 1925. № 18. P. 265-267.
12. Беленький М.Б. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Рига: Изд-во АН ЛатвССР, 1963. С. 67-80.

УДК 577.21

СОЗДАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ НА ГЕНЫ DREB ПЫРЕЙНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПОВЫШЕНИЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ В ГЕНОМАХ ЗЛАКОВ

Почтовый А.А., Карлов Г.И., Дивашук М.Г.

Центр молекулярной биотехнологии. ФГБОУ ВПО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА», г. Москва, Россия,
e-mail: divashuk@gmail.com

Пшеница является важной продовольственной культурой. Рост населения Земли требует повышения производства продуктов питания к 2050 году в 2 раза, что делает необходимым увеличение объемов производства пшеницы во всем мире. В настоящее время пшеница занимает посевных площадей больше, чем какая-либо другая культура, уступая по валовому сбору только кукурузе и рису. Однако стабильное возделывание пшеницы и его расширение сталкивается с рядом проблем. Они, в первую очередь, связаны с глобальным изменением климата на планете, нерациональным природопользованием и генетической эрозией пшеницы. Изменение климата в ряде регионов, в том числе и России, как показали последние годы, связаны с аномально высокими температурами, совпадающими с малым количеством осадков, что приводит к весенним и летним засухам. Существующие сорта пшеницы не приспособлены к таким жёстким условиям выращивания, что приводит к существенным потерям.

Факторы транскрипции играют важную роль в регулировании экспрессии генов в ответ на абиотический стресс, в том числе засуху и засоление. Транскрипционные факторы привлекательны для усиления толерантности к стрессам с помощью генной инженерии, потому что чрезмерная экспрессия отдельного транскрипционного фактора может привести к повышенной или пониженной регуляции широкого спектра генов участвующих в реакции на стресс. Многие транскрипционные факторы, включая DREB1/CBF, DREB2, AREB/ABF можно использовать для усиления толерантности к абиотическим стрессам. Например, фактор транскрипции засухоустойчивого дикорастущего ячменя *H. spontaneum* HsDREB1A, находясь под транскрипционным контролем индуцируемого стрессом промотора HVA1, был внедрен в апомиктичный вид *Paspalum notatum* сорта Argentine. Полученные трансгенные растения выносили тяжелый солевой стресс и повторяющиеся циклы тяжелой дегидратации по сравнению с нетрансгенными растениями.

Изолированные DREB-подобные гены рапса, пшеницы, ржи, томата, риса, ячменя, кукурузы и острого перца чрезмерно экспрессируются при встраивании их в геном других видов, что усиливает толерантность трансгенных растений к различным абиотическим стрессам [1-5].

Недавно была показана важность транскрипционных факторов DREB в маркеропосредованной селекции и стратегии улучшения сельскохозяйственных культур. Кроме того, изучение генов-кандидатов DREB и создание функциональных маркеров для MAS и аллельного маркирования в селекционных программах позволит создавать сорта сельскохозяйственных культур с повышенной толерантностью к стрессу путём генетических манипуляций.

Цель нашей работы была изучение частичных нуклеотидных последовательностей генов-кандидатов DREB у дикорастущих сородичей пшеницы (*Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum ponticum*, *Thinopyrum elongatum*) и разработка молекулярных маркеров

позволяющих отличить гены-кандидаты DREB пырейного происхождения от генов DREB мягкой пшеницы, при их одновременном присутствии в геноме.

Материалы и методы

Растительный материал

В работе были использованы образцы *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum ponticum*, *Thinopyrum elongatum*

В качестве контроля были использованы следующие сорта мягкой пшеницы: Немчиновская, Айвина, Старшина, Безостая 1.

Выделение ДНК

ДНК выделяли из молодых листьев по методу Bernatzky и Tanksley.

ПЦР, клонирование, секвенирование

Последовательности используемых в нашей работе праймеров приведены ниже [6].

P22F CTGGCACCTCCATTGCCGCT

PRa AGTACATGAACTCAACGCACAGGACAAC

Лигирование амплифицированной ДНК осуществлялось в вектор pGEM®-T Easy. Секвенирование осуществлялось на ABI-3130XL.

Результаты и обсуждение

Для изучения нуклеотидной последовательности генов Dreb-типа у видов дикорастущих сородичей пшеницы *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum ponticum* первоначально мы провели апробацию праймеров разработанных на гены *Dreb* мягкой пшеницы. В ходе оптимизации ПЦР с праймерами P22F/PRa были подобраны условия для амплификации продукта ожидаемого размера 500-600 п.н. Затем полученный ПЦР продукт был клонирован в вектор pGEM®-T и секвенирован.

Все полученные нами в ходе работы последовательности отличались крайне высокой степенью гомологии к генам Dreb мягкой пшеницы. Отличия между сиквенсами пшеницы и ее дикорастущих сородичей представляли собой лишь несколько SNP (рисунок 1).

На один из SNP по которым отличались полученные нами сиквенсы Dreb-подобных генов пырейного происхождения от сиквенсов генов мягкой пшеницы, нами была подобна эндонуклеаза рестрикции *PvuII* (рисунок 2). Данный фермент должен был расщеплять только гены Dreb мягкой пшеницы, благодаря чему можно будет выявлять присутствие тех генов пырейного происхождения по которым в ходе нашей работы были получены частичные сиквенсы.

После рестрикции *PvuII* ПЦР продукта с праймерами P22F/PRa на контрольных образцах, было экспериментально подтверждена работа данного CAPS маркера (рисунок 3).

Таким образом, в ходе выполнения работ нами были получены частичные нуклеотидные последовательности для генов-кандидатов DREB пырейного происхождения. В общей сложности с разных пар праймеров было получено: для *Thinopyrum ponticum* – 3 гаплотипных последовательности; *Thinopyrum intermedium* – 2 гаплотипных последовательности. У всех полученных гаплотипных последовательностей по сравнению с пшеницей и друг с другом наблюдались в основном только SNP различия. Что свидетельствует о высокой консервативности данного типа генов у злаков. Данные различия приводили как к синонимическим, так и к несинонимическим заменам. В полученных нами последовательностях стоп-кодона не встречались. Несмотря на наличие лишь SNP различий, судя по литературным данным, они могут приводить к существенному усилению или ослаблению реакции растения на абиотические стрессы. Нами разработан CAPS маркер, P22F/PRa/*PvuII* позволяющий отличить гены-кандидаты DREB пырейного происхождения от DREB генов мягкой пшеницы в их присутствии.

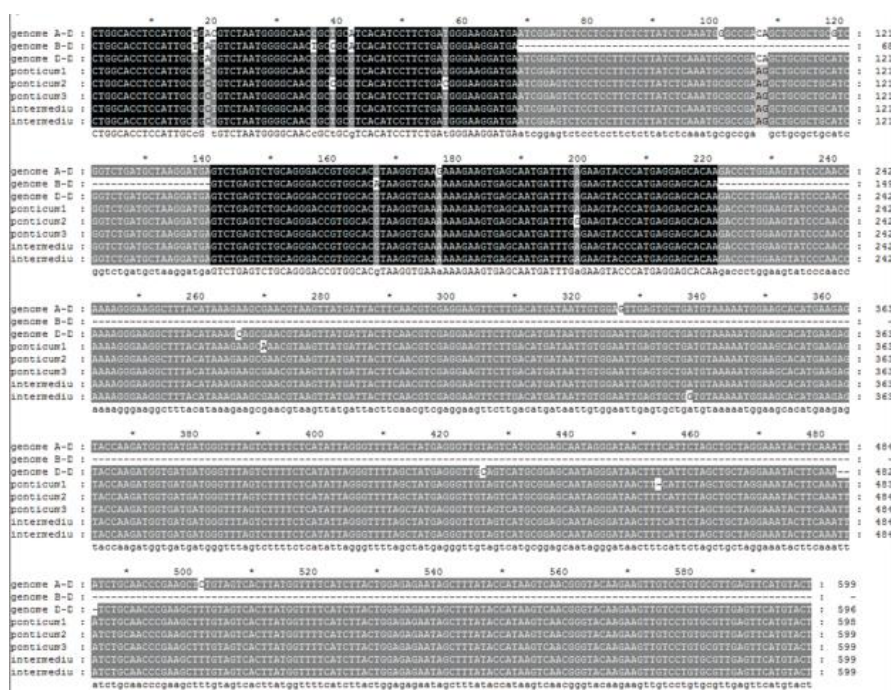


Рисунок 1 - Выравнивание нуклеотидных последовательностей заключенных между праймерами *P22F/PRA*.

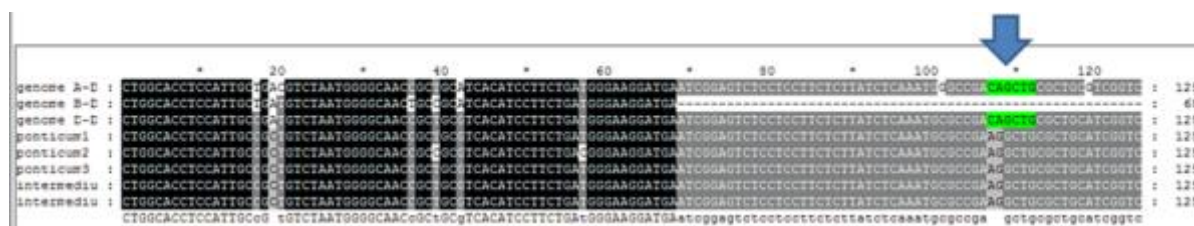


Рисунок 2 - Сайты узнавания рестриктазы *PvuII*, отмеченные цветом и стрелочками.

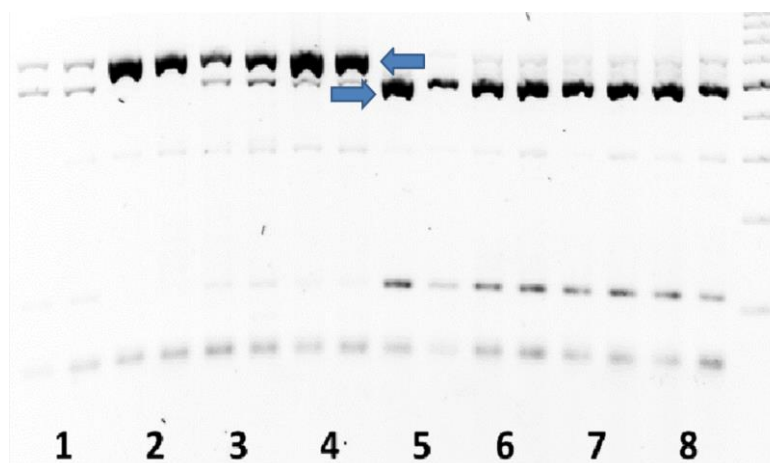


Рисунок 3 - Рестрикция ПЦР с праймерами *P22F/PRA* продукта *PvuII*. 1- *Thinopyrum elongatum*; 2 - *Thinopyrum intermedium*; 3 - *Thinopyrum ponticum*; 4 - *Thinopyrum ponticum*; 5 – *T.aestivum*, сорт Старшина; 6- *T.aestivum*, сорт Коротышка; 7 - *T.aestivum*, сорт Безостая; 8 - *T.aestivum*, сорт Айвина. Стрелочками обозначены специфические отличительные бенды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения ФЦП «Исследования и разработки по

приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы», ГК № 14.518.11.7043 от 19 июля 2012 г.

Литература

1. Jaglo K.R., Kleff S., Amundsen K.L., Zhang X., Haake V., Zhang J.Z., Deits T. & Thomashow M.F. (2001) Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiology* 127, 910–917.
2. Dubouzet J.G., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E.G., Miura S., Seki M., Shinozaki K. & Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal* 33, 751–763.
3. Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li YQ, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant and Cell Physiology* 45, 1042–1052.
4. Hong J.P. & Kim W.T. (2005) Isolation and functional characterization of the *Ca-DREBLP1* gene encoding a dehydration-responsive element binding factor like protein 1 in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang). *Planta* 220, 875–888.
5. Xu Z.S., Ni Z.Y., Li Z.Y., Li L.C., Chen M., Gao D.Y., Yu X.D., Liu P. & Ma Y.Z. (2009) Isolation and functional characterization of *HvDREB1*, a gene encoding a dehydration-responsive element binding protein in *Hordeum vulgare*. *Journal of Plant Research* 122, 121–130.
6. Wei B., Jing R.L., Wang C.S., Chen J.B., Mao X.G., Chang X.P. & Ji J.Z. (2009) *Dreb1* genes in wheat (*Triticum aestivum* L.): development of functional markers and gene mapping based on SNPs. *Molecular Breeding* 23, 13–22.

УДК 616.83:577.213

МАРКЕРЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Хидиятова И.М.^{1,2}, Ахмадеева Г.Н.^{1,3}, Гилязова И.Р.², Байтимеров А.Р.³, Магжанов Р.В.³,
Хуснутдинова Э.К.^{1,2}

¹ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН

²ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет»

³ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет»

Болезнь Паркинсона (БП) – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, частота которого среди лиц старше 55 лет составляет ~ 2% [1]. В основе БП лежат дегенеративные изменения, в основном, в дофаминергических нейронах черной субстанции ствола головного мозга, и снижение поступления в них двигательного нейромедиатора дофамина. Дефицит дофамина в стриатуме приводит к нарушению функционирования подкорково-корковых систем мозга, регулирующих двигательные функции, и проявляется в виде сочетания гипокинезии с ригидностью и/или тремором покоя и, в более поздней стадии, – с постуральной неустойчивостью. Главным патогенетическим механизмом гибели

дофаминергических нейронов считается повышенный уровень апоптоза, обусловленный развитием в клетках окислительного стресса. Ключевую роль в развитии окислительного стресса, ведущего к нейродегенерации, играют митохондриальная дисфункция (блокада митохондриального комплекса I) и нарушение внутриклеточной убиквитин-зависимой деградации поврежденных белков, приводящие к накоплению в клетках свободных радикалов, источниками которых могут являться различные эндогенные и экзогенные нейротоксины [2].

В большинстве случаев БП носит спорадический характер и имеет многофакторную природу с определенной генетической предрасположенностью, но существуют и моногенные формы заболевания. По различным оценкам, семейную историю имеют 10-20 % больных, а вероятность развития БП у родственников больных с 1-й степенью родства в 2-3 раза выше, чем в общей популяции. Для выяснения роли генетических факторов в развитии спорадической БП активно исследуются как гены - кандидаты, продукты которых тем или иным образом могут быть задействованы в различных звеньях патогенеза заболевания, так и гены, выявленные на основе полногеномного анализа ассоциаций БП с сотнями тысяч маркеров – однонуклеотидных полиморфных вариантов ДНК (SNP) [3]. Однако при таких исследованиях результаты разных авторов часто оказываются противоречивыми, что может быть связано как с недостаточным объемом исследуемых выборок, так и с популяционной неоднородностью распределения частот аллелей генов и, возможно, слабым, лишь модифицирующим влиянием определенных аллельных вариантов на развитие или течение БП. Поэтому важным моментом при проведении подобных исследований является формирование выборок больных с учетом этнической принадлежности, а также наиболее четкое подразделение больных по клиническим критериям заболевания.

С целью поиска маркеров риска развития БП в этнических группах населения Республики Башкортостан проведено молекулярно-генетическое исследование на основе банка ДНК больных (560) и контроля (670), представителей трех этнических групп – русских, татар и башкир. Исследование включало: 1) поиск у больных мутаций в генах, связанных с моногенными формами БП - α -синуклеина (*PARK1*), паркина (*PARK2*) и дардарина (*LRRK2*); 2) анализ ассоциации спорадической БП с полиморфными вариантами 17-и генов-кандидатов (системы детоксикации ксенобиотиков, метаболизма моноаминов, гена калиевого канала *KCNJ6*); 3) анализ мтДНК у пациентов с БП и в контрольных группах; 4) репликацию данных полногеномных анализов ассоциаций с БП (GWAS) по 7-и полиморфным локусам. В результате исследования у больных со спорадической формой БП в гене *PARK2* выявлена новая мутация – делеция 12-го экзона в гетерозиготном состоянии, с частотой 5.26 [4;5]; в гене *LRRK2* обнаружены миссенс-мутация p.Gly2019Ser (1.79% среди башкир), и p.Gly2385Arg (1.28% среди татар). Установлено, что генетическими маркерами риска развития БП для всех исследованных этнических групп населения Башкортостана являются Alu-инсерция Yb8NBC36 гена *KCNJ6* (p=0,007) и аллель *7 48 bp -VNTR-локуса в 3 экзоне гена *DRD4* (p=0,02; OR=2,0). Наряду с этим, в популяции татар маркерами риска развития БП можно считать генотип *H/*H (p=0,0006; OR=2,3) и аллель *H локуса Val108Met гена *COMT*; генотип *C*C (p=0,002; OR=1,7) и аллель *C (p=0,02; OR=1,34) локуса rs1800532 гена *TPH1*; аллель *12 локуса STin2 (p=0,04; OR=1,3) гена *5-HTT*; в популяции башкир – аллель *C локуса rs6280 гена *DRD3* (p=0,02; OR=1,85). Выявлено модифицирующее влияние определенных генотипов и аллелей отдельных генов на характер клинического течения и возраст манифестации БП [6;7;8]. В результате репликации данных GWAS в трех этнических группах населения РБ отдельные ассоциации с БП выявлены только в популяциях русских и татар. Маркерами риска развития БП для русских можно считать аллели *G локуса rs356219 (p=0,006; OR=1,58), *G локуса rs356165 (p=0,006; OR=1,58), генотип *T*C локуса rs2737020 гена *SNCA* (p=0,02; OR=1,67) и генотип *G*A (p=0,06; OR=2,09;) и аллель *A (p=0,007; OR=2,12) локуса rs11012 *MAPT*-региона; для

татар - генотип *С*С (p=0,01; OR=1,75;) и аллель *С (p=0,02; OR=1,60;) локуса rs2942168, генотип *А*А (p=0,001; OR=2,06) и аллель *А (p=0,01; OR=1,92) локуса rs393152, генотип *С*С (p=0,01; OR=1,57) и аллель *С (p=0,049; OR=1,3) локуса rs1724425 *МАРТ*-региона. В популяции русских выявлен эффект совместного влияния четырех полиморфных локусов двух исследованных генов на предрасположенность к БП. В популяции башкир ассоциации полиморфных вариантов исследованных локусов с БП не выявлены. В результате исследования мтДНК было установлено, что в популяции татар гаплогруппа Н мтДНК является генетическим маркером повышенного риска, а гаплогруппа U - маркером пониженного риска развития спорадической формы БП. В гене митохондриального цитохрома В выявлен гаплотип 15693С-15218А-14793А, ассоциированный с гаплогруппой U, не обнаруженный у пациентов с БП. В результате полного секвенирования мтДНК у 4-х пациентов БП татарской этнической принадлежности у носителя субгаплогруппы H2 выявлена мутация Ala64Thr в гене *ND2* в гомоплазмическом состоянии, а у носителя гаплогруппы Uk1- мутация Glu18Lys в гене *COII* в гетероплазмическом состоянии [9]. Выявленные этно-специфические генетические маркеры БП могут быть использованы для раннего определения риска развития заболевания у жителей соответствующих регионов с целью его профилактики.

Литература

1. Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism / Hardy J., Cai H., Cookson M.R. [et al.] Gwinn-Hardy K., Singleton A. // Ann. Neurol. - 2006. - Vol.60, N4. - P.389-398.
2. Bekris L.M. The Genetics of Parkinson Disease / Bekris L.M., Mata I.F., Zabetian C.P. // J. Geriatr Psychiatry. Neurol.- 2010. - Vol. 23. - P. 228-242.
3. International Parkinson Disease Genomics Consortium/ Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies //Lancet. - 2011. – V.377. – P. 641–49.
4. Анализ делеционных мутаций в гене паркина у больных идиопатической формой болезни Паркинсона / Сломинский П.А., Милосердова О.В., Попова С.И. [и др.] //Генетика. -2003. - №2. С.223-228.
5. Поиск мутаций в генах *PARK1* и *PARK2* у пациентов со спорадической и наследственными формами болезни Паркинсона из Башкортостана / Хидиятова И.М., Гилязова И.Р., Байтимеров А.Р. [и др.] //Медицинская генетика. - 2004. - № 6.- С.280-284.
6. Alu-insertion Yb8NBC36 of *KCNJ6* gene is a risk factor for Parkinson's disease development / Gilyazova I., Khidiyatova I. Akhmetova V. [et al.] // Balkan Journal of medical genetics. 2006. V.9. (1&2). P.33-37.
7. Исследование ассоциации полиморфных вариантов ряда генов метаболизма дофамина с идиопатической болезнью Паркинсона в Республике Башкортостан / Гилязова И.Р., Хидиятова И.М., Ахметова В.Л. [и др.] // Медицинская генетика. - 2008. - №1. – С. 39-49.
8. Исследование ассоциации полиморфных вариантов ряда генов метаболизма дофамина с идиопатической болезнью Паркинсона в Республике Башкортостан / Гилязова И.Р., Хидиятова И.М., Ахметова В.Л., [и др.] // Медицинская генетика. - 2008. - №1. – С. 39-49.
9. A Mitochondrial Etiology of Neurodegenerative Diseases: Evidence from Parkinson's Disease / Khusnutdinova E., Gilyazova I., Ruiz-Pesini E. [et al.]//Annals of the New York Academy of Sciences. – 2008. – Vol.3, N11.- P. 447-467.

УДК 577.2

ПОЯВЛЕНИЕ НОВЫХ СКОРОСТНЫХ МЕТОДОВ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК ИЗМЕНИТ ВСЮ БИОЛОГИЧЕСКУЮ НАУКУ

Чемерис А.В.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа

Столь серьезная миссия, возлагаемая на полногеномное секвенирование ДНК, объясняется крайней важностью этой технологии для настоящего и тем более для будущего современной биологии. Новые быстрые методы секвенирования ДНК, характеризующиеся сверхвысокой производительностью, точностью и дешевизной, коренным образом изменят всю биологическую науку, так как это не сможет сделать ни одна другая новая технология. Причем воздействие нового скоростного секвенирования ДНК по своим последствиям значительно превзойдет то, с чем биология уже столкнулась в конце 70-х гг. XX столетия в виде тогдашнего секвенирования ДНК и к этому надо быть готовыми.

Со времени открытия Ф.Мишером в 1869 г. обогащенного фосфором вещества нуклеина прошло три четверти века, прежде чем в 1944 г. стало ясно, что наследственную информацию несет именно ДНК, после чего интерес к этой молекуле сильно возрос, но появления информации о порядке расположения нуклеотидов в протяженных фрагментах ДНК пришлось ждать еще более трех десятилетий. Предложенные в 1977 г. методы секвенирования ДНК химической дегградацией по Максаму-Гильберту и ферментативным построением по Сэнгеру дали совершенно новые данные в виде ранее недоступных генетических текстов, оказавших настолько сильное влияние на развитие не только самой молекулярной биологии, но и общей биологии и других смежных областей знаний, что заставили по-новому взглянуть на планирование и проведение экспериментов, на адекватность получаемых результатов поставленным задачам, вызвали к жизни разработку соответствующего компьютерного и программного обеспечения, баз данных и пр. Словом, вся биологическая наука и связанные с ней дисциплины получили благодаря этим методам очень мощный импульс. Схожий импульс в 1988 г. дал метод амплификации фрагментов ДНК с помощью усовершенствованной полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая, в свою очередь, оказала серьезное влияние и на процесс секвенирования нуклеиновых кислот.

Удивительно, но на протяжении четверти века лишь единичные работы были посвящены разработкам принципиально иных методов определения последовательности нуклеотидов и все экспериментаторы только и стремились, что улучшить ферментативный дидезокси метод секвенирования ДНК. Однако за это время его производительность увеличилась всего на 2 порядка, тогда как для быстрого секвенирования полных геномов разных организмов необходимо было повышать производительность на 8-10 порядков и здесь электрофоретические методы секвенирования полностью себя исчерпали. Во времена фактического доминирования метода секвенирования по Сэнгеру характеризующийся меньшей производительностью и имеющий ряд ограничений метод пиросеквенирования казался некоторой экзотикой, и кто бы мог тогда подумать, что именно ему будет суждено в новом тысячелетии стать первым методом полногеномного секвенирования ДНК нового поколения из так называемой группы NGS - Next Generation Sequencing. Но в 2003-2004 гг. произошел своеобразный прорыв и стали один за другим разрабатываться быстрые методы секвенирования геномной ДНК новых поколений. При этом фактически единственной страной, оценившей перспективность таких разработок и то, какую они сулят прибыль в будущем, оказались США, где разрабатываемые методы нового секвенирования были поделены на две основные категории. Проекты первой должны были обеспечить

ресеквенирование генома человека за 100 тыс. долларов и второй - за 1 тыс. долларов, а эта сумма позволила бы уже всерьез говорить о персонифицированной медицине будущего, что, помимо самого улучшения здоровья людей, предполагает еще и гигантский бизнес.

В 1988-2003 гг. на выполнение международного проекта «Геном человека» было затрачено 3 млрд. долларов, из которых только около 300 млн. пошло непосредственно на проведение секвенирующих процедур. Однако уже к концу 2003 г. стоимость секвенирования генома млекопитающего, приблизительно равного по размеру человеческому, составила всего около 25 млн. долларов. В этот период единственным методом секвенирования полных геномов был дидезокси метод Сэнгера. Дальнейшее снижение стоимости полногеномного секвенирования уже продолжалось с помощью разных методов новых поколений, когда были преодолены стоимостные планки на геном человека в 1 млн. долларов (2008 г., первое поколение NGS), в 100 тыс. долларов (2009 г., второе поколение NGS) и 10 тыс. долларов (2011 г., третье поколение NGS). На начало 2013 г. стоимость ресеквенирования генома человека составила в США около 6000 долларов. Несмотря на произошедший за последнее десятилетие огромный прогресс в этой сфере, полногеномное секвенирование по нынешним воззрениям осуществляется довольно дорогостоящими, весьма трудоемкими и недостаточно производительными методами. Ожидаемые четвертое и пятое поколения методов полногеномного секвенирования должны обеспечить ресеквенирование генома человека за 1000 и за 100 долларов соответственно. Более перспективными выглядят пока уступающие технологиям, рассчитанным на массивный параллелизм, методы мономолекулярного секвенирования, нацеленные не просто на ресеквенирование, но и позволяющие вести секвенирование *de novo*.

Так, широко используемыми методами полногеномного мономолекулярного секвенирования ДНК в ближайшее десятилетие станут те, что позволят без особых трудностей с пробоподготовкой секвенировать *de novo* геномы крупного размера в виде протяженных фрагментов ДНК (до 10 и более тысяч нуклеотидов, заметно снизив тем самым необходимое многократное покрытие геномов) с минимальными ошибками за относительно короткое время (рабочий день), недорого (порядка 150-300 долларов на геном), обеспечивая не менее терабазы последовательностей за один запуск прибора, причем позволяя легко масштабировать процесс, вплоть до секвенирования всего тысяч нуклеотидов и не неся при этом лишних затрат. Сами секвенаторы также должны быть не очень дорогими. Другим весьма важным моментом для массового использования новых удобных методов полногеномного секвенирования четвертого/пятого поколений станет возможность аналогичного секвенирования молекул РНК без их перевода в кДНК. При этом обязательно должен секвенироваться абсолютно весь пул молекул РНК, присутствующих в клетке или в группе одинаковых клеток одного типа ткани.

Патенты на такие удобные во всех отношениях технологии секвенирования ДНК и РНК могут стоить более миллиарда долларов, что будет зависеть от того, сколько сходных по производительности технологий нового секвенирования геномов и транскриптомов, способных секвенировать аналогично недорого и без чрезмерных усилий, к тому времени будет разработано. Причем это вовсе не будет означать, что разработка новых методов полногеномного секвенирования тотчас прекратится, а посему вполне сможет появиться, если не более производительная, то, по крайней мере, более удобная и дешевая технология.

На протяжении ряда лет неспешно (насколько позволяют финансы и людские ресурсы) нами тоже ведутся работы по разработке сразу двух новых оригинальных методов мономолекулярного секвенирования ДНК/РНК четвертого и пятого поколений. По одному из них уже есть определенные успехи. Причем за последние годы появились статьи зарубежных авторов, посвященные некоторым другим вопросам анализа ДНК, но описанные в них методические приемы косвенно подтверждают, что обе наши технологии могут быть вполне работоспособны, высокопроизводительны и недороги.

К чему же приведет в будущем новое скоростное секвенирование полных геномов четвертого и пятого поколений? Изменений на поле биологических наук произойдет немало. Первым делом перестанут использоваться разнообразные нынешние технологии выявления полиморфизма ДНК, основанные на амплификации отдельных участков генома с помощью ПЦР, и иными способами, поскольку определять нуклеотидные последовательности сразу всего генома любых организмов даже *de novo* станет куда дешевле, удобнее и быстрее. Так, в ближайшие годы будут полностью секвенированы *de novo* сотни тысяч геномов (без учета ресеквенирования) организмов разных уровней генетической сложности. К середине 2013 г. уже стали известны, главным образом, с помощью методов NGS-секвенирования, полные геномы довольно большого числа свободноживущих организмов из всех ветвей Жизни - архей, прокариот и эукариот - 227, 6330 и 311, соответственно. Еще более 20 тысяч геномов в настоящее время находятся на разных стадиях секвенирования. Среди них есть и наше скромное участие в виде пяти секвенируемых геномов прокариот из родов *Halomonas*, *Phyllobacterium*, *Bacillus* и *Paenibacillus*. Таким образом, полиморфизм ДНК будет выявляться с помощью биоинформатики путем сравнения геномов целиком или их соответствующих участков, где с точностью до нуклеотида будут обнаруживаться различия между особями, штаммами, видами, родами, представителями других таксономических единиц. Геносистематика будущего будет строиться на сравнении фактически целых геномов, что обеспечит высокую достоверность филогенетических построений всего живого. Биоинформатика станет чуть ли не главенствующей наукой среди биологических дисциплин. Перестанут использоваться разные генетические маркеры, применяемые сейчас, например, для маркирования у сельскохозяйственных растений и животных так называемых хозяйственно-полезных признаков с целью их последующего выявления при ведении селекционной работы, тем более что такие маркеры носят по сути случайный характер и их использование мало что дает. Прекратятся также поиск и применение неохарактеризованных (да и даже недостаточно охарактеризованных) генетических маркеров (ассоциаций) для идентификации у людей предрасположенности к различным заболеваниям многофакторной природы как на ДНК-, так и на РНК-уровнях, поскольку им на смену придут конкретные точные сведения о причинах болезней, досконально изученные на геномном, метиломном, транскриптомном, протеомном и прочих необходимых уровнях.

А к чему в плане использования тех или иных методов приведет новая высокопроизводительная технология секвенирования полного транскриптома любой клетки? Действительно, для понимания функционального состояния любого организма важно знание не столько или, точнее, не только последовательности всего генома, а и транскриптомов, которых для каждого организма множество и они могут меняться как во времени так и от прочих обстоятельств. Полнотранскриптомное секвенирование позволит перейти на совершенно новый уровень исследований, дающий возможность оценивать функциональное состояние любого организма и его отдельных органов. Для определения транскрипционной активности отдельных генов, скорее всего, потеряют свою актуальность как цифровая ПЦР, так и ПЦР в реальном времени. Метод вычитающей гибридизации, направленный на установление транскрипционной активности генов в различных клетках/тканях/условиях, также перестанет использоваться. Станут абсолютно ненужными транскрипционные ДНК-чипы. Ну, разве что они будут применяться при массовых анализах функционирования каких-либо немногих конкретных генов, с которыми будет все ясно, и однозначно можно будет только по ним одним ставить правильный диагноз.

В 1968 г., практически через столетие после обнаружение ДНК (нуклеина), Э.Чаргафф заметил, что «... чтение последовательности ДНК может стать задачей XXI века ...». Собственно так и случилось, поскольку быстрое секвенирование полных геномов крупного размера стало возможным только в последние 6-8 лет и Э.Чаргафф, получается, был прав. Хотя формально в своем прогнозе он все же сильно ошибся, ввиду того, что весьма

производительное (в тогдашнем понимании этого процесса) секвенирование ДНК принципиально уже стало доступно во второй половине 70-х гг. Можно сказать, что, появившись, секвенирование ДНК перевело биологическую науку (или, по крайней мере, часть молекулярной биологии, исследующую молекулы ДНК) в группу так называемых точных наук, поскольку неким стандартом является в настоящее время наличие не более одной ошибки на 10000 определяемых нуклеотидов, что соответствует 99,99% точности и теперь некоторые математики, став биоинформатиками, активно работают с нуклеотидными последовательностями, оперируя азотистыми основаниями, точнее, их количеством и качеством, под которым (последним) здесь понимаются не только типы нуклеотидов - А, С, G, T, U, а также модификации некоторых из них, но и порядок их следования друг за другом в цепочках нуклеиновых кислот.

МЕДИЦИНСКАЯ БИОХИМИЯ

УДК 615.322

КОМПЛЕКСНЫЕ БАД НА ОСНОВЕ СЕВЕРНОГО БИОСЫРЬЯ В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОМ СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ ФИЗКУЛЬТУРНО-СПОРТИВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Аньшакова В.В., Наумова К.Н., Степанова А.В., Васильев П.П.

ФГАОУ ВПО Северо-Восточный федеральный университет

В настоящее время уровень современной подготовки спортсменов предполагает дальнейший рост нагрузок на организм. В этой связи расширение границ физической работоспособности спортсменов, увеличение ее потенциала, профилактика переутомления и ускорение процессов восстановления является актуальной проблемой, поскольку спортивная тренировка, являющаяся основным методом повышения физической выносливости, имеет свои пределы. Это особенно важно при подготовке спортсменов высокого класса, так как физическое и психическое напряжение, сопровождающее подготовку и участие спортсменов в ответственных соревнованиях, нередко приводит к нарушению функциональных возможностей организма. В этой связи принципиальной задачей остается оптимизация тренировочного процесса путем внедрения новых высокоэффективных продуктов из сырья природного происхождения, которые могут обеспечить адаптацию организма к возрастающим нагрузкам и позволить обеспечение достижения более высоких спортивных результатов.

Одно из основных направлений для решения указанной задачи предусматривает разработку активной матрицы (наполнителя), повышающей биодоступность действующего вещества и одновременно обладающей детоксикационной функцией. Поэтому задача получения эффективных наполнителей считается актуальной и успешно решается с привлечением новых сырьевых источников или новых технологий их переработки [1, 2]. В настоящей работе объектом исследования являлись твердофазные биокомплексы на основе лишайниковых β -олигосахаридов, используемых в качестве универсальной матрицы, до 90-95% по массе, с различными действующими веществами (ДВ) – физиологически активными веществами (ФАВ) лекарственных растений, витаминно-микроэлементными комплексами (ВМЭК).

Механохимическую активацию проводили в воздушной среде в мельнице-активаторе проточного типа ЦЭМ 7-80.

Для исследования образцов ягеля различного помола использовали метод сканирующей электронной микроскопии. Содержание легкогидролизуемых углеводов и сорбционную активность по отношению к маркеру метиленовому синему, моделирующему средне- и низкомолекулярные токсины измеряли методом прямой спектрофотометрии. Физиологическую активность биокомплексов ягель:ДВ различной активации, как грубого измельчения так и механохимического определяли *in vivo* при пероральном введении мышам линии СД-1. Биохимический анализ крови животных исследовали на содержание лактата. Оценка поведенческой активности животных проводилась с использованием тестов Плавание и AutoTrack согласно стандартным операционным процедурам на 30 и 45 день введения препарата.

Содержание в слоевище лишайников ФАВ обуславливает довольно широкое их использование в официальной и народной медицине [3]. Вместе с тем, являясь β -полисахаридами, β -гликозидные связи в которых практически не расщепляются в желудочно-кишечном тракте, сами лишайниковые углеводы почти не усваиваются организмом человека. Задача состоит в том, чтобы в процессе предварительной обработки

слоевищ лишайников повысить биодоступность составляющих компонентов. Эта задачу мы решаем путём механохимической активации [4].

Использование механохимической обработки разрушает стенки клеток, где находится основная часть ФАВ и приводит к образованию наноразмерных частиц в твердой фазе (рис. 1), тем самым способствует максимально эффективному выходу ФАВ из клеток. Наряду с разрушением клеточных стенок происходят химические реакции во время механоактивации.

Анализ водорастворимых углеводов по методу «восстанавливающих концов» в экстрактах слоевищ лишайников рода *Cladina* после грубого измельчения либо механохимической активации подтвердил факт частичной декструкции β -гликозидных связей в лишайниковых β -полисахаридах с образованием β -олигосахаридных молекул при механохимической активации. Содержание легкогидролизуемых углеводов в пробах лишайника рода *Cladonia* увеличилось в 8 раз после его механоактивации и составило **33,48 мг/г** сухого механоактивированного сырья и **4,61 мг/г** сухого образца грубого помола. В то время как при совместной механоактивации смеси ягеля с различными ДВ (ФАВ лекарственных растений, (ВМЭК) столь значительного увеличения легкогидролизуемых углеводов не происходит. Образующиеся в процессе механоактивации лишайниковые β -олигосахариды, за счет своих активных карбонильных, гидроксильных, амино- групп, могут образовывать комплексы с активным веществом в том же процессе механоактивации. При этом карбонильные группы водорастворимых β -олигосахаридов оказываются связанными с комплексы с активным веществом и не титруются по методу «восстанавливающих концов». Этот факт подтверждает предположение о том, что при механоактивации смеси слоевищ лишайников и активного вещества происходит одновременное деструктурирование β -полисахаридов до β -олигосахаридов (активного наполнителя) и их комплексообразование с ДВ.

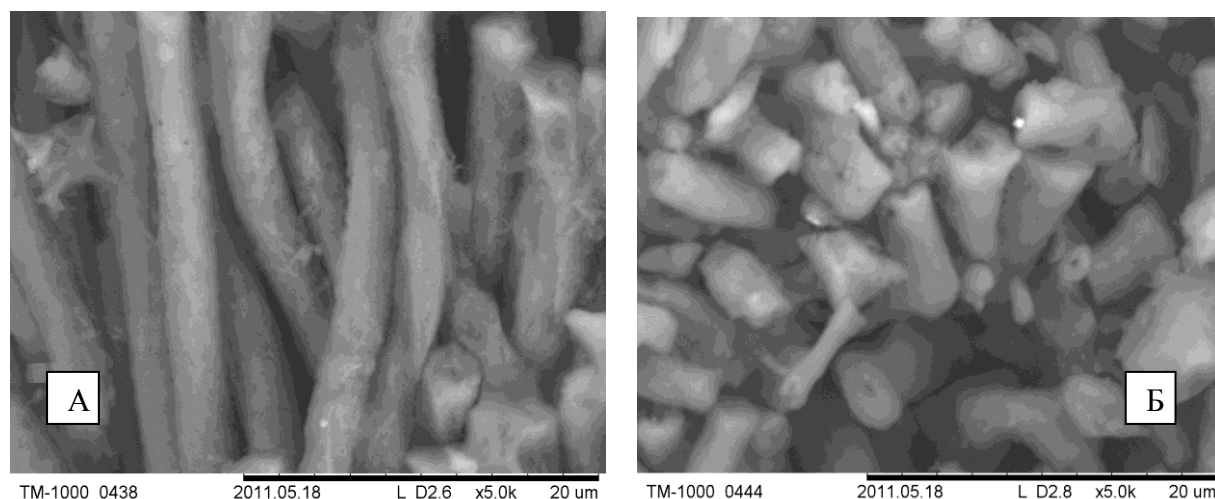


Рис.1. Сканирующие электронные фотографии структуры ягеля различного измельчения: грубого помола (А), механоактивированного (Б).

Протонные спектры (рис. 2) аммонийно буферных экстрактов образцов грубого измельчения и механоактивированного свидетельствуют о том, что все спектры в интервале частот 0-6 м.д идентичны в алифатической области спектра.

В районе 3,0-3,4 м.д. проявляются сигналы протонов сахаридного остова лишайника, который состоит из последовательностей 1.3 и 1.4- связанных остатков глюкозы, помимо которых присутствуют сигналы аномальных протонов полисахаридов при 5,20 и 5,12 м.д. В ходе механоактивации наблюдается изменения интенсивностей сигналов 3,29 и 3,33 м.д., т.е. взаимозменение их интенсивностей: при механоактивации уменьшается интенсивность

сигнала 3,29 при увеличении сигнала 3,33 м.д., что возможно свидетельствует об изменении химического окружения внутри циклов полисахарида. В отличие от щелочных экстрактов исследуемых образцов, в кислотной среде таких изменений не происходит и спектры ягеля различного воздействия идентичны.

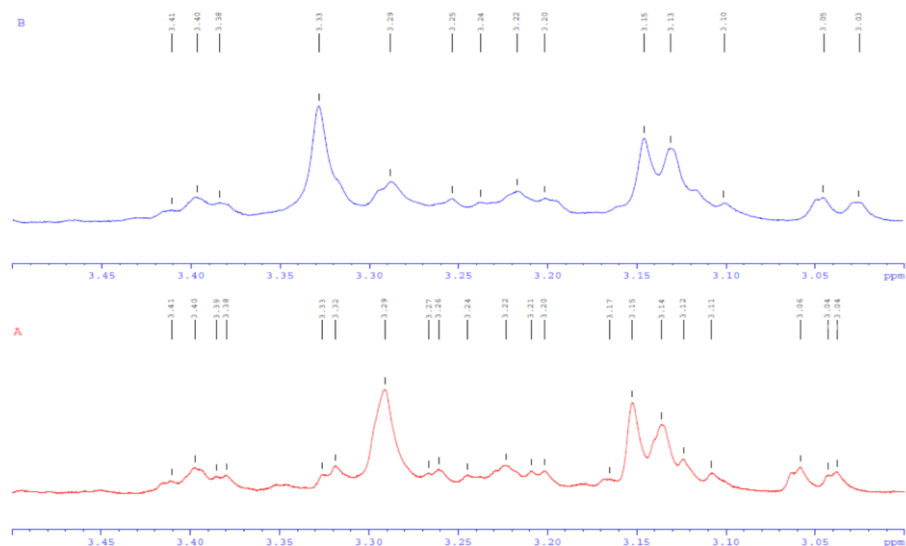


Рис.2. Протонные спектры ягеля грубого помола (А) и ягеля после механоактивации (В) в аммонийном буфере в интервале 3-3,5 м.д.

Эффект повышения биоактивности ДВ при его комплексообразовании с лишайниковыми β -олигосахаридами был проверен при создании механохимического биопрепарата, являющегося межмолекулярным комплексом «активного наполнителя» - лишайниковых β -олигосахаридов и ВМЭК в соотношении 20:1. Анализ результатов исследований физиологической активности биокомплекса показал, что механоактивация лишайниковых β -олигосахаридов с ВМЭК приводит к повышению в 1,7-2,0 раза резистентности (выносливости, двигательной и исследовательской активности и т.д.) организма лабораторных мышей линии CD-1 к действию физических нагрузок и экстремальных факторов различной природы.

Механоактивированные слоевища лишайников родов *Cladonia*, использованные нами в качестве комплексообразователя, также рассматривались как источник для расширения ассортимента сорбционных материалов растительного происхождения для очистки внутренних сред организма от экзо- и эндогенных токсинов различной природы.

Показано *in vitro*, что сорбционная суточная емкость у механоактивированного образца составила 48,0 мг/г или 150,0 ммоль/кг по органическому веществу (на примере метиленового синего – маркера эндотоксинов малой и средней молекулярной массы). Следует отметить, что это очень высокие показатели по сравнению с известными адсорбентами, такими как полифепан и глина белая, адсорбционная емкость которых по метиленовому синему составляет 10,0 и 11,4 мг/г соответственно [5]. Адсорбционную емкость для солей тяжелых металлов определяли на примере ионов Co^{2+} из стандартных растворов хлорида кобальта (II) в интервале концентраций 0,2-1 М. Адсорбционная емкость биоматериала ягель механоактивированный составила 185 ммоль/кг, что в 2,5 раза превосходит адсорбционные свойства порошка ягеля грубого помола. Увеличение сорбционных свойств ягеля механоактивированного связано и с более развитой поверхностью, и с возрастанием числа функциональных групп [6].

Высокую сорбционную способность полученного материала доказали *in vivo* на примере связывание «токсина усталости» – молочной кислоты (табл. 1).

Таблица 1

Абсолютные значения содержания лактата в крови животных

Вводимые биопрепараты	Лактат, моль/л, на 30-й день
Контроль	11,2±0,4
Родиола розовая	11,5±1,0
Смесь родиолы и лишайника 1/10 грубоизмельченная	9,2±0,5
Смесь родиолы и лишайника 1/10 механоактивированная	8,1±0,4

Таким образом, показано, что твердофазная композиция, полученная механохимической активацией слоевищ лишайников *p. Cladonia* и ВМЭК в массовом соотношении 20:1, обладает повышенной в 2,5-3 раза физиологической активностью по сравнению с чистым ДВ, при снижении дозы ВМЭК в 10 раз за счет большей биодоступности ВМЭК и детоксикационной функции «активного наполнителя».

Аналогичные по характеру эффекты, но ещё более выраженные в количественном отношении, были получены при совместной механоактивации слоевищ лишайников с тканями некоторых лекарственных растений: корней и корневищ родиолы розовой в соотношении 10:1.

По-видимому, механизмов такого эффективного биологического действия комплексов, полученных механоактивацией «активного наполнителя» (лишайниковых β-олигосахаридов) с ДВ может быть несколько:

- лишайниковые β-олигосахариды, связывая то или иное ДВ, транспортируя его в кровь и далее через клеточные мембраны, обеспечивают его более высокую усвояемость (до 90-95%) и, как следствие, биоактивность;

- обладая высокой сорбционной активностью по отношению не только к экзо-, но и к эндотоксинам, продуктам обмена веществ, они снижают их уровень в клетках в 1,5-2,5 раза (табл. 1), что также способствует повышению адаптивного потенциала и выносливости организма.

Благодаря особым биохимическим свойствам лишайниковых β-олигосахаридов (близость по структуре олигосахаридным компонентам гликокаликса мембран клеток организма человека) и тому, что они образуют с ДВ межмолекулярные комплексы, в 5-10 раз повышается биодоступность и биоактивность ДВ. Это позволяет в соответствующее число раз снизить клинически эффективную дозу вводимого фармпрепарата, уменьшить риски осложнений и побочных эффектов.

В настоящее время в СВФУ осуществлен запуск производства разработанных биопрепаратов. В пекарне Чурапчинского института физической культуры и спорта производится хлеб с биологически активной добавкой «Ягель Детокс», благодаря которой хлеб дольше остается свежим, не плесневеет и является продуктом функционального оздоровительного питания. «Ягель Детокс» является дополнительным источником полисахаридов, минералов, связывает и выводит экзогенные и эндогенные токсины. Способствует укреплению иммунитета, повышению устойчивости к вирусным и бактериальным инфекциям, оптимизирует функции кишечника и положительно влияет на выносливость спортсменов.

Литература

1. Душкин А.В., Метелева Е.С., Толстикова Т.Г., Хвостов М.В., Долгих М.П., Толстиков Г.А. Комплексообразование фармаконов с глицирризиновой кислотой – путь создания лекарственных препаратов повышенной эффективности // Химия в интересах устойчивого развития. 2010. - Т.18. №4 - С. 517-525.
2. Аньшакова В.В., Шарина А.С., Каратаева Е.В., Кершенгольц Б.М. Получение сорбционного биоматериала из слоевищ лишайников // Сибирский медицинский журнал. – 2012. - № 1. – С. 29-32.
3. Сафонова М. Ю. Фармакогностическое и фармакологическое изучение слоевищ цетрарии исландской - *Cetraria islandica* (L.) Ach.', Автореф. На соиск. Уч.степени канд. фарм. наук - СПб., - 2002. - 27 с.
4. Аньшакова В.В. Механохимическая технология получения биокомплексов на основе лишайникового сырья // Биофармацевтический журнал. – 2011. - Т. 3. № 5. – С. 33-42.
5. Свидетельство о государственной регистрации в странах ЕВРАЗЭС БАД к пище "ЯГЕЛЬ ДЕТОКС" № RU.77.99.11.003.Е.014127.09.12 от 27.09.2012.
6. Кершенгольц Б.М., Аньшакова В.В., Шеин А.А. Лишайниковые аминок-β-олигосахариды – структура, свойства, практическое применение, сравнение с хитозаном // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 3; URL: <http://www.science-education.ru/103-6332>

УДК 577.1

ВЛИЯНИЕ БОЛЬШИХ ДОЗ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА

Башкатов С.А.¹, Баязитова А.Р.

E-mail: s_bashkatov@list.ru

Башкирский государственный университет, г. Уфа
ГБУЗ РБ Дюртюлинская Центральная районная больница, г. Дюртюли

Введение

Старение является одной из центральных проблем современного естествознания, решению которой посвящены многочисленные работы в области физиологии, биохимии, генетики и молекулярной биологии. Известно, что одним из основных факторов старения является уменьшение с возрастом в тканях высших млекопитающих гиалурановой кислоты (ГК) [1]. Вместе с тем модельных экспериментов на лабораторных животных, позволяющих точно оценить временную динамику содержания ГК и других фракций гликозаминогликанов (ГАГ) не проводилось. ГАГ в наибольшем количестве синтезируются в печени и метаболизируются в глюкуроонат-ксилозуловом цикле (ГКЦ), поэтому для того, чтобы замедлить их катаболизм представляется обоснованным нагрузить ГКЦ достаточно большим количеством какого-либо метаболита (например, аскорбиновой кислоты), чтобы по механизму обратной связи замедлить скорость соответствующих биохимических реакций [2,3]. Целью настоящей работы явилось изучение временной динамики содержания ГК в печени крыс различного возраста и влияние на нее аскорбиновой кислоты (АК), вводимой в больших дозировках.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на белых неинбредных крысах массой 180 – 220г в возрасте 1, 3, 6, 12 и 18 месяцев в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755). Каждая возрастная группа содержала по 6 животных. АК вводили в дозах 100 или 500 мг/кг внутривентрикулярно 1 раз в сутки в течение двух недель. После этого в печени крыс методом анионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе определяли содержание ГК [2]. Для этого 1 грамм ткани печени после измельчения подвергали гидролизу в 5 мл 10% NaOH на водяной бане при $t\ 60^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа, затем гидролизат нейтрализовали 30% HCl до pH 7,0. Полученный раствор фильтровали через бумажный фильтр. Далее методом гельфильтрации производилось обессоливание образца и получение высокомолекулярной фракции, содержащей гликозаминогликаны. Для этого хроматографическую колонку высотой 40 см и диаметром 1,6 см заполняли предварительно подготовленной суспензией сефадекса G25 (coarse), уравновешенной дистиллированной водой. Калибровка колонки производилась с использованием растворов голубого декстрана (молекулярная масса $2 \cdot 10^6$ Да) в водных растворах хлорида натрия. Выход солей контролировали реакцией с азотнокислым серебром на хлориды. V_0 (наружный объем колонки) составлял 20 мл. Объем образца, при котором достигалось полное освобождение от солей при постоянной скорости 5 мл/мин, составлял 16 мл.

В калиброванную колонку вносили образец и элюировали со скоростью 5 мл в минуту. Регистрацию оптической плотности проводили на спектрофотометре SPECORD M40 (Германия) при $\lambda=220$ нм и $\lambda=280$ нм, контролируя выход полисахаридов. После прохождения наружного объема колонки (20 мл) оптическая плотность элюента на выходе при $\lambda=220$ и $\lambda=280$ нм возрастала, что свидетельствовало о наличии в нем полисахаридов. С этого момента начинали сбор образца, содержащего биополимеры.

Собранный образец для разделения на основные классы гликозаминогликанов: несulfатированные (гиалуроновая кислота) и sulfатированные (хондроитинсульфаты и гепарансульфаты) фракционировали методом анионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе. Для этого образец наносили на колонку объемом 20 см³, заполненную уравновешенной дистиллированной водой волокнистой DEAE-целлюлозой в хлоридной форме. Фракции элюировали дистиллированной водой и 0,15; 0,25; 0,7 и 1,2 М водными растворами хлорида натрия под контролем оптической плотности при $\lambda=220$ при постоянной скорости 1 мл в минуту. 0,15 М фракция содержала несulfатированные гликозаминогликаны (гиалуроновую кислоту); 0,7 и 1,2 М фракции содержали sulfатированные гликозаминогликаны: 0,7 М - хондроитин- и дерматансульфаты, а 1,2М – гепарансульфаты.

Каждую фракцию собирали отдельно, элюент упаривали. Сухой остаток растворяли в известном объеме дистиллированной воды, отбирали аликвоту на определение гликозаминогликанов по содержанию уроновых кислот (реакция Дише) [1, 2].

Для этого к 0,5 мл образца добавляли 3 мл концентрированной серной кислоты, содержащей 0,025 М тетраборнокислый натрий, тщательно перемешивали и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 минут. После охлаждения до комнатной температуры к образцам добавляли по 100 мкл 0,1% спиртового раствора карбазола и нагревали 15 минут в кипящей водяной бане, после чего охлаждали и измеряли оптическую плотность против контроля при $\lambda=530$ нм. Контролем служил насыщенный раствор хлорида натрия, обработанный по Дише, как описано выше. Концентрацию ГАГ (мкг/г ткани) находили по калибровочному графику, построенному по растворам глюкуроновой кислоты в насыщенном растворе хлорида натрия.

Данные обрабатывали с помощью пакета компьютерных программ с применением

однофакторного дисперсионного анализа и t-критерия Стьюдента [1].

Результаты и обсуждение

. Под воздействием независимой переменной «Возраст» значительно уменьшался уровень ГК в печени (рис. 1). Наибольшее изменение этого показателя приходилось на период 18 месяцев и было статистически значимо меньше, чем в других возрастных группах (табл. 1).

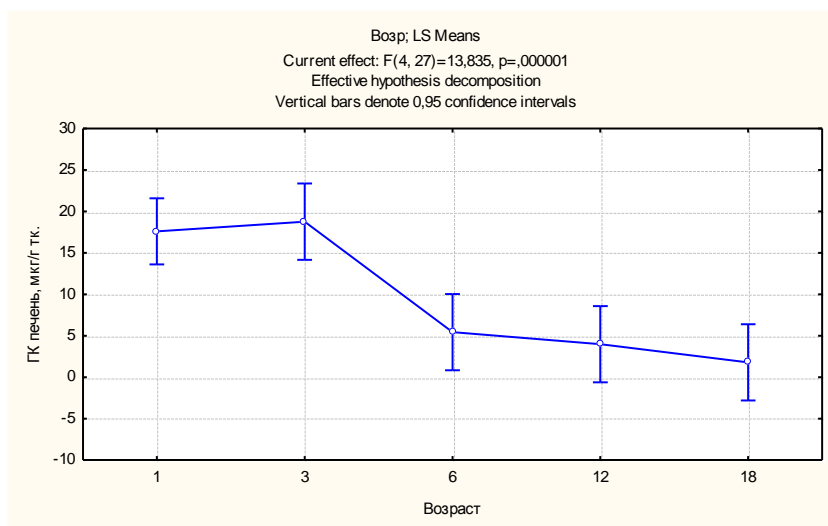


Рис 1. Влияние возраста на содержание ГК в печени крыс.

Таблица 1.

Значения p-level по t-критерию Стьюдента при сравнении содержания ГК (мкг/г ткани) у крыс различного возраста

	ГК 1 мес.	ГК 3 мес.	ГК 6 мес.	ГК 12 мес.
ГК 18 мес.	0,002	0,0001	0,017	0,007

АК в дозах 100 и 500 мг/кг достоверно увеличивала (табл. 2) содержание ГК в печени соответственно в 1,97 и 2,49 раза (рис. 2).

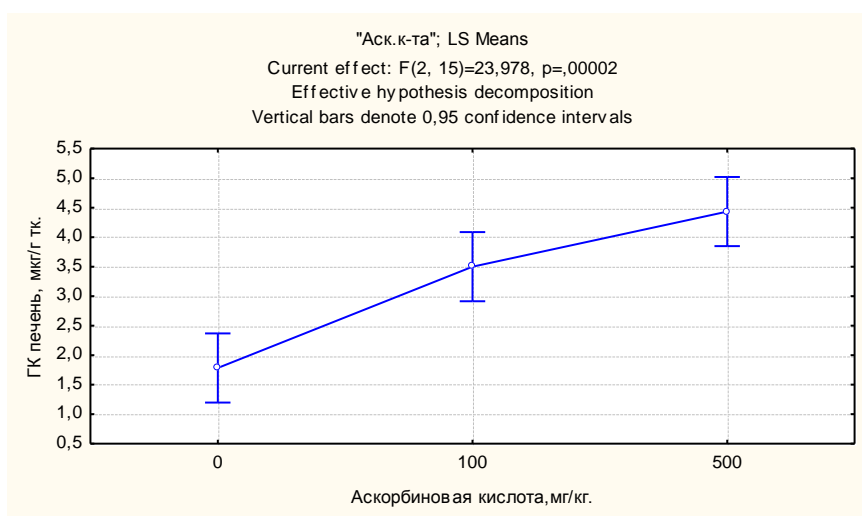


Рис 2. Влияние дозы АК на содержание ГК в печени крыс.

Уровень ГК у крыс, получавших АК в дозах 500 и 100 мг/кг, статистически значимо различался в 1,27 раза (табл. 2).

Таблица 2.

Значения p-level по t-критерию Стьюдента при сравнении содержания ГК (мкг/г ткани) у 18 месячных крыс, получавших различные дозы АК

	ГК 0 мг/кг (контрольная группа)	ГК 100 мг/кг
ГК 500 мг/кг	0,000049	0,039974

Обсуждая полученные результаты, отметим, что ежедневное в течение двух недель введение АК подопытным животным в больших дозировках оказывало антагонизм в отношении возраст-зависимых отрицательных сдвигов концентраций ГК в печени. При этом физиологические показатели животных оставались в пределах нормы, и не наблюдалось каких-либо клинических проявлений побочных эффектов, в частности интоксикации.

По-видимому, наблюдаемые явления свидетельствуют в пользу антагонизма биохимических эффектов АК в отношении процессов старения организма, проявляющиеся в препятствовании снижению уровня ГК, что является необходимым условием сохранения полноценной жизнедеятельности. Складывается впечатление, что рассматриваемый методический подход может в перспективе оказаться полезным в геронтологии и дерматокосметологии для профилактики и коррекции негативных возрастных изменений.

Литература

1. Зимницкий А.Н., Башкатов С.А. Гликозаминогликаны в биохимических механизмах адаптации организма к некоторым физиологическим и патологическим состояниям. М.: Фармацевтический бюллетень: Глобус; 2004.
2. Зимницкий А.Н., Башкатов С.А. Сопряженность биосинтеза гликозаминогликанов с ядерным и микросомальным аппаратом клетки. Молекулярная биология. 2006; 40 (2): 289-99.
3. Зимницкий А.Н., Башкатов С.А., Уразбаев В.Н. Тандемные повторы ДНК и концепция матричного синтеза протеогликанов. М.: Лабиринт; 2005.

УДК 616.36-071/-079

УМЕНЬШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕЧЕНОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ У РАБОТНИКОВ СВЯЗАННЫХ С ВРЕДНЫМИ УСЛОВИЯМИ ТРУДА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ФИТОСБОРА

Гильмутдинова Л.Т.¹, Фархутдинов Р.Г.², Маракаева Е.А.¹

¹ГБОУ ВПО «Башгосмедуниверситет Минздравсоцразвития России», г. Уфа, Россия

²ФГБОУ ВПО «Башкирский ГУ», г. Уфа, Россия,

e-mail: frg2@mail.ru

При действии негативных факторов среды у лиц, контактирующих с производственными вредностями, особенно с продуктами нефтехимических производств, происходят

изменения в состоянии печени [1]. Это является неспецифической ответной реакцией организма, направленной на поддержание гомеостаза, однако со временем это может привести к нарушению компенсаторных процессов в организме и, как следствие, к заболеванию организма. В профилактической медицине растительные лекарственные средства используются для восстановления и коррекции уровня здоровья при состояниях напряжения функциональных резервов различных систем организма, особенно у лиц, связанных с неблагоприятными условиями труда [2, 3]. Применение для этих целей фитопрепаратов имеет ряд преимуществ по сравнению синтетическими препаратами, в частности это: биологическая доступность, многостороннее, мягкое, умеренное действие, незначительное количество побочных эффектов, ценовая доступность и психологическая благосклонность населения к лекарственным растениям [2].

Нами в ходе информационного поиска и аналитического рассмотрения различных рецептов был выбран для проведения профилактических мероприятий фитосбор «Золотистый» (производитель ООО «Травы Башкирии»), на который получен патент на изобретение № 2004119647 от 28.06.2004 «Сбор лекарственных растений для комплексной терапии заболеваний печени и желчевыводящих путей при хронических интоксикациях, связанных с производственными (техногенными) и бытовыми токсическими воздействиями». В состав чайного напитка входят: плоды расторопши, шиповника, чага, соплодия ольхи, трава душицы, тысячелистника, пустырника, горца птичьего (спорыша), семя льна, цветки бессмертника.

В ходе доклинических исследований, проведенных лабораториями Башгосмедуниверситета, было получены данные, которые позволяют утверждать, что фитосбор «Золотистый» обладает антиоксидантными и гепатопротекторными свойствами [4, 5].

Нами было обследовано 142 человека в возрасте от 22 до 56 лет, работающих на нефтеперерабатывающем производстве, из них 30 женщин, 112 мужчин. Стаж работы на вредном производстве от 2 до 26 лет. Работники предприятия после сбора анамнеза разделены на две группы: группа 1 – с симптомами нарушения функционального состояния гепатобилиарной системы, группа 2 – условно здоровые лица. Группу 1 (47 человек, мужчин – 41, женщин – 6, стаж работы – 10-26 лет; возраст 34-56 лет) составили в основном рабочие, непосредственно контактирующие с производственными вредностями и часто предъявлявшие жалобы на плохое самочувствие, головные боли, головокружение, повышенную утомляемость, снижение работоспособности. Группу 2 (сравнения) составили 42 здоровых человека, работающих в более комфортных производственных условиях (инженерно-технические работники), не предъявлявшие жалоб на общее самочувствие и не болевшие какими-либо заболеваниями (условно здоровые, возраст – от 27 до 50 лет, мужчин – 18, женщин – 24, стаж работы от 2 до 12 лет).

Для изучения показателей гомеостаза использовались клиничко-лабораторные методы: биохимическое исследование функционального состояния гепатобилиарной системы с определением активности индикаторных ферментов (аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), □-глутамилтрансфераза (ГГТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), содержания общего билирубина, тимоловой пробы, а также уровня общего холестерина (ОХС).

Рабочие из группы 1 принимали фитосбор «Золотистый» (200 мл настоя, в течение 60 дней, перед обедом; настой готовился из расчета 5 г сбора на 200 мл кипятка, настаивали 40-45 мин и процеживали). Работники 2-й группы фитосбор не принимали. Исследование проводилось до и после курса фитотерапии.

Известно, что повышенный уровень АЛТ и АСТ в сыворотке крови свидетельствует о повреждении мембран гепатоцитов, а высокие значения ферментов ГГТ, ЛДГ и ЩФ свидетельствуют о повреждениях паренхимы печени, связанных с токсическими

поражениями [7]. Анализ клинико-функциональных данных с учетом анамнеза, касающихся патологий ЖКТ, результатов УЗИ и ФГДС, имеющихся в амбулаторных картах, позволил судить о распространенности заболеваний органов пищеварения в группе 1, где наиболее распространенными оказались хронический холецистит, хронический гастрит, язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки. Частота патологий гепатобилиарной системы была выше в среднем на $24 \pm 2\%$ ($p < 0,05$) в группе 1.

При сравнении анализов до профилактического лечения было установлено, что у работников 1-й группы наблюдался повышенный уровень АЛТ, АСТ, ГГТ (особенно ярко), ЛДГ и ЩФ по сравнению с группой 2. Отклонения биохимических показателей цитолиза (АЛТ, АСТ, ЛДГ), холестаза (ЩФ, ГГТ, ОХС и билирубина), синдрома воспаления (повышенный уровень тимоловой пробы) являются индикаторными показателями неблагоприятного воздействия производственных факторов на состояние гепатобилиарной системы [7].

Влияние фитосбора «Золотистый» на биохимические показатели работников нефтеперерабатывающего производства ($M \pm m$)

Показатели	Контроль	Группа 1 (фитосбор)		Группа 2 (без фитосбора)	
		исходные	через 2 мес	исходные	через 2мес.
АЛТ, ед	< 42	42,2±1,1	38,4±1,3	35,4±1,2	36,1±1,3
АСТ, ед	5-37	40,2±1,1	35,4±1,9*	32,6±1,8	31,9±1,1
ГГТ, МЕ	< 48	50,6±1,8	42±1,6*	39,2±1,3	40,2±1,9
ЩФ, едд/л	30-90	78±2,3	69±4,9	68±3,5	67±2,7
ЛДГ, ед/л	140-350	275±12	267±9	257±11	254±9,5
ОХС, ммоль/л	< 5,2	5,2±0,1	4,2±0,1*	4,7±0,1	4,6±0,2
Общий билирубин, мкмоль/л	3,4 – 20,5	19,3±0,9	13±0,3*	12±0,7	12±0,3
Тимоловая проба, Sh	0-4	6,4±0,6	3,2±0,3*	2,8±0,2	2,7±0,6

* Значимость различий показателей до и после курсовой фитопрофилактики, $p < 0,05$.

Курсовое в течение 2 месяцев использование фитосбора «Золотистый» у работников 1-й группы приводило к снижению в разной степени активности ферментов АЛТ, АСТ, ГГТ, ЛДГ и ЩФ. После применения фитосбора также наблюдалось улучшение показателей тимоловой пробы при снижении содержания общего холестерина в крови.

Все работники 1-й группы на фоне приема фитосбора «Золотистый» отмечали улучшение самочувствия, значительное улучшение отмечалось у 14 человек (из 47), улучшение – у остальных. У многих из них анализируемые объективные показатели стали сопоставимы с показателями 2-й группы (условно здоровые).

Такие изменения биохимических показателей на фоне фитосбора свидетельствуют, что чайный напиток «Золотистый» обладает гепатопротекторными свойствами. Вероятно, это связано с компонентами данного фитосбора, их химическим составом, обладающих антиоксидантной активностью, желчегонным, противовоспалительным и гепатопротекторным эффектами. Фитосбор «Золотистый» показал хорошую переносимость всеми работниками, побочных эффектов, аллергических реакций за время наблюдения не выявлено.

Литература

1. Гизатуллина Д.Ф. Условия труда и состояние здоровья ремонтных рабочих современных нефтехимических производств: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2010. 23 с.

2. Барнаулов О.Д. Детоксикационная фитотерапия, или противоядные свойства лекарственных растений. СПб.: Политехника, 2007. 410 с.
3. Пупыкина К.А., Фархутдинов Р.Г. Фитотерапия очищения и омоложения. Уфа: Травы Башкирии, 2010. 116 с.
4. Корсун В.Ф., Пупыкина К.А., Корсун Е.В. Руководство по клинической фитотерапии. Лекарственные растения в гастроэнтерологии. М.: Практическая медицина, 2008. 464 с.
5. Азнабаева Ю.Г., Каспранский Р.Р., Фархутдинов Р.Р. Антиоксидантные свойства чайных напитков фирмы «Травы Башкирии» // Эфферентная терапия. 2001. Т. 7, № 2. С. 52–56.
6. Сперанский В.В., Гордеев М.В., Фархутдинов Р.Г. Исследование гепатопротекторной активности чайного напитка «Золотистый» // Здоровоохранение Башкортостана. 2003. №4. С. 25–27.
7. Куценко С.А. Основы токсикологии. СПб.: Фолиант, 2004. 715с.

УДК 577.175.722:577.170

ВЫДЕЛЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ СИНТЕЗА ПРОСТАГЛАНДИНА E2 КОМПЛЕКСА МИКРОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Гарипова М.И., Усманова Р.Р., Ишмухаметов А.А., Габдрахманов А.И.

Башкирский государственный университет

Простагландины представляют собой группу физиологически активных веществ липидной природы, содержащихся в органах и тканях организма и выполняющих роль тканевых гормонов. Биогенными предшественниками простагландинов в организме являются арахидоновая и некоторые другие ненасыщенные жирные кислоты (дигомолиноленовая), содержащиеся в фосфолипидах клеточных мембран. Простагландины в настоящее время используются в качестве лекарственных препаратов, одним из них является простагландин E₂ (ПГЕ₂). ПГЕ₂ обладает бронхоконстрикторным действием; уменьшает периферическое сопротивление сосудов и снижает артериальное давление, увеличивает проницаемость капилляров. Биосинтез простагландинов происходит при участии комплекса ферментов, состоящего из циклооксигеназ 1 и 2 - ферментов, синтезирующих простагландин H и тканеспецифичного фермента, превращающего ПГН в простагландин, специфичный для конкретной ткани. В случае везикулярных желез это ПГЕ₂. Простагландин - синтазы локализуются в мембранах клеток, в том числе мембранах ЭПС, ядерных мембранах и комплексе Гольджи. В ряде работ показано, что выделенный ферментативный комплекс может быть использован для синтеза простаглантина E₂ *in vitro* (Бейсембаева Р.У. и соавторы., 1999)/

В задачу нашего исследования входило воспроизведение метода выделения микросомальных ферментов синтеза ПГЕ₂ и оптимизация условий синтеза ПГЕ₂. Проведено сравнение нескольких методик выделения микросомальной фракции из везикулярных желез барана. Оптимальным, по нашим данным, является выделение комплекса ферментов по следующей методике. Железы освободить от пленок и взвесить 50 г. Добавить 50 мл охлажденного 0,2 М ТРИС-НСI –буфера рН8,0, содержащего 25 мг восстановленного глутатиона и 25 мг цистеина. Гомогенизировать 1 минуту при максимальных оборотах на бытовом миксере мощностью 750 Вт. Гомогенат разлить в 2

центрифужные пробирки и центрифугировать при охлаждении на центрифуге при 4 000 оборотах/мин в течение 10 минут. Осадок и плавающие на поверхности пробирки липиды отбросить, надосадок перенести в эпиндорфы и центрифугировать при охлаждении на центрифуге Minispin при максимальных оборотах 30 минут. Осадок еще раз суспендировать в 0,2 М ТРИС-НСI –буфере рН8,0 с добавлением 25 мг восстановленного глутатиона и 25 мг цистеина и еще раз отцентрифугировать в тех же условиях. Осадок в каждой пробирке ресуспендировать в 1 мл 0,2 М ТРИС-НСI буфера, содержащего 1 мг/мл восстановленного глутатиона и 1 мг/мл адреналина. Полученная микросомальная фракция может быть использована для проведения синтеза ПГЕ2 *in vitro*. Запуск реакции проводили добавлением в каждую пробирку 0,2 мл раствора арахидоновой кислоты (2,5 мг/мл) в этаноле. Пробирки инкубировали при 37° при периодическом встряхивании. Время реакции варьировало от 15 до 60 минут. Каждые 15 минут отбирались пробы для определения концентрации ПГЕ2 методом иммуноферментного анализа.

Установлено, что оптимальное время проведения реакции составляет 60 минут, при этом достигается максимальная концентрация ПГЕ2 - 1250 пг/мл. Попытки хранить полученный ПГЕ2 при замораживании в водных растворах были неудачными – через сутки концентрация простагландина E2 снизилась до 625 пг/мл.

Таким образом, проведено выделение комплекса микросомальных ферментов, осуществляющих биосинтез ПГЕ2 в везикулярных железах животных. Показано, что полученный микросомальный препарат может быть использован для синтеза простагландина E2 *in vitro*.

Литература

1. Р.У. Бейсембаева., Т.А. Зацерковная, Ю.А. Кузнецова, А.Т.Мевх и соавторы.,1999 Простагландин Н-синтаза: стабильность и активность при иммобилизации на силикагеле. /Биоорганическая химия .-1999.- т. 25.- №3.- с. 179-183.

УДК 577.175.722:577.171.6

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ТРАНСПОРТА ГИДРОФИЛЬНЫХ ГОРМОНОВ В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Гарипова М.И., Усманова Р.Р., Веселов С.Ю., Зинатуллина Л.Р., Шигапова А.И.,
Новоселова Е.И.

Башкирский государственный университет

В настоящее время достаточно точно определены пределы нормальных концентраций в крови человека всех известных гормонов, однако вопрос о распределении присутствующих в крови гормонов между двумя системами транспорта: эритроном и транспортными белками крови, изучен недостаточно. Еще в 70-х и 80-х годах двадцатого в работах отечественных и зарубежных авторов был описан транспорт различных гормонов эритроцитами (Сандуляк Л.И., 1974). Экспериментально доказана способность эритроцитов транспортировать значительные количества инсулина (Сандуляк Л.И., 1974) и трийодтиронина (Osty J.et.al.,1988). Причем, было показано, что транспорт инсулина эритроцитами осуществляется

за счет его связывания специфическими рецепторами поверхности эритроцитов.

Другая система транспорта гормонов - транспорт в комплексе с белками плазмы крови, связывающими гормоны с разной степенью специфичности. Наиболее типичным этот вид доставки к тканям является для гормонов гидрофобной природы, для которых описано большое количество транспортных белков (Марри Р. и соавт., 1993, Покровский В.М. и соавт., 2007).

Соотношение вкладов в доставку к периферическим тканям гидрофильных и гидрофобных гормонов эритроцитарного и сывороточного транспорта до настоящего времени не получило экспериментальной оценки. В связи с этим, была поставлена цель данного исследования - определить это соотношение для гидрофильных гормонов. Оценку соотношения проводили по величине коэффициентов распределения гидрофильных гормонов между поверхностью эритроцитов и плазмой крови.

Проведено определение коэффициентов распределения между поверхностью эритроцитов и плазмой крови тиреотропного, лютеинизирующего, фолликулостимулирующего гормонов, пролактина и инсулина.

Экспериментальные данные представлены в таблице 1. Из них следует, что для исследованных гормонов второй группы (пролактина, тиреотропного гормона, лютеинизирующего гормона, фолликулостимулирующего гормона), за исключением инсулина, характерно резкое преобладание связанной с эритроцитами фракции гормона по сравнению с гормоном, присутствующим в плазме крови.

Таблица 1

Распределение гормонов между поверхностью эритроцитов и плазмой крови здоровых доноров

Гормон	Поверхность эритроцитов	Плазма	Пределы нормальных значений в сыворотке крови мужчин	Коэффициент распределения эритроциты/плазма
Тиреотропный гормон (ТТГ)	65,7± 2,98 мкМЕ/мл	0,55± 0,027 мкМЕ/мл	0,4-4 мкЕд\мл	119,45±3,560
Лютеинизирующий гормон (ЛГ)	200± 8,36 мМЕ/мл	0,49 ± 0,025 мМЕ/мл	0,8-7,6 мМЕ/мл	408,16±8,640
Фолликулостимулирующий (ФСГ)	360 ± 17,55 МЕ/мл	3,56 ± 0,182 МЕ/мл	0,7-11,1 мМЕ/мл	101,12±17,560
Пролактин	132,4 ± 6,74 МЕ/мл	1,3 нг/мл	2,5-17 нг/мл	101,810
Инсулин	3,96±0,078 мкЕд\мл	8,04±0,092 мкЕд\мл	3 – 20 мкЕд\мл	0,49±0,016

Величина коэффициентов распределения всех гормонов этой группы, за исключением инсулина, превышает 100. Очевидно, это свидетельствует, о наличии на поверхности эритроцитов специфических рецепторов к этим гормонам и о чрезвычайно низкой концентрации в плазме крови связывающих эти гормоны белков.

Иначе распределяется между рецепторами поверхности эритроцитов и плазмой крови инсулин. Из полученных данных следует, что в норме, в отличие от аналогичных коэффициентов других белковых гормонов, коэффициент распределения инсулина меньше единицы и составляет $0,49 \pm 0,016$. Вероятно, это свидетельствует о том, что в отличие от других гормонов второй группы, инсулин доставляется к периферическим тканям при сопоставимом участии эритроцитарного и сывороточного транспорта (1:2, таблица 1). Это позволяет предположить, что в плазме крови инсулин связывается с транспортными белками крови.

Таким образом, согласно полученным данным, особенность транспорта инсулина по сравнению с другими гормонами второй группы, заключается в том, что в нем значительная роль принадлежит системе транспорта, типичной для гормонов первой группы - системе транспортных белков крови (Гарипова М.И., и соавт., 2008). Вероятно, биологическая роль этих белков заключается в создании сывороточного депо инсулина и снижении его связывания эритроцитами. В связи с этим представляет значительный интерес изучение состава и свойств белков, взаимодействующих с инсулином в плазме крови. Следует отметить, что согласно данным литературы, пептидные и белковые гормоны обычно не имеют специальных транспортных белков в плазме крови (Марри Р., и соавт., 1993), что согласуется с данными таблицы 1. Из полученных данных следует, что инсулин является исключением из этого правила.

Таким образом, установлено, что за исключением инсулина, все исследованные гидрофильные гормоны транспортируются преимущественно в комплексе с рецепторами поверхности эритроцитов.

Литература

1. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека.- М.: Мир.-2 т, 1993- С.247-263;
2. Решетников О.В. Новые подходы в лабораторной диагностике.- Новосибирск.- 2009.- 349 С.
3. Покровский В.М., Коротько Г.Ф. Физиология человека М:2007.
4. Сандуляк Л.И. Эритроциты как депо и система транспорта инсулина // Доклады Академии наук С С С Р.-1974.-т. 219.-№ 4.-с. 1020 – 1021;
5. Osty J., Laurence J., Jacques F., Blondeau J.-P. Tiroksin-binding erythrocyte function. // Endocrinology. 1988.-v. 123 .- N 5.- p. 2303-2311.

УДК 612.018

ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС И ЛИПИДНЫЙ СПЕКТР У ЮНОШЕЙ С РАЗНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ ПОДГОТОВКОЙ

Даутова А. З., Усманова С. Р., Рыскова А. А., Шамратова В. Г

Башкирский Государственный Университет

Спортивная деятельность является частным случаем универсального механизма адаптации организма человека к возрастающим физическим нагрузкам. Особенностью адаптации в спорте от других сфер человеческой деятельности, требующих приспособления к экстремальным условиям, является многоступенчатость адаптации к усложняющимся условиям внешней среды [5]. В процессе адаптации спортсменов к физическим нагрузкам происходит перестройка нейрогуморальной регуляции всех функциональных систем организма [4], а чрезмерные физические и эмоциональные нагрузки способны привести к дисбалансу регуляторных механизмов.

Влияние гормонов на обменные процессы и прежде всего на интенсивность энергетического обмена имеет большое значение для обеспечения в организме предельной мобилизации всех возможностей в условиях соревнования [1]. Особый интерес представляет изучение гормонов, участвующих в формировании адаптационных реакций организма спортсменов. Огромная роль здесь принадлежит гипоталамо-гипофизарной системе [2].

В связи с этим целью настоящего исследования является изучение гормонального статуса и липидного спектра у спортсменов, занимающихся разными видами спорта.

Методы исследования

В исследовании приняли участие юноши, занимающиеся кикбоксингом, тяжелой атлетикой, легкой атлетикой и хоккеем (n=27) в возрасте от 18 – 22 лет. Контрольную группу составили студенты того же возраста (n=43). У каждого испытуемого определяли содержание липидов в плазме крови и уровень гормонов. Кровь из вены забиралась в утреннее время натощак. Биохимический анализ крови выполнен на анализаторе «Comelab-30». Изучены концентрации в плазме крови: холестерина, триглицеридов (ТГ), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), рассчитан индекс атерогенности (ИА). Концентрацию кортизола (нмоль/л), тиреотропного гормона ТТГ (мкМЕ/мл) и свободного тироксина Т4 (нмоль/л) определяли с помощью иммуноферментного анализатора ChemWell (Австрия). Результаты обрабатывали при помощи пакета программ «SPSS Statistics 6.0».

Результаты и обсуждение

Данные, полученные в результате исследования, представлены на рис. 1. Известно, что у людей занимающихся спортом, основные энергетические потребности реализуются за счет ТГ, наши результаты продемонстрировали незначительное, но достоверное повышение ТГ в группе спортсменов. Доля фракции ЛПОНП - липопротеинов, осуществляющих транспорт экзогенных липидов в плазме, у спортсменов также была достоверно выше, чем у юношей, не занимающихся спортом. Статистически значимое, но не существенное различие было выявлено для фракции ЛПВП: у спортсменов средние значения ЛПВП были ниже по сравнению с контрольной группой, что можно расценивать как неблагоприятный фактор, так как данный показатель относится к антиатерогенным липопротеинам, препятствующим развитию атеросклероза.

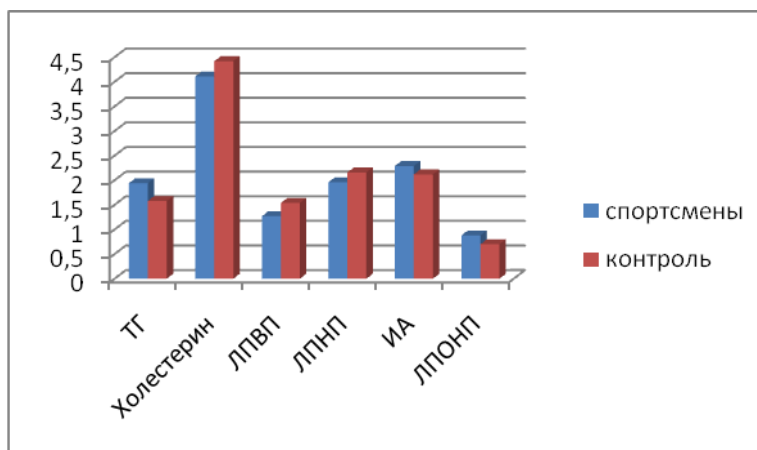


Рис. 1. Показатели липидного спектра у спортсменов и в контрольной группе

Гормональный статус спортсменов оценивали по уровню кортизола, отражающего адаптационные механизмы. Из табл. 1 видно, что у спортсменов уровень кортизола достоверно выше, чем в контрольной группе.

Таблица 1.

Показатели уровня гормонов у спортсменов и в контрольной группе

показатели	группы обследуемых	
	спортсмены	контроль
кортизол	784,16±79,57*	528,41±47,42*
ТТГ	1,54±0,36	1,82±0,19
Т4 свободный	14,39±0,45*	16,71±0,41*

Примечание: * - достоверное отличие показателя в группах обследованных ($p < 0,05$).

Очевидно, повышение уровня кортизола у спортсменов способствует адаптации организма к высоким физическим и психологическим нагрузкам. Вместе с тем, с высоким уровнем кортизола может быть связана повышенная заболеваемость спортсменов, т.к., являясь иммунодепрессантом, кортизол способен вызывать угнетение системы иммунитета [3].

Кроме того, из результатов нашего исследования вытекает, что у лиц, занимающихся спортом, независимо от характера физических нагрузок, уровень тиреоидного гормона достоверно, но не существенно ниже, чем у не спортсменов. Индивидуальные значения уровня тиреоидного гормона не выходят за пределы физиологических нормативов. Тиреотропный гормон (ТТГ), регулирующий в свою очередь Т4 свободный, в обеих группах статистически значимо не отличался.

Таким образом, проведенное исследование, подтвердило факт того, что чрезмерные физические и психоэмоциональные нагрузки, которым подвергается организм спортсменов, сопровождается изменением гормонального статуса и соответственно дисбалансом в деятельности регуляторных механизмов.

Литература

1. Виру А. А. Гормоны и спортивная работоспособность / А.А. Виру, Л. К. Кырге. М.: Физкультура и спорт, 1983. – 159 с.
2. Дедов И. И. Эндокринология / И. И. Дедов, Г. А. Мельниченко, В. В. Фадеев. М.: Медицина, 2000. – 632 с.

3. Исаев, А. П. Стратегии адаптации человека: учебное пособие / А. П. Исаев, С. Г. Пичагина, Т. В. Потапов. – Тюмень: [б.и.], 2003. – 248 с.
4. Лыков А. А., Середенко Л. П., Добровольская Н. А. Практикум по лечебной физкультуре в терапии./ Под ред. проф. А. А. Лыкова – Донецк, 2001. – 175 с.
5. Таймазов В. А. Спорт и иммунитет./ В. А. Таймазов, В. Н. Цыган, Е. Г. Мокеева. Спб.: Олимп Спб, 2003. – 200с.

УДК 577.1

ЛЕКТИНЫ И СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Корсун В.Ф., Корсун Е.В., Лахтин М.В.

Кафедра фитотерапии ФПКМР РУДН; Институт фитотерапии; www.fitokor.ru

Актуальность. Для успешного решения актуальных вопросов современного здравоохранения необходима дальнейшая интенсификация исследований в области биологии и медицины. Особое значение придается развитию молекулярной биологии. Прогресс и достижения в этой области науки тесно связан с развитием новых методов исследований. Одним из них являются определение фитолектинов – белков, обладающих свойством обратимо и избирательно связывать углеводы, не вызывая их химического превращения. Применение лектинов для решения основных проблем иммунологии, онкологии, вирусологии, диабетологии, клеточной биологии является одним из перспективных методологических подходов. Благодаря своим уникальным свойствам лектины стали объектом интенсивного изучения и широкого внедрения в различных областях биологических и медицинских исследований.

Открытие лектинов относится к 1887-1888 гг., когда Штильмарк в университете г. Дерпта описал необычную активность в экстрактах из семян клещевины. Эти экстракты агглютинировали - вызывали агрегацию эритроцитов. В значительно более позднее время появился сам термин “лектины”. Он был дан Бойдом и происходит от латинского *lectus*, причастия от глагола *legere* (выбирать). Большой стимул в исследовании и использовании лектинов растительного происхождения появился после обнаружения того факта, что некоторые из лектинов агглютинируют эритроциты человека дифференцированно, в зависимости от группы крови. В настоящее время лектинами называют белки, обладающие свойством обратимо и избирательно связывать углеводы, не вызывая их химического превращения. Для проявления биологической активности большинству лектинов необходимы ионы Ca, Mn, Si, которые связываются в определенных центрах.

Лектины тесно связаны с исследованием структуры и функцией клеточных мембран, что важно при различных патологических состояниях (злокачественной трансформации клеток, нарушениях клеточного метаболизма, изосерологии, агглютинации вирусов и микроорганизмов и пр.). Последний фактор значимости лектинов особенно важен при развитии резистентности патогенов (микробов, вирусов, интоксикантов и пр.) к действию антибиотиков и химиопрепаратов.

Взаимодействие клетки с ее окружением осуществляются при участии рецепторов, расположенных на ее поверхности. Один из основных классов рецепторов клеточной

поверхности участвует в клеточной адгезии. Этот класс включает рецепторы, которые необходимы для узнавания клетками друг друга и для их адгезии. Способность клеток к специфическому взаимному узнаванию и адгезии крайне важна для эмбрионального развития, для поддержания стабильности тканей. Межклеточное узнавание важно при иммунном ответе, при свертывании крови, регуляции клеточного роста и дифференцировки, опухолевой трансформации и пр.

Множество бактерий образуют колонии на твердых субстратах, а в некоторых случаях прилипают к специфическим поверхностям благодаря ворсинкам, которые содержат адгезин, который функционирует как лектин, т.е. сахаросвязывающий белок.

В организме человека есть собственные, эндогенные лектины и есть экзогенные, которые поступают с продуктами питания. Они стимулируют синтез ДНК и РНК в лимфоцитах крови, повышают способность клеток использовать глюкозу, активизируют выработку в организме ряда гормонов, кислот и ферментов. Например, лектины способствуют выделению инсулина из поджелудочной железы, а при взаимодействии с жировыми клетками выполняют сходную с этим гормоном функцию.

В общем, эти биологически активные соединения необходимы организму для нормальной жизнедеятельности и борьбы с болезнями, а их недостаток, наоборот, тормозит обменные процессы, снижает показатели иммунитета, ведет к «зашлакованности» тканей и органов. Дефицит лектинов может возникнуть по разным причинам, например, при несбалансированном питании, под воздействием радиации. Известно, что лектины стремительно расходуются при стрессах, воспалительных процессах, при некоторых онкологических заболеваниях. В то же время насыщение организма некоторыми лектинами способно полностью восстановить нарушенные функции даже тогда, когда шансы на выздоровление кажутся незначительными.

Это уникальная способность лектинов привлекла и привлекает внимание ученых – медиков, биологов во многих странах мира (США, Англия, Чехия, Израиль, Голландия, Украина и др. Благодаря исследованиям сотрудников Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины (Е.Л. Голынская, Карпова И.С и сотр., 1964 – 1989), Института эпидемиологии и микробиологии МЗ Республики Беларусь (В.И. Вотяков, Е.И. Бореко, В.М. Римша, В.Г. Гудков, 1986 – 2005), Института гриппа РАМН (О.И. Киселев, Позднякова М.Г., Колыванова И.Л., Максакова Е.Л., 1999 – 2005), МНИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (В.М. Лахтин, 2003 – 2006), Института фитотерапии (В.Ф. Корсун, Е.В. Корсун, 1998 – 2006) были созданы практические возможности использования фитолектинов в профилактике и лечении таких заболеваний, как псориаз, вирусный гепатит В и С, сахарный диабет, герпес, различных серотипов гриппа, некоторых онкологических заболеваний и других социально-значимых болезней человека.

Практическая сторона данной проблемы в нашей стране началась с 60-х годов прошлого столетия, когда сотрудница Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины Е.Л.Голынская успешно защитила диссертацию по лектинам. Посвятив свою жизнь поиску лектинов в растительном мире, она за 20 лет работы провела скрининг более 300 лекарственных растений, впервые выявила свыше 80 видов лектиносодержащих трав и установила перечень около десятка растений, содержащих лектины в больших количествах.

По результатам этих многолетних исследований удалось установить, что травы с таким высоким содержанием лектинов могут произрастать только на локальных территориях, имеющих залежи реликтового кремния. Благодаря инициативе энтузиастов Украины (Е.Л. Голынская, И.С. Карпова) и Беларуси (В.М. Римша) была создана пищевая добавка под названием «ФитоГоР», в состав которой входили Melissa, многоколосник, мята, календула, котовник, кукурузные рыльца, шалфей, вереск и др. В технологии приготовления сбора положены новейшие достижения сбора, тщательного контроля на чистоту, переработки и

совместимости лекарственных растений, что позволило создать высокоэффективный препарат невысокой стоимости и не имеющий аналогов в мире.

Обсуждение результатов. Данное средство было тщательно изучено учеными Белоруссии, России (Институт гриппа РАМН, Институт фитотерапии) и в последующем было зарегистрировано для использования на территории России в качестве оригинальной биологически активной добавки к пище. Доказано и противовирусное и противоопухолевое действие лектиносодержащих растений, таких как иван-чай, чага, календула, листья персика, трава душицы, плоды можжевельника, листья и корневища бадана, шлемника байкальского и др. Практически все перечисленные растения были изучены в МНИИЭМ МЗСР им. Н.Г. Габричевского. Оказалось, что наибольший титр лектинов был обнаружен в «Чаговите», полученном при низкотемпературной экстракции из березового гриба чаги (В.Ф. Корсун, В.М. Лахтин и др., 2007).

Современная медицина считает лучшим комплексное лечение онкологических больных. Оно заключается в комбинации хирургического вмешательства с различными видами облучения и химиотерапией.

Химиотерапия как самостоятельный метод лечения используется лишь при отдельных формах злокачественных новообразований. Отсутствие достаточной избирательности противоопухолевого действия большинства противоопухолевых препаратов и развитие общетоксических симптомов при их применении являются главными причинами, заставляющими прерывать лекарственное лечение онкологических больных. Поэтому на современном этапе одной из актуальных проблем химиотерапии злокачественных опухолей является создание препаратов, которые направленно действовали бы на опухоль, не повреждая при этом нормальные ткани и не вызывая развития общетоксических симптомов, настолько тяжелых, что заставляют прекратить курс лечения, не добиваясь положительного результата.

Эффективность лечения онкологического больного в значительной степени зависит от биологических способностей опухолевых клеток, в первую очередь, способности к инвазивному росту и их метастатического потенциала. Последние в свою очередь определяются адгезивными свойствами. Во взаимодействии и функционировании клеток чрезвычайно важны механизмы лектин-рецепторного узнавания. В настоящее время практически единственным препаратом, воздействующим на рецепторы опухолевых клеток, является герцептин.

Получение возможностей высокоэффективной фитотерапии герпеса от «Протефлазид», «Панавир», а также от БАД «Чаговит», «Флоравит», «Оводорин», «Фитомикс-40» позволяет распространить эти данные на решение практических вопросов лечения герпесиницированных онкологических заболеваний: лимфомы Беркита, назофарингеальный рак, протоковый рак молочной железы, рак шейки матки. В настоящее время известны веские аргументы в пользу вирусного происхождения лимфогранулематоза, саркомы Капоши, меланомы, глиобластомы, первичного рака печени, рак вульвы, влагалища, ануса, пищевода и миндалин (Ш.Х. Ганцев, 2006)..

Для лечения ретровирусных инфекций, к которым относится и псориаз, по нашему мнению, перспективны растения, содержащие лектины. В этом мы убедились, используя сборы лектиносодержащих растений, а также и др.

Результаты исследований отечественных и зарубежных авторов в области лектинов и рецепторов к ним свидетельствуют о возможности дифференцировать доброкачественные и злокачественные новообразования, прогнозировать опухолевую инвазию, эффективность лечения ряда опухолей.

Вспомним такое растение, как кипрей узколистный, который простирается в России на многие сотни квадратных километров в Тверской и Новгородской областях. В конце 70-х годов прошлого столетия была опубликована серия научно-исследовательских и

диссертационных работ, выполненных в ВОНЦ им. Н.Н. Блохина. Результаты их указывали, что предполагаемый препарат «Ханерол» оказывал выраженное противоопухолевое и антиметастатическое действие. Только разработчики не учли результаты исследований Е.Л. Гольинской и данные Биологического института (СПб.) о том, что растительные средства, содержащие лектины не должны подвергаться температурному воздействию выше 62⁰ С, спирту более 40% концентрации и подслащивания сахаром или медом. По нашим данным, водный настой кипрея хорошо помогает при лимфопролиферативных заболеваниях, в том числе лейкемии, псориазе, герпесе и саркоме Капоши (В.Ф. Корсун и др., 2009).

Малочисленные результаты исследований, выполненные в Израиле, на Украине указывают на возможность использования лектинов арахиса и гороха в прогнозировании регионарных и отдаленных метастазов в клетках опухоли. По мнению украинских авторов, наличие концевой остатка альфа-D-маннозы, содержащего в горохе повышает сцепление опухолевых клеток, в результате чего снижается их способность к регионарному и отдаленному метастазированию.

Задача химиков, технологов, экспериментаторов найти такие средства, которые бы воздействовали на рецепторы опухолевых клеток. Среди представителей растительного мира, содержащих фитолектины есть такие растения, которые аргюе обладают подобными свойствами. К ним можно отнести омелу белую, представители грибов шиитаке, сейтаке, чаги, вешенки, которые должны быть подвергнуты определенной технологии переработки и клинического применения в отечественной онкологической практике. Уже получены обнадеживающие практические результаты от таких отечественных фунгопрепаратов, как «Оводорин», «Флоравит», «Трамелан», «Чаговит» и др.

Выводы. Лектины участвуют в процессах роста, размножения, фагоцитоза, иммунных и аллергических реакциях. Они могут ингибировать рост и развитие мицелия грибов, индуцировать секрецию инсулина клетками островков Лангерганса поджелудочной железы, воздействовать на резистентность к антибиотикам и химиопрепаратам, стимулировать интерферогенез, проявлять противоопухолевую, противомикробную и противовирусную активность.

Разработанные в последнее время фитопрепараты (фитоГоР, ХитоКор, флоравит, панавир, оводорин, чаговит, хеликсор, гипорамин и др.) в определенной мере, заменяют антибиотики, противовирусные и общеукрепляющие препараты (интерферон, тактивин и др.) и большинство противовоспалительных средств, не безразличных для нашего с Вами здоровья.

В ряде стран (США, Чехия, Грузия, Голландия, Япония, Германия и др.) уже используют выделенные лектины с лечебной и профилактической целью. А если учесть практически полное отсутствие побочных явлений и противопоказаний у большинства лектинов, то можно с уверенностью сказать, что данные средства - это определенный шаг к совершенно новому подходу к современной молекулярной (рецепторной) фармакотерапии и фитооздоровления больных с различными заболеваниями опухолевого и вирусного характера.

Литература

1. Ганцев Ш.Х. Онкология. – М., 2006. – 488 с.
2. Корсун В.Ф., В.М. Лахтин, Е.В. Корсун, А. Мицконас. Фитолектины.– М., 2007. – 288 с.
3. Корсун В.Ф., Трескунов К.А. и др. Лекарственные растения в онкологии. – М., 2007. – 445 с.

УДК 616.94-022.7: 57.083.3-571.27

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ КОМПЛЕКСЫ АУТОАНТИТЕЛ С АНТИГЕНАМИ ГРУППЫ ПРОГОРМОНА ПРОКАЛЬЦИТОНИНА У ДЕТЕЙ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Махмутьева Ю.М., Гиматдинова Е.В., Веселов С.Ю.

Башкирский государственный университет

Прокальцитонин (ПКТ) является продуктом трансляции гена *CALC-I*, который преимущественно синтезируется в нейроэндокринных С-клетках щитовидной железы и К-клетках легких [8]. Этот прогормон является предшественником кальцитонина, который участвует в регуляции уровня кальция в организме [12]. При ферментативном нарезании ПКТ помимо кальцитонина, образуются также N-концевой пептид (N-ПКТ) и С-концевой пептид ССР-1 или катакальцин. ПКТ, N-ПКТ и ССР-1 относят к так называемым предшественникам кальцитонина [11]. В норме эти полипептиды находятся в крови в очень низкой концентрации. При сепсисе и тяжелых бактериальных инфекциях уровень ПКТ в крови возрастает в сотни раз [4] за счет его продукции тканями паренхиматозных органов [7]. В этой связи ПКТ широко используется как биологический маркер воспаления [1, 2]. В тоже время было показано, что ПКТ является медиатором развития септического процесса. Исследователи обнаружили значительное сокращение случаев смерти при экспериментальном сепсисе у свиней [6] и у грызунов [9] при введении им антител против ПКТ. Была также опубликована статья о присутствии антител к ПКТ в препарате иммуноглобулина человека для внутривенного использования [5]. С присутствием этих аутоантител некоторые авторы связывают положительное влияние препаратов иммуноглобулина на исход септических процессов.

Целью настоящей работы явилось выявление комплексов аутоантител с пептидами – предшественниками кальцитонина у детей с бактериальными инфекциями различной тяжести.

Материалы и методы

Работа выполнена на базе иммунологической лаборатории с отделением клинической иммунологии РДКБ г. Уфы и биологического факультета Башкирского государственного университета. В исследование включены 74 ребенка в возрасте от 2 дней жизни до 14 лет, которые на основании клинических симптомов и лабораторных данных были разделены на 3 нозологические группы:

Группа 1 – n = 30 – дети с тяжелой бактериальной и сепсисом;

Группа 2 – n = 24 – дети с локальной бактериальной инфекцией средней степени тяжести;

Группа 3 - n = 20 – практически здоровые дети и дети с заболеваниями не бактериальной природы.

Выявление циркулирующих иммунных комплексов, включающих продукты гена *CALC-I*, проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА). В часть лунок планшета вносили по 100 мкл моноклональных мышинных антител (мАт) РСС14 (к С-терминальному концу прокальцитонина) или РСФ38 (к N-терминальному концу прокальцитонина) фирмы “Bialexa”, Москва в концентрации 1 мкг/мл. Антитела разводили в 0,1 М фосфатно-солевом буфере, рН 7,4 (ФСБ). Сенсибилизацию проводили при 4 °С в течение 16 ч. После промывки в лунки с мАт и без антител вносили по 100 мкл исследуемых сывороток в различных разведениях, начиная с 1:32. После инкубирования планшетов при 37 °С в течение 1 ч и последующей промывки вносили пероксидазный конъюгат к IgG или

IgM человека («Сорбент», Москва). Разведения сывороток и конъюгатов готовили на ФСБ, содержащего 0,4% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0,05% твина 20. Реакцию проявляли смесью тетраметилбензида с перекисью водорода (НВО «Иммунотех», Москва) и после добавления 1 М раствора серной кислоты оптическую плотность хромогена регистрировали на микроридере Uniskan, Финляндия при 450 нм. Из значений OD продукта реакции в лунках, сенсibilизированных мАт, вычитали соответствующие показатели оптической плотности в лунках без антител. За титр ЦИК принимали наибольшее разведение сыворотки, при котором хромофорный ответ в лунке двукратно превышал хромофорный ответ в контрольных лунках с мАт, в которые вместо исследуемых сывороток вносили ФСБ+БСА+твин 20. При титрах менее 1:32 считали, что специфические ЦИК отсутствуют. Для удобства изложения материала комплексы антител с N-концевым пептидом и/или ПКТ, которые реагируют с мАт к N-концевой части прогормона обозначили IgG ЦИК_N или IgM ЦИК_N в зависимости от класса иммуноглобулина, входящего в комплекс. Соответственно, циркулирующие иммунные комплексы, включающие катакальцин и/или ПКТ, реагирующие с мАт к C-концевому фрагменту прокальцитонина получили аббревиатуру IgG ЦИК_C или IgM ЦИК_C. Вычисляли средние значения ПКТ и геометрических титров ЦИК. Вывод о достоверности различия показателей делали при $p < 0,05$. Статистическая обработка данных производилась при помощи программы Statistica 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Среди различных вариантов иммунных комплексов в наиболее высоких титрах были выявлены IgG ЦИК_N в сыворотках больных 1 группы. Средние геометрические титры (СГТ) этих комплексов в указанной группе достоверно отличались от IgG ЦИК_C и IgM ЦИК_N ($p=0,01$). Внутри 2 и 3 групп достоверных различий между титрами различных видов ЦИК не наблюдалось. При сравнении уровня иммунных комплексов в 1 и 3 группе выявили достоверную разницу между IgG ЦИК_N (СГТ $6,58 \pm 0,26$ и $5,67 \pm 0,22$, соответственно ($p=0,03$)). Титры IgG ЦИК_N у детей с тяжелой бактериальной инфекцией и сепсисом также достоверно превышали титры IgG ЦИК_C ($p=0,028$), IgM ЦИК_C ($p=0,002$) и IgM ЦИК_N ($p=0,008$) группы здоровых детей и детей без инфекционно-воспалительных процессов. В группе детей с локальными инфекциями и контролем достоверных различий не наблюдали. При сравнении иммунных комплексов в группах 1 и 2 у тяжелых больных были обнаружены более высокие титры IgG ЦИК_N по отношению к IgG ЦИК_C ($6,58 \pm 0,26$ и $5,60 \pm 0,16$, соответственно, $p=0,026$), IgG ЦИК_N ($6,58 \pm 0,26$ и $5,81 \pm 0,25$, соответственно, $p=0,049$), IgM ЦИК_C ($6,58 \pm 0,26$ и $5,75 \pm 0,28$, соответственно, $p=0,041$) и IgM ЦИК_N ($6,58 \pm 0,26$ и $5,50 \pm 0,32$, $p=0,036$). Определение частоты встречаемости различных иммунных комплексов среди исследуемых групп выявило, что в большинстве случаев (80%) в сыворотке детей с тяжелыми бактериальными инфекциями и сепсисом содержатся IgG ЦИК_N. Интересно, что иммунные комплексы к продуктам гена *SACL-1* были обнаружены не только в группах с бактериальной инфекцией, но и в группе здоровых детей. Поскольку уровень ПКТ в третьей группе был невысоким то, скорее всего, эти иммунные комплексы образовались преимущественно при участии N-концевого пептида и катакальцина. Эти пептиды циркулируют в крови здоровых людей в концентрации, превышающей уровень ПКТ приблизительно в 20 раз [11]. У детей в группах с бактериальными процессами, в особенности с тяжелой инфекцией и сепсисом, наблюдается значительно более высокий уровень ПКТ. Поэтому, циркулирующие иммунные комплексы могут, в этом случае, формироваться как с участием ПКТ, так и N-концевого пептида и катакальцина. Ранее было показано, что концентрация двух последних пептидов, в особенности N-ПКТ, также возрастает при инфекционно-воспалительных процессах [10]. Интересно, что аутоантитела, к различным цитокинам были обнаружены как у пациентов с различной патологией, так и у здоровых людей [14]. Было также показано

защитное действие аутоантитела к белку группы ядерных протеинов с высокой электрофоретической подвижностью (HMGB1) при сепсисе [3]. Можно предположить, что в нашем случае, высокий уровень, IgG ЦИК_N, который был обнаружен у детей с тяжелой бактериальной инфекцией, связан с дополнительной продукцией иммуноглобулинов класса к ПКТ. Эта защитная физиологическая реакция возможно позволяет осуществлять нейтрализацию не только ПКТ, но и N-концевого пептида, который, вероятно, не в меньшей мере, ответственен за неблагоприятные исходы тяжелой бактериальной инфекции [13].

Таким образом, нами впервые выявлены циркулирующие иммунные комплексы, включающие продукты гена *CALC-1* у больных детей с бактериальными инфекциями, детей с процессами, не связанными с инфекцией и у здоровых детей. Наиболее высокие титры комплексов, включающих IgG, ПКТ и N-ПКТ определялись у детей с тяжелой бактериальной инфекцией и сепсисом, что возможно отражает степень тяжести инфекции и реакцию организма, направленную на ограничение возможных отрицательных последствий.

Литература

1. Диагностические и прогностические возможности прокальцитонина и С-реактивного белка при различных инфекционно-воспалительных процессах у детей. / Гиматдинова Е.В., Хайруллина Р.М., Гарипова М.И., Сотникова Ю.М., Веселов С.Ю. // Фундаментальные исследования. – 2011. – N 10.Ч.2. – с. 280-282.
2. Определение уровня прокальцитонина крови в педиатрической практике / Лыскина Г.А., Дронов И.А., Тугаринова Г.В., Фоменко Т.М. // Педиатрия. - 2006. - N 4. - С. 32-44.
3. Emergence of autoantibodies to HMGB1 is associated with survival in patients with septic shock. / Barnay-Verdier S., Fattoum L, Borde C., Kaveri S., Gibot S., Marechal V. // Intensive Care Med. 2011. Vol. 37. P. 957–962.
4. High serum procalcitonin concentration in patients with sepsis and infection. / Assicot M., Gendrel D., Carsin H., Raymond J., Guilbaud J., Bohuon C. // Lancet. 1993. Vol. 341. P. 515–518.
5. Intravenous immunoglobulin prevents release of proinflammatory cytokines in human monocytic cells stimulated with procalcitonin. / Murakami K., Suzuki C., Fujii A., Imada T. // Inflamm. Res. 2012. Vol. 61. № 6. P.617-622.
6. Late immunoneutralization of procalcitonin arrests the progression of lethal porcine sepsis. / Martinez J.M., Wagner K.E., Snider R.H., Nylen E.S., Muller B., Sarani B. // Surg Infect (Larchmt). 2001. Vol. 2. P. 193–201.
7. Linscheid P., Seboek D., Nylen E.S. In vitro and in vivo calcitonin I gene expression in parenchymal cells: a novel product of human adipose tissue // Endocrinology. 2003. Vol. 144. P. 5578–5584.
8. Procalcitonin and the Calcitonin Gene Family of Peptides in Inflammation, Infection, and Sepsis: A Journey from Calcitonin Back to Its Precursors / Becker K.L., Nylen E.S., White J.C., Muller B, Snider Jr. R.H. // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2004. Vol. 89. № 4. P. 1512–1525
9. Procalcitonin increases mortality and procalcitoninrecognizing antiserum improves mortality in an experimental model of sepsis. / Nylen E.S., Whang K.L., Steinwald P.M., Snider R.H., White J.C., Becker K.L. // Crit Care Med. 1998. Vol. 26. P. 1001–1006.
10. Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic infection. / Whang K.T., Steinwald P.M., White J.C., Nyle E.S., Snider R.H., Simon G.L. // Clin Endocrinol Metab. 1998. Vol. 83. P. 3296–3301.
11. Snider R.H., Nylen E.S., Becker K.L. Procalcitonin and its component peptides in systemic inflammation: immunochemical characterization // J Invest Med. 1997. Vol. 45. № 9. P. 552–560.

12. Structure-activity relationship of human calcitonin. III. Biological activity of synthetic analogues with shortened or terminally modified peptide chains. / Rittel W., Maier R., Brugger M., Kamber B., Riniker B., Sieber P. // *Experientia*. 1976. Vol. 32. P. 246-248.
13. Tavares E., Minano F.J. Immunoneutralization of the aminoprocaltitonin peptide of procalcitonin protects rats from lethal endotoxaemia: neuroendocrine and systemic studies. // *Clinical Science*. 2010. Vol. 119. P. 519-534.
14. Watanabe M., Uchida K., Nakagaki K. Anti-cytokine autoantibodies are ubiquitous in healthy individuals // *FEBS Letters*. 2007. Vol. 581. P. 2017-2021.

УДК 002.53:004.62/.63

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЛЯЦИОННОЙ БАЗЫ ДАННЫХ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЗАДАЧ В ГЕПАТОЛОГИИ

Мингазов Р.С., Вахитов А.К., Баширова Р.М.* , Саяхова И.Д.*

Башкирский государственный медицинский университет,
*Башкирский государственный университет, г.Уфа, Россия

Одной из сложнейшей задач современной инфекционной гепатологии является мониторинг состояния больных инфицированных вирусами гепатита В, С, Е. Хронизация гепатитов С и В чревата переходом в цирроз и гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК).

За рубежом реляционные базы данных используют для отслеживания состояния больных, для критического анализа эффективности новых фармацевтических средств. В частности достаточно известная база данных Liver Tox, разработанная Национальной медицинской библиотекой (NLM), Национальным институтом диабета, желудочно-кишечных и почечных заболеваний (NIDDK) США. LIVERTOX™ предоставляет актуальную информацию о диагнозе, причинах нарушений функции печени при приеме лекарственных препаратов, растений и биологически активных добавок. LIVERTOX включает в себя реестр, позволяющий лучше характеризовать клиническую картину поражения печени.

В Ирландии работает база данных по инфицированным гепатитом С, одна из задач решаемых ею - поиск источников заражения.

Для повышения качества диагностики предложено использовать в диагностической практике информационные технологии, базирующиеся на хранении информации о симптомах и синдромах различных форм гепатита в реляционной базе данных. Внедрение современных информационных технологий, обеспечивающих удобный интерфейс доступа к информации, для разных категорий работников здравоохранения позволяет повысить качество диагностики.

Целью настоящей работы является оптимизация диагностики основных патологических синдромов различных форм гепатита у лиц с разным генотипом посредством разработки программного средства для автоматизации процессов принятия решения.

Задачи:

провести анализ предметной области с выделением элементов диагностической процедуры для компьютерной обработки;

разработать информационно-логическую модель диагностического процесса

клинических синдромов;

сформировать функциональную структуру для принятия диагностического решения в виде реляционной базы данных.

База знаний содержит программное средство с алгоритмами принятия решений, которое формируется на основе анализа симптомов с выделением ведущего синдрома и последующим проведением внутрисиндромной дифференциальной диагностики.

Объектом исследования послужила группа лиц, инфицированных различными вирусами гепатита. Исследовано 80 историй болезни пациентов с диагнозом вирусный гепатит и их осложнениями, возраст которых от 24 до 79 лет.

Для анализа информации по больным, страдающим различными формами вирусного гепатита разработана реляционная база данных, схема которой представлена ниже (рис. 1).

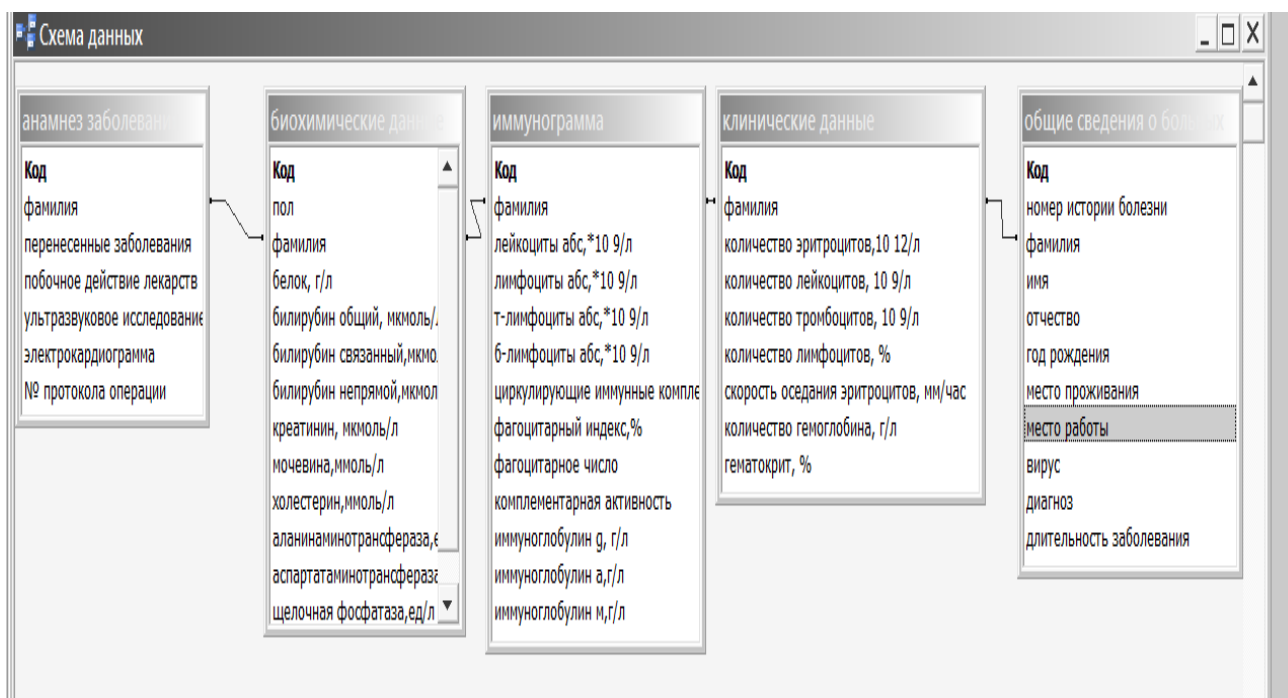


Рис.1. Схема данных, представленных в базе «Гепатологические больные»

Пример запроса на языке SQL к базе данных для поиска информации по биохимическим данным приведен ниже

```
SELECT [биохим по вирусам].вирус, [биохим по вирусам].[белок, г/л], [биохим по вирусам].[билирубин общий, мкмоль/л], [биохим по вирусам].[креатинин, мкмоль/л], [биохим по вирусам].[мочевина, ммоль/л], [биохим по вирусам]. [холестерин, ммоль/л]
```

```
FROM [биохим по вирусам]
```

```
WHERE ((([биохим по вирусам].вирус)="С")) OR ((([биохим по вирусам].вирус)="В"+"С"));
```

Информация, содержащаяся в базе данных позволяет группировать результаты исследований по полу, по типу возбудителя вирусного гепатита и по другим показателям.

Клинические данные лиц, страдающих гепатитом, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Клинические данные при различных видах гепатита

Вариант, возбудитель	Вирус не идентифицирован	Гепатит С	Гепатит В+С	Гепатит В
Эритроциты	4,27±0,15	4,19±0,20	4,36±0,18	4,00±0,15

Лейкоциты	7,11±0,38	6,46±0,37	5,26±0,67	7,16±0,56
Тромбоциты	201,04±15,85	219,18±21,77	147,05±13,64	212,04±18,4
Лимфоциты	0,33±0,02	0,34±0,03	0,35±0,03	0,33±0,03
СОЭ	20,00±3,40	14,32±2,19	10,25±1,92	20,80±3,51
Гемоглобин	128,75±4,98	121,95±5,03	132,42±5,89	117,28±4,09
Гематокрит	0,37±0,01	0,36±0,01	0,40±0,01	0,36±0,01

Как оказалось, традиционные показатели, за исключением определения билирубина и аминотрансфераз, являются малоинформативными. Более информативными являются различного рода производные показатели – индексы. Так, существенные различия при разного рода гепатитах обнаруживаются при сравнении соотношения эритроциты/лейкоциты, отражающим изменения в соотношении лейко-и эритропоэза. При этом установлено, что в наибольшей степени соотношение между различными ростками гемопоэза страдает при гепатите вызванном микст-инфекцией В+С. О нарастании интоксикации при микст –инфекции - вирусами В и С можно судить по величине коэффициента нейтрофилы/лимфоциты. Очевидно, что при оценке состояния больных со смешанным вирусным гепатитом следует пользоваться этими показателями.

Информативным является показатель ИЛСОЭ, позволяющий оценить наличие и интенсивность эндогенной интоксикации: наиболее выраженный аутоиммунный процесс при гепатите В.

Тяжесть цитолиза наиболее четко проявляется при микст-инфекции—вирусами В и С повышением активности АЛТ, при этом также отмечалась минимальная величина коэффициента де Ритиса, что является клинически неблагоприятным прогностическим признаком. При этом также снижается соотношение билирубин/ аланинаминотрансферазы. Особенно четко проявляется синдром цитолиза, оцениваемый по уровню АЛТ у пациентов с микст-инфекциями.

Аутоиммунный компонент, оцениваемый по показателю ЦИК наиболее выражен при гепатите В.

Т-клеточное звено иммунитета в наибольшей степени страдает при гепатите С, этому сопутствует также снижение фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса. В в то же время наиболее существенные изменения соотношения Т- и В-лимфоцитов отмечены при микст – инфекции – вирусами В и С

Реляционные базы данных являются инструментом, позволяющим оперативно извлекать информацию из большого массива данных, что упрощает анализ информации. При гепатите С наиболее рациональным с диагностической точки зрения является определение состояния Т-клеточного звена.

При гепатите В наиболее диагностически значимы определение состояния В-клеточного звена иммунитета и показателя ИЛСОЭ, позволяющего оценить наличие и интенсивность эндогенной интоксикации.

При микст-инфекции вирусами В и С наиболее информативно соотношение между различными ростками гемопоэза. О нарастании интоксикации при микст –инфекции - вирусами В и С можно судить по величине коэффициента нейтрофилы/лимфоциты.

Литература

1. Пятакович Ф.Д., Кузьминов О.М., Якунченко Т.И. Метод диагностики клинических синдромов на основе реляционной модели патологических процессов// Научные ведомости. Серия Медицина, Фармация. 2010, №16 (87). Вып.11. с.109-113
2. Корабельников Д.И., Рубанов Л.И. Использование электронных реляционных баз данных в научных исследованиях для обработки клинического материала // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. - 2002, Т. 12, № 5. -Приложение № 17. - С. 171. - № 635.

УДК 615.012.6; 577.112.083

ФАРМАКОКИНЕТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО КОАГУЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА VII ЧЕЛОВЕКА У КРОЛИКОВ

Орлов А.А., Кустов П.А., Красоткина Ю.В.

ЗАО «Генериум», 601125, Владимирская обл., Вольгинский, 17

Введение

Дефицит коагуляционного фактора VII (FVII) является редким (орфанным) заболеванием с частотой встречаемости 1-2 случая на 500 тыс. населения [1]. Это заболевание может быть врожденным, которое наследуется по аутосомно-рецессивному типу, или приобретенным, например, вследствие нарушения синтеза витамина К в печени. Основными клиническими проявлениями дефицита FVII являются спонтанные и посттравматические кровотечения различной локализации.

Профилактика и купирование симптомов заболевания обеспечивается повышением концентрации FVII в крови до 15% от его нормального содержания в плазме. Для заместительной терапии применяют донорскую плазму в дозе 15 мл/кг или концентраты факторов протромбинового комплекса, что сопряжено с риском вирусного заражения пациента. Например, процент инфицированных гепатитом С среди больных гемофилией составляет по разным оценкам от 60 до 90%. При этом вероятность заражения коррелирует с частотой переливания компонентов крови. Применение рекомбинантного FVII позволило бы избежать подобной опасности, однако в настоящее время такого препарата нет. Есть рекомбинантный препарат активированной формы фактора VII (rFVIIa), например Новосевен (НовоНордиск, Дания), применяемый, прежде всего, при ингибиторных формах гемофилии А и В. Молекулярный механизм антиингибиторной (FEIBA) активности rFVIIa до сих пор не ясен, несмотря на построение клеточной модели гемостаза в попытках этот механизм установить [2]. Тем не менее, успешное применение rFVIIa при гемофилии стимулировало расширение спектра использования этого препарата, в том числе и при дефиците FVII [3].

Однако нужно учесть, что в норме фактор VII присутствует в крови в неактивированном состоянии. Содержание активированной формы составляет около 1% от всего количества FVII. Повышение процентного содержания фактора VIIa сопряжено с увеличением риска развития тромбозов. Поэтому в случае, когда проявление FEIBA-активности не является необходимым, оптимальным представляется использование неактивированной формы FVII.

Недавно нами получен рекомбинантный FVII человека. Целью данной работы явилось определение фармакокинетических параметров rFVII у кроликов.

Материалы и методы

Рекомбинантный человеческий FVII был получен методом генной инженерии с использованием клеток сирийского хомячка ВНК-21. Препаратом сравнения являлся активированный rFVIIa (НовоНордиск). Состав плацебо включал все компоненты лекарственной формы за исключением действующего вещества.

В экспериментах использовали кроликов-самцов породы «Советская шиншилла» с массой тела 2,0-2,5 кг. Животные были выращены в питомнике «Белый Мох» НЦ БМТ РАМН. Кролики содержались в стандартных клетках в условиях 12-часового освещения и свободного доступа к корму и воде. Помещение, где содержались животные, соответствовало санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию

вивариев, утвержденным МЗ СССР 06.07.1973 г. Животные были разбиты на 3 группы ($n=6$), которые получали rFVII, rFVIIa или плацебо.

Содержание изучаемых препаратов в крови кроликов определяли в течение 24 часов после их однократного внутривенного введения в ушную вену в дозе 100 мкг/кг. Объем инъекции составлял 1 мл. Образцы крови в объеме 0,5-1,0 мл забирали до инъекции и через 15, 30, 60, 120, 180, 240 мин и 24 часа после введения препарата. В качестве антикоагулянта использовали 3,9% цитрат натрия. Форменные элементы крови удаляли центрифугированием в течение 15 мин при 2000g. Концентрацию обеих форм rFVII в плазме определяли методом ИФА с применением набора Human Factor VII ELISA kit (AssayPro). Аппроксимацию зависимости плазменной концентрации rFVII от времени проводили одностадийной экспоненциальной функцией методом наименьших квадратов с учетом весов усредненных экспериментальных данных. На основании этой зависимости были определены следующие фармакокинетические параметры: C_0 – кажущаяся начальная концентрация препарата; AUC₁₅₋₂₄₀ – площадь под фармакологической кривой для периода времени от 15 до 240 мин; $k_{эл}$ – константа элиминации; $t_{1/2}$ – время полувыведения; Cl – клиренс препарата. В работе приведены усредненные для каждой группы животных параметры. Среднеквадратичная ошибка не превышала 32%. Для расчетов и статистической обработки результатов использовали программу MS Origin.

Результаты и обсуждение

В результате фармакокинетического изучения rFVII в опытах на кроликах получена временная зависимость плазменной концентрации rFVII после однократного внутривенного введения препарата. Было показано, что концентрация rFVII быстро увеличивается в крови кроликов после инъекции препарата, затем экспоненциально снижается и через 6 часов фактически достигает базового значения. Через 24 часа препарат в крови животных не обнаруживался. Известно, что при поступлении экзогенного FVII в кровь, белок быстро распределяется по всему объему крови, и затем выводится гепатоцитами и клетками Купфера по механизму клатрин-зависимого эндоцитоза. Однако, исследование биораспределения радиоактивно меченного FVII показали, что в фазе равновесия в крови остается только 14% от введенного препарата [4]. Основное его количество (75%) сосредоточено во внесосудистом пространстве, где находится физиологический рецептор FVII – тканевой фактор. Также часть белка (11%) оказывается в связанном состоянии в комплексе с плазменными ингибиторами или рецепторами эндотелия. Поэтому трехкамерная модель будет наиболее полно описывать поведение препарата в организме [4]. Тем не менее, на практике для анализа фармакокинетической кривой FVII часто применяют упрощенную однокамерную модель [5], что и было сделано в данной работе.

В результате были определены основные фармакокинетические показатели. Расчетная начальная концентрация препарата C_0 составила 1,4 мкг/мл, что соответствует введенной дозе 100 мкг/кг, и среднему объему крови у кролика (32-74 мл на кг веса). Время полувыведения $t_{1/2}$ оказалось равным 82 мин. Это означает, что через 240 мин в крови кролика останется не более 15 % от исходного количества препарата. Через 24 часа содержание rFVII в крови животного не отличалось статистически значимо от исходного значения. Константа элиминации $k_{эл}$ и общий клиренс Cl были оценены в 119 мин^{-1} и 0,8 мкг/кг/мин соответственно. Площадь под фармакологической кривой в диапазоне от 15 до 240 мин составила 115 мкг*мин/мл. Расчет AUC проводился для значений концентраций rFVII, скорректированных путем вычитания исходных значений. Дело в том, что ИФА-набор, использованный в работе и предназначенный для измерения концентрации человеческого FVII, обладает перекрестной специфичностью к кроличьему FVII, которая заявлена производителем набора равной 15-ти процентам. В наших опытах кажущееся

содержание rFVII до введения препарата (исходные значения) составляло в среднем 29% от величины C_0 .

Фармакокинетика препарата сравнения rFVIIa в целом оказалась сходной с фармакокинетикой неактивированного фактора. Константа элиминации $k_{эл} = 77 \text{ мин}^{-1}$ была меньше, чем этот параметр у rFVII. Соответственно время полувыведения $t_{1/2} = 53 \text{ мин}$ оказалось короче, а общий клиренс $Cl = 1,2$, напротив, превышал это значения для rFVII. Однако наибольшие различия состояли в значениях площадей под фармакокинетическими кривыми. Для rFVIIa AUC₁₅₋₂₄₀ оказалось в 4 раза меньше и равно $25 \text{ мкг} \cdot \text{мин} / \text{мл}$. Кажущаяся начальная концентрация C_0 при этом составила $0,5 \text{ мкг} / \text{мл}$. Наблюдаемая разница между фармакокинетическими параметрами может являться, например, результатом быстрого связывания rFVIIa с белками плазмы. При этом антигенная специфичность rFVIIa в комплексе будет снижена по сравнению со специфичностью свободного фактора.

Действительно, как показывают недавние исследования [6], rFVIIa в кровотоке, по всей видимости, быстро инактивируется основным плазменным ингибитором – антитромбином III (АТIII). Ранее полагали, что этот процесс не является биологически значимым, т.к. ингибирование FVIIa АТIII в растворе крайне медленный процесс, характеризуемый константой второго порядка $k_1 \sim 1,2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [6]. Однако в результате клинических исследований, проведенных в 2011 г. было установлено, что ответственным за клиренс активного FVIIa из кровотока является именно антитромбин III [6]. При этом константа ассоциации комплекса FVIIa-АТIII оказалась более чем на порядок выше и равной $34 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Полагают, что быстрая внутрисосудистая инактивация FVIIa *in vivo* может быть опосредована взаимодействием фермента с гликанами внутренней поверхности сосуда.

Заключение

Изучение фармакокинетики рекомбинантного фактора VII человека на кроличьей модели показало, что плазменная концентрация активированной формы rFVIIa после однократной внутривенной инъекции препарата существенно ниже, чем содержание неактивированной формы rFVII. Возможной причиной данного результата является быстрая инактивация rFVIIa антитромбином III.

Литература

1. Molecular analysis of the genotype-phenotype relationship in factor VII deficiency/ D.S. Millar, G. Kembal-Cook, J.H. McVey, E.G.D. Tuddenham, A.D. Mumford, G.B. Attack, J.C. Reverter, N. Lamir, L.A. Parapia, J. Reynaud// Hum.Genet.-2001.-V. 107.- P. 327-343.
2. Mechanisms and monitoring of bypassing agent therapy/ M. Hoffman, Y. Dargaud // J. Thromb. Haemost. – 2012.-V.10.-P.1478-1485.
3. Recombinant factor VIIa for the treatment of congenital factor VII deficiency/ M. Hunault, K.A. Bauer // Semin. Thromb. Hemost. -2000.-V. 26.- P. 401-405.
4. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant factor VIIa/ C.M. Lindley, W.T. Sawyer, B.G. Macik, J. Lusher, Harrison J.F., K. Baird-Cox, K. Birch, S. Glazer, H.R. Roberts// Clin. Pharmacol.-1994.-V.55.- P.638–648.
5. Prophylactic effect of recombinant factor VIIa in factor VII deficient patients/ N.C. Mathijssen, R. Masereeuw, K. Verbeek, J.M. Costa, W.L. Heerde, I.R. Novakova // Br. J. Haematol. -2004.- V.125.-P.494-499.
6. Recombinant human factor VIIa (rFVIIa) cleared principally by antithrombin following intravenous administration in hemophilia patients/ H. Agers, D.F. Brophy, H. Pelzer, E.J. Martin, M. Carr, U. Hedner, M. Ezban // J. Thromb. Haemost. – 2011.- V. 9.-P.333-338.

УДК 615.322

ВИТАМИН В₁₂ В ЛИШАЙНИКОВОМ СЫРЬЕ И В БИОПРЕПАРАТАХ НА ЕГО ОСНОВЕ

Тимофеев С.М., Степанова А.В., Аньшакова В.В.

ФГАОУ ВПО Северо-Восточный федеральный университет

Витамин В₁₂ обладает высокой биологической активностью, это единственный водорастворимый витамин, способный аккумулироваться в организме, он откладывается в печени, почках, легких и селезенке. При этом количество депонированного витамина невелико и не может оказать токсического воздействия, как это случается с жирорастворимыми витаминами. Витамин В₁₂ – это один из важнейших витаминов, необходимых человеку для здоровья. Он нужен прежде всего для того, чтобы иметь здоровую кровь и крепкую нервную систему. Необходим для нормального кроветворения – способствует созреванию эритроцитов. Активирует свертывающую систему крови и снижает концентрацию холестерина в крови. Участвует в белковом обмене, положительно влияет на жировой и углеводный обмен, оказывает благоприятное влияние на функцию печени и нервной системы. Повышает способность тканей к регенерации.

Ни животные, ни растения не способны синтезировать витамин В₁₂. Это единственный витамин, синтезируемый почти исключительно микроорганизмами: бактериями, актиномицетами и сине-зелеными водорослями. Из животных тканей наиболее богаты витамином В₁₂ печень и почки. Этот витамин вырабатывается микроорганизмами в пищеварительном тракте любого животного, включая человека, как продукт деятельности микрофлоры, витамин В₁₂ является витамином животного происхождения.

Известно, что оленина богата витаминами, особенно печень, в которой откладывается витамин В₁₂. Получение витамина В₁₂ с целью использования в медицине является актуальной задачей с привлечением новых сырьевых источников.

Поэтому объектом исследования стала кладония оленья (*Cladonia rangiferina*). Лишайники это удивительные организмы, состоящие из фикобионта и микобионта и образующие единый организм, обладающий иными свойствами, не встречающиеся у других организмов. Лишайники являются продуцентами органических метаболитов, многие из которых обладают ценной биологической активностью. Высокоорганизованные лишайники имеют листоватое слоевище в форме дорзовентральных пластинок а еще выше организованный тип - слоевище кустистое. Кустистые лишайники такие как род Кладония распространены довольно обильно и занимают огромное пространство тундр и лесотундр и служат основным кормом северных оленей.

Кладония оленья является по лекарственному значению очень мощным антибиотиком, который благодаря уснииновой кислоте уничтожает и подавляет рост бактерий. Антимикробная активность в отношении стафилококков, стрептококков, туберкулезной палочки. В оленьем мхе образуется специфическая слизь, которую потом с успехом применяют для лечения кашля, рака желудка, потому что кладония оленья имеет редкое свойство обволакивать. Во многих случаях лишайники, благодаря особенностям своей химической природы, оказывали на больного положительное действие и как стимуляторы, поднимающие тонус организма, и как антибиотики.

Химический состав лишайников очень специфичен, т.к. для лишайников в целом и для каждого из их компонентов (гриба и водоросли) в отдельности характерен особый тип метаболизма. Содержащиеся в лишайниках вещества подразделяют на первичные и

вторичные. К первичным относятся вещества, участвующие в клеточном обмене и в строении тела, к вторичным - клеточные продукты обмена веществ [1]. Причем вторичные лишайниковые метаболиты у *Cladonia stellaris*, *Cladonia rangiferina* в гербарных образцах (сбор 1910, 1938 гг.) характеризуются тем же количественным диапазоном, что и для свежесобранных слоевищ [2].

Витамины продуцируются лишайниками (именно фикобионтами) в небольшом количестве, но общее число известных в настоящее время витаминов довольно велико. К ним относятся аскорбиновая кислота (витамин С), биотин (витамин Н), кобаламин (витамин В₁₂), никотиновая кислота (витамин В₅, или РР), пантотеновая кислота (витамин В₃), рибофлавин (витамин В₂), тиамин (витамин В₁), фолиевая кислота (витамин В₉) [3].

Более исследован в биохимическом аспекте лишайник цетрария исландская, которая включена в Государственную фармакопею. Следует отметить тот факт, что у лишайников кладонии и цетрарии есть много общего как по морфологическим признакам, так и по химическому составу, так как фикобионт у данных лишайников один – зеленая водоросль *Trebouxia* [4].

Исследования по определению витамина В₁₂ определяли спектрофотометрическим методом. В результате эксперимента впервые определили количественное содержание витамина В₁₂: в слоевищах лишайников – 0,811 мкг/мл или 8,11 мкг/г сухого вещества в биопрепарате «Ягель Детокс» составило 3,392 мкг/мл или 33,92 мкг/г сухого вещества.

Доказали, что при механохимической обработке, разрушается корковый слой, сформированный плотным сплетением грибных гиф, между которыми расположены клетки фикобионта, альгальная зона, гонидиальный слой, где и находится основная часть биологически активных веществ (БАВ). Это способствует максимально эффективному выходу БАВ, на примере витамина В₁₂. Биодоступность Витамина после механоактивации увеличивается в 4,18 раза.

Литература

1. Аньшакова В.В. Механохимическая технология получения биоконплексов на основе лишайникового сырья. // Биофармацевтический журнал. – 2011. - Т. 3. № 5. – С. 33-42.
2. Буркин А.А., Толпышева Т.Ю., Кононенко Г.П. Сохранность вторичных метаболитов грибов в гербарных образцах лишайников // Вестник Московского Университета. Серия 16. Биология. 2012. - № 3 – С. 28-32.
3. Определитель лишайников СССР. Вып. 2. / А. Н. Окснер. Морфология, систематика и географическое распространение. 1974. Изд-во «Наука». Ленингр. отд., Л. 284 с.
4. Трасс Х.Х., Сем. *Cladoniaceae*//Определитель лишайников СССР. 1978. Вып.5. С.7-79.

БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 579.264:579.261

СИНТЕЗ ЦИКЛИЧЕСКИХ ЛИПОПЕПТИДОВ БАКТЕРИЯМИ *BACILLUS SUBTILIS* ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ДЕРМАТОМИЦЕТАМИ

Актуганов Г. Э.^{1*}, Мелентьев А. И.¹, Галимзянова Н.Ф.¹, Лукманова К.А.², Кузьмина Л.Ю.¹, Бойко Т.Ф.¹

¹ФГБУН Институт биологии Уфимского научного центра РАН,
450054, Уфа, проспект Октября, 69, тел. (347)235-57-04, e-mail: mlnt@anrb.ru
*gleakt@anrb.ru

²ГОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет Росздрава,
450077, Уфа, ул. Ленина, 3, тел. (347)272-11-60

Разработка новых фунгицидов и поиск соединений, эффективно подавляющих развитие патогенных грибов, является актуальной проблемой в области современной медицины, фармакологии и биотехнологии. Важное место в данной проблематике занимают исследования антигрибных веществ биологического, в т.ч. микробного, происхождения [1]. К настоящему времени имеются некоторые данные о рост-ингибирующей активности бактерий-антагонистов в отношении грибов, вызывающих различные микозы. В частности, описаны штаммы бактерий рода *Bacillus*, проявляющие антагонистическую активность к дрожжеподобным грибам *Candida albicans* [2]. Аэробные эндоспорообразующие бактерии, как потенциальный источник новых антигрибных антибиотиков, могут быть сравнимы со стрептомицетами или незначительно уступают им [3]. Многие штаммы бацилл, в первую очередь представители *B. subtilis*, в качестве основных антигрибных соединений продуцируют циклические липопептиды в виде смеси гомологов [4]. Одновременная продукция сурфактина и итурина А широко распространена как у *B. subtilis*, так и у близкородственных видов *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans* и *B. pumilus* [5-7]. Роль итурина А подтверждена в подавлении развития возбудителя антракноза овощных и плодовых культур *Gloeosporium gloeosporioides* штаммом *B. subtilis* KS03 [8]. Аналогичные результаты получены для штамма *B. amyloliquefaciens* RC-2 в отношении возбудителя антракноза шелковицы *Colletotrichum dematium* [9]. Показана ключевая роль липопептидов семейств итурина и фенгицина в антагонизме *B. subtilis* к возбудителю мучнистой росы тыквенных *Podosphaera fusca* [10]. У штамма *B. subtilis* FR-2 выявлены близкие по структуре к итурину липопептиды бациллопептины А, В и С, участвующие в подавлении фитопатогенного гриба *Fusarium oxysporum* [11].

Роль внеклеточных метаболитов, в т.ч. циклических липопептидов в антагонистической активности бактерий *Bacillus* к дерматомицетам изучена в незначительной степени по сравнению с фитопатогенными грибами. Целью настоящей работы являлось исследование особенностей продукции циклических липопептидов штаммом *B. subtilis* IB-54 в различных моделях его антагонистического взаимодействия с некоторыми представителями дерматомицетов.

Объекты и методы исследований

Основным объектом исследований являлся штамм *B. subtilis* IB-54 из коллекции Института биологии УНЦ РАН, депонированный в ВКПМ под номером В-9795. Тест-объектами служили клинические штаммы дерматомицетов - *Microsporium canis* Bodin, выделенный в Уфимском городском кожно-венерологическом диспансере и любезно предоставленный к.м.н. О.Р. Мухамадеевой, а также *Trichophyton rubrum* (Castell.) Sabour. и

T. gypseum (Robin) Blanchard, предоставленные д.м.н., проф. Ю.А. Медеведевым. Культуры грибов поддерживали пересевами на агаризованной среде Сабуро и КГА. Штамм *B. subtilis* ИБ-54 поддерживали на картофельном агаре (КА).

Продукцию вторичных метаболитов *B. subtilis* ИБ-54 оценивали в совместной статической культуре штамма с дерматомицетами после 7 суток инкубации при 28°C в среде Сабуро. Фракцию циклических липопептидов из совместных культур выделяли методом кислотного осаждения и экстракции 60% (о/о) метанолом [12]. Грубый экстракт дополнительно очищали с помощью препаративной обратнoфазовой хроматографии на гидрофобном сорбенте Silica C-18. Аминокислотный анализ очищенных метаболитов проводили стандартным методом постколоночной дериватизации на анализаторе Т339М. Восходящую тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинах (5×10 см) модифицированного силикагеля Kieselgel 60 F₂₅₄ (“Merck”) в системе растворителей н-бутанол: ледяная уксусная кислота: вода (12:4:6).

Ингибирующую концентрацию бактериальных метаболитов определяли их внесением в картофельно-глюкозный агар (КГА). Стерилизацию метаболитов проводили фильтрацией через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (“Schleicher & Schuell” GmbH). В качестве контроля использовали культуры дерматомицетов, растущие на КГА в отсутствие бактериальных метаболитов. Степень ингибирования оценивали в процентах снижения площади грибных колоний к 4, 6, 8, 10 и 14-м суткам инкубации при 28°C. Повторность опыта 4-кратная. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ ORIGIN 7.0 PRO. Значимость различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Достоверными считали различия между сравниваемыми выборками при уровне достоверной вероятности 95% (p<0,05).

Результаты исследований и их обсуждение

При культивировании штамма *B. subtilis* ИБ-54 на плотных и жидких средах он показывал конститутивную способность к синтезу внеклеточных антигрибных соединений липопептидной природы, которые обнаруживались в культуральной среде уже на логарифмической фазе роста бактерий (6-12 ч). Количественное содержание циклических липопептидов в смешанных культурах *B. subtilis* ИБ-54 с дерматомицетами коррелировало со степенью подавления грибов (рис. 1).

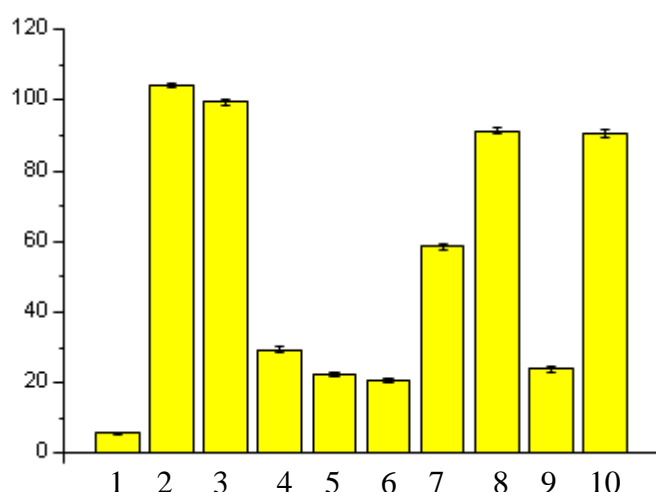


Рис. 1. Степень выхода циклических липопептидов в смешанной культуре дерматомицетов и *B. subtilis* ИБ-54 в жидкой среде Сабуро. 1 – *Microsporum canis*, контроль; 2 – 0 ч *M. canis* + ИБ-54; 3 – 24 ч *M. canis* + ИБ-54; 4 – 48 ч *M. canis* + ИБ-54; 5 – 72 ч *M. canis* + ИБ-54; 6 – *Trichophyton gypseum*, контроль; 7 – 0 ч *T. gypseum* + ИБ-54; 8 – 24 ч *T. gypseum* + ИБ-54; 9 – 48 ч *T. gypseum* + ИБ-54; 10 – *B. subtilis* ИБ-54, контроль.

Сравнительный анализ антимикотической активности экзометаболитов *B. subtilis* ИБ-54 и суммарного выхода липопептидных фракций подтвердил специфические изменения в спектре антигрибных веществ, образуемых на различных этапах антагонистического взаимодействия этого штамма с *M. canis* и *T. gypseum*. При смене *M. canis* на *T. gypseum* уровень продукции бактериями веществ, активных против первого гриба, не возрастал, а

даже снижался, при этом существенно увеличивалась степень подавления как *T. gypseum*, так и *T. rubrum*, тогда как общий выход липопептидной фракции заметно падал (рис. 1). Это указывает на качественные различия в составе индивидуальных антимикотических веществ, образуемых *B. subtilis* ИБ-54 при взаимодействии с различными дерматомицетами. В то же время, при тонкослойной хроматографии (ТСХ) изолированных активных фракций, как контроль *B. subtilis* ИБ-54, так и его совместные культуры с дерматомицетами характеризовались наличием двух сходных пептид-содержащих компонентов со значениями Rf 0,60-0,63 и 0,54-0,56, соответственно (рис. 2). Исключение представляла синхронная культура *B. subtilis* ИБ-54 и *M. canis*, липопептиды которой образовывали при ТСХ непрерывную полосу трудно разделяемых компонентов, что могло указывать на присутствие в ней более широкого спектра активных соединений. Интенсивность окрашивания и относительная площадь разделяемых липопептидов снижались параллельно с уменьшением активности штамма в отношении более зрелых культур гриба, что подтверждалось появлением в них грибного метаболита (рис. 2).

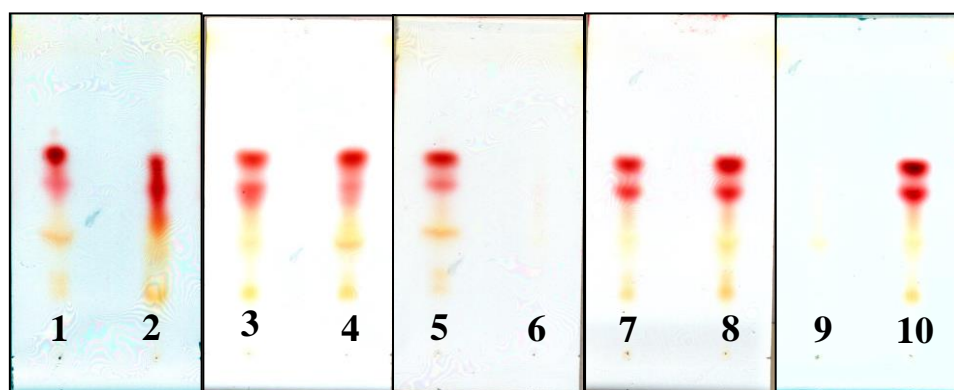


Рис. 2. ТСХ липопептидных фракций из контрольных и бинарных культур *B. subtilis* ИБ-54 и дерматомицетов. 1 – контроль *M. canis*; 2-5 – соответственно 0, 24, 48 и 72 ч *M. canis*+ИБ-54; 6 – контроль *T. gypseum*; 7-9 – соответственно 0, 24 и 48 ч *T. gypseum* +ИБ-54; 10 – контроль *B. subtilis* ИБ-54.

Антимикотические соединения, образуемые в контрольном варианте *B. subtilis* ИБ-54 после их кислотного осаждения из культуральной среды и экстракции 60%-ным (о/о) метанолом были очищены с помощью препаративной обратнофазовой хроматографии на колонке Silica C-18. Результаты аминокислотного анализа очищенной фракции показали преобладание в ней аминокислот в соотношениях, характерных для различных классов циклических липопептидов, т.к. сурфактины и лихенизины (лейцин: глутаминовая кислота: валин: треонин: фенилаланин: аспарагиновая кислота, 2:1,01:0,91:0,61:0,58:0,51). Особенность составляло присутствие значительных количеств треонина и фенилаланина, которые не были ранее выявлены у известных классов циклических липопептидов. Общая масса обнаруженных аминокислот, характерных для структуры известных липопептидов бацилл, составляет 1150,24, что близко среднему значению молекулярной массы смеси различных циклических липопептидов (около 1015). Анализ концентрационных кривых ингибирования дерматомицетов очищенной фракцией липопептидов *B. subtilis* ИБ-54 выявил наиболее высокую чувствительность у *T. gypseum* с дальнейшим ее снижением у *M. canis* и *T. rubrum* (рис. 3).

Минимальная ингибирующая концентрация бактериальных метаболитов находилась в интервалах 2,5-5, 5-10 и 22-25 мкг/мл для *T. gypseum*, *M. canis* и *T. rubrum*, соответственно. Существенно различались и показатели эффективной концентрации 50%-ного ингибирования (ЭД₅₀), составляя 10-12, 50-55 и 220-240 мкг/мл для тех же грибов. Достаточно высокие значения ЭД₅₀ могли быть обусловлены гетерогенностью суммарной фракции, содержание в которой пептидных соединений составляло менее 20% (с.в.). Учитывая, что молярное соотношение пептидного и липидного компонентов у циклических липопептидов, как правило, колеблется в интервале 4:1 – 5:1, можно предполагать, по меньшей мере, 5-кратное

снижение реальных действующих концентраций для активных соединений исследуемого штамма в отношении дерматомицетов.

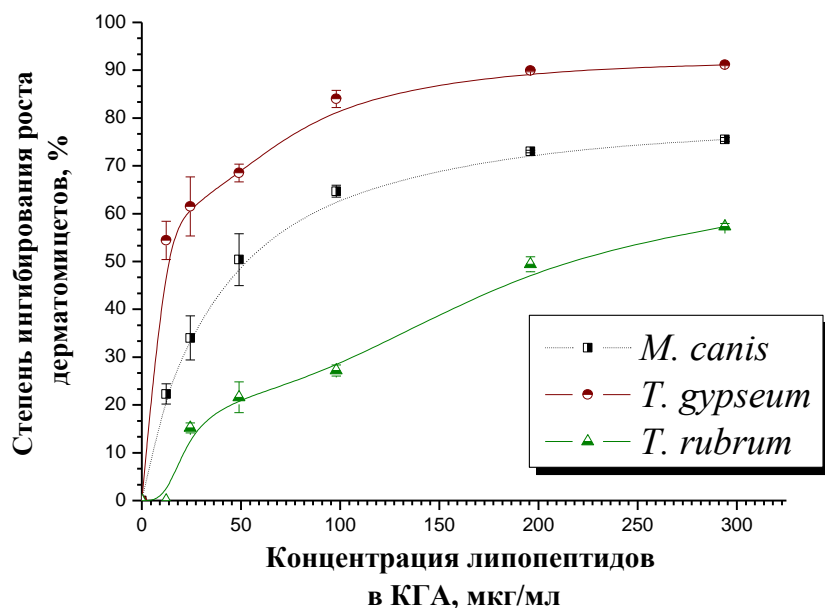


Рис. 3. Степень подавления дерматомицетов при различных концентрациях (в/о, с/в) очищенной липопептидной фракции *B. subtilis* ИБ-54 в картофельно-глюкозном агаре.

Таким образом, продукция циклических липопептидов играет ключевую роль в подавлении дерматомицетов штаммом *B. subtilis* ИБ-54. При этом специфический характер взаимодействия бактерий с различными видами дерматомицетов заключается в изменении уровня и спектра синтезируемых липопептидов.

Литература

1. Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. - М.: БИНОМ-Пресс.- 2003.- 440 с.
2. Орлова М. В., Смирнова Т. А., Азизбекян Р. Р. Штаммы *Bacillus*, обладающие антагонистической активностью в отношении дрожжеподобных грибов *Candida albicans* // Успехи медицинской микологии.- 2003.- Т. 1.- С. 104-105.
3. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions // Mol. Microbiol.- 2005.- V. 56.- P. 845-857.
4. Roongsawang N., Thaniyavarn J., Thaniyavarn S., Kameyama T., Haruki M., Imanaka T., Morikawa M., Kanaya S. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BVK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin // Extremophiles.- 2002.- V. 6.- P. 499-506.
5. Kalinovskaya N., Kuznetsova T.A., Ivanova E.P., Romanenko L.A., Voinov V.G., Huth F., and Laatsch H. Characterization of surfactin-like cyclic depsipeptides synthesized by *Bacillus pumilus* Ascidian *Halocynthia aurantium* // Mar Biotechnol (NY).- 2002.- V.4.- P. 179-189.
6. Hsieh F.C., Li M.C., Lin T.C., and Kao S.S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR // Curr. Microbiol.- 2004.- V. 49.- P. 186-191.
7. Koumoutsis A., Chen X.H., Henne A., Liesegang H., Hitzeroth G., Franke P. et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42 // J. Bacteriol.- 2004.- V. 186.- P. 1084-1096.

8. Cho S. J., Lim W. J., Hong S. Y. et al. Endophytic colonization of Ballon flower by antifungal strain *Bacillus* sp. CY22 // Biosci. Biotechnol. Biochim.– 2003.– V. 67, № 10.- P. 2132-2138.
9. Hiradate S., Yoshida S., Sugie H., Yada H., Fujii Y. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 // Phytochemistry.– 2002.– V. 61.- P. 693–698.
10. Romero D., de Vicente A., Rakatoaly R.H., Dufour S.E., Veening J.-W., Arrebola E., Cazorla F.M., Kuipers O.P., Paguot M and Perez-Garcia A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca* // Mol. Plant. Microbe Intrract.– 2007.- V. 20.- P. 430-440.
11. Kajimura Y., Sugiyama M. and Kaneda M. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2 // The J. Antibiot.– 1995.- V. 48.– P. 1095-1103.
12. Шульга А.Н., Елисеев С.А., Карпенко Е.В., Кирчив А.Р., Туровский А.А. Биоэмульгатор, образуемый культурой *Bacillus* species, и его свойства // Микробиол. журн.– 1990.– Т. 52, №5.– С. 78-82.

УДК 577.11

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРУТОВЫХ ГРИБОВ В ФАРМАКОЛОГИИ

Бережнева З.А., Шпирная И.А.

Башкирский государственный университет

Трутовые грибы, или трутовики, весьма разнообразная группа грибов – представителей класса *Basidiomycetes* порядка *Aphyllorphorales*, широко известные как разрушители древесины. Распространение трутовых грибов в природе определяется, прежде всего, наличием определенного субстрата. Лишь немногие трутовые грибы развиваются на почве, подавляющее большинство приурочено к обитанию на древесине. На территории европейской части нашей страны насчитывается несколько сотен различных видов и подвидов трутовых грибов [1].

Ксилотрофы (дереворазрушающие грибы или трутовики) — грибы, осуществляющие разложение древесины [2]. Эти грибы образуют крупные плодовые тела (карпофоры), спорообразующий слой которых называют гименофором [3]. Отличительной особенностью плодовых тел трутовых грибов является их способность к одревеснению [1]. Выделяют ксилопаразитов (например, *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., *Phellinus igniarius* (L.) Fr.), развивающихся на живой древесине и кустарниках, и ксилосапротрофов (например, *Fomes fomentarius* (L.) Fr.), развивающихся на мертвой древесине [4]. В зависимости от состава ферментативного комплекса трутовые грибы способны вызывать бурую деструктивную или белую коррозийную гниль древесины [1]. Деструктивную гниль вызывают заборный (*Gloeophyllum sepiarium* (Wulfen) P. Karst.), рядовой (*Corirolellus serialis* (Fr.) Murr.), пахучий трутовики (*Osmoporus odoratus* (Fr.) Sing.) и др. [5]. Белую коррозийную гниль вызывает широко распространенный в лесах Южного Урала плоский трутовик (*Ganoderma applanatum* (Pers. ex Wallr.) Pat.), а также многие грибы родов иноотус (*Inonotus*) и феллинус (*Phellinus*) [6].

Экологическая роль трутовых грибов заключается в том, что они являются

редуцентами, способствующими разложению древесины [7]. Трутовики выполняют роль санитаров леса, в первую очередь, поражая возрастные деревья и высвобождая ресурсы для молодой поросли и травянистой растительности [8].

В результате своего жизненного цикла трутовые грибы выделяют разнообразные ферменты, разлагающие древесину, продуктами разложения которой они питаются [1]. Гидролитические ферменты трутовиков характеризуются высокой активностью и стабильностью, что дает возможность использовать плодовые тела трутовых грибов для практических целей. По специфичности действия ферменты трутовых грибов ничем не уступают, а иногда даже превосходят, ферменты, полученные из бактериального, растительного и животного сырья [9].

Ферменты, получаемые из плодовых тел трутовых грибов активно используются в пищевой (приготовление вин, пива, соков), текстильной (мацерация растительного материала, выделка кож) промышленности, в животноводстве (комплексные препараты), фармакологии, медицине, плодовые тела употребляются в пищу [10].

Исследованием фармакологических свойств базидиомицетов и их практическим применением в медицине активно занимаются ученые разных стран на протяжении многих лет [8, 11]. Трутовые грибы способны синтезировать широкий спектр ценных биологически активных веществ – ферменты [8, 31, 32], антибиотики [12, 15], онкостатики [13], пигменты [14], стеролы [8], глюканы [16] и др. В связи с чем, ведутся перспективные исследования в рамках этой группы грибов [17, 18, 19, 20, 21].

Еще во времена Гиппократы трутовики использовали как материал для кровоостанавливающих повязок. Европейские хирурги и дантисты использовали их в этом качестве вплоть до XIX столетия. В европейской народной медицине трутовые грибы использовали как кровоостанавливающее средство при болезненных менструациях и геморрое. В Индии отвар трутовика применяли как мочегонное, слабительное и тонизирующее нервную систему средство. В Китае отваром трутовика лечили рак пищевода, желудка и матки. Также в Китае трутовик настоящий (*Fomes fomentarius* (L.) Fr.) в сочетании с трутовиком плоским (*Ganoderma applanatum* (Pers. ex Wallr.) Pat.) и трутовиком окаймленным (*Fomitopsis pinicola* (Fr.) Karst.) входит в состав сборов для лечения нервных заболеваний и нормализации состава крови. В Японии и Корее его экстракт в сочетании с лекарственными растениями применяют в составе функциональных напитков для профилактики раковых заболеваний и диабета [22].

Плодовые тела листовичной губки (*Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing.) обладают лекарственными свойствами, о которых было известно еще в древней Греции и Риме – отвар ткани гриба употреблялся как слабительное. В настоящее время из гриба получают препараты, используемые в качестве слабительного и кровоостанавливающего средств, также они используются при лечении туберкулезных больных [23].

Лечебными свойствами обладает *Inonotus obliquus* (Pers.) Pil. F. sterilis (Van.) Nikol. (стерильная форма трутовика березового, более известна как чага), растущий на березе. Из него получают препарат бифунгин, который применяют для лечения хронических гастритов и язвы желудка, а также в качестве симптоматического средства для больных с различными злокачественными опухолями, особенно при раке желудка и легких [23].

Трутовик разноцветный (*Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quel.) и трутовик березовый (*Lenzites betulinus* (L.: Fr.)) активно продуцируют пиранозооксидазу – этот фермент предложено использовать в производстве пиранозанов из пираноз для получения антибиотиков [11].

Серно – желтый трутовик (*Laetiporus sulphureus* (BULL. FR) Bond. et Sing.) содержит белок с высокой биологической ценностью, большое количество каротиноидов, ненасыщенных жирных кислот, а также обладает антивирусным и антимикробным действием [24].

Трутовик лакированный (*Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst.) – широко известный лекарственный базидиальный гриб. Его используют в традиционной медицине Юго-Восточной Азии более двух тысяч лет в качестве эффективного тоника, препарата, увеличивающего продолжительность жизни и улучшающего ее качество, противоопухолевого средства, при лечении бронхитов. Интенсивные исследования свойств плодовых тел и мицелия этого гриба позволили обнаружить у него иммуномодулирующие, противоопухолевые, гепатопротекторные, генопротекторные, противовирусные, антиоксидантные, гипогликемические и гиполипидемические свойства, способность регулировать деятельность сердечно-сосудистой, дыхательной и нервной систем. Из него выделены активные метаболиты, относящиеся к различным классам соединений: полисахариды, тритерпены, белки, жирные кислоты, нуклеозиды и др. Полисахариды *Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst. способны оказывать выраженное противоопухолевое действие [25]. Сравнение водного и этанольного экстрактов трутовика лакированного показало, что оба экстракта индуцируют апоптоз в MCF-7 – линии раковых клеток [26], также оказывает антимагистатический эффект, действуя синергидно с интерфероном в антивирусном действии, направленном против вируса гепатита В [27].

Для трутовика березового (*Piptoporus betulinus* (Fr.) Karst.) выявлено наличие антибактериальной, противовоспалительной, антигиалуронатлиазной и антиметаллопротеиназной активности [28].

Трутовик плоский (*Ganoderma applanatum* (Pers. ex Wallr.) Pat.) обладает иммуностимулирующим действием. Трутовик чешуйчатый (*Polyporus squamosus* (Huds.) Fr.) обладает антифунгальными и антибактериальными свойствами [29].

В настоящее время большую часть медицинских препаратов получают с помощью низших грибов (*Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Fusarium sp.* и др.), однако, как показывают литературные источники, высшие базидиальные грибы, в частности трутовики, являются достаточно перспективными объектами в данном направлении.

В таблице приведены некоторые медицинские препараты, на основе трутовых грибов.

Таблица.

Препараты, созданные на основе трутовых грибов

Препарат (страна производитель)	Источник получения	Назначение	Ссылки на литературу
Микотон (Украина)	Комплекс биополимеров трутовика настоящего <i>Fomes fomentarius</i> (L.)Fr. содержит 70% хитина, 20% β-глюканов и 10% меланинов	Детоксикационные, генопротекторные, иммуномодулирующие, антиоксидантные, антихолестеринемические и антиинфекционные свойства	[30]
Крестин (Япония, фирма Sankyo))	Полисахариды гриба кориола разноцветного <i>Coriolus versicolor</i> (L.:Fr.) Quel.	Эффективный и малотоксичный онкостатик при поддерживающей терапии раковых заболеваний, снижающий также гематологическую супрессию, вызываемую другими противоопухолевыми лекарствами	[13]

Витакор (Россия)	Комплекс полисахаридов <i>Coriolus versicolor</i> (L.:Fr.) Quel.	Онкостатическое, гепатопротекторное и иммуномодулирующее действия	[26]
Трамелан (Россия, фирма Микротэп)	Монокультура <i>Trametes pubescens</i> (Schumach.) Pilat.	Поддержание функции печени, желчевыводящих путей и желчного пузыря, восстановление до нормы клеточные и гуморальные факторы иммунной защиты, эффективен при синдроме хронической усталости, способен уменьшать узлы щитовидной железы, обладает антидепрессивными свойствами	[26]
Грифолан (Япония)	Монокультура <i>Grifola frondosa</i> (Dicks: Fr.)S.F.Gray	Обладает иммуномодулирующим, онкостатическим, антибактериальным, антивирусным, противовоспалительным и гепатопротекторным действием	[13]
Грифон (Япония)	Монокультура <i>Grifola frondosa</i> (Dicks: Fr.)S.F.Gray	Обладает иммуномодулирующим, онкостатическим, антибактериальным, антивирусным, противовоспалительным и гепатопротекторным действием	[13]
Бефунгин (Россия)	Наросты березового гриба чага, образуемых <i>Inonotus obliquus</i>	Оказывает противоопухолевое действие. Нормализующее функции органов ЖКТ, анальгезирующее, общетонизирующее действие. Регулирует метаболические процессы.	[23]

Также, интересно, что некоторые представители трутовых грибов употребляются человеком в пищу, например трутовик серно-желтый (*Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill), печеночница обыкновенная (*Fistulina hepatica* (Schaeff.) Fr.), трутовик зонтичный (*Polyporus umbellatus* (Pers.) P. Karst.), трутовик чешуйчатый (*Polyporus squamosus* (Fr.) Bondartsev) съедобны в молодом виде после длительного отваривания. В пищу и в лечебных целях используются плодовые тела грибов, собираемые весной и в первой половине лета.

Таким образом, трутовые грибы являются ценным источником различных биологически активных веществ, которые перспективны для исследований в фармакологии и медицине.

Литература

1. Мир растений. В 7 т./ Редкол. А.Л. Тахтаджян (гл. ред.) и др. Т. 2. Грибы/ Под ред. М.В. Горленко. – 2-е изд., перераб. – М.: Просвещение, 1991. – 475 с., 24 л.: ил.
2. Сурков В.А., Павлова М.Е. Экологические группы грибов // Ботаника, №29, 2000
3. Глик Б. Молекулярная биотехнология Принципы и применение: пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
4. Кутафьева Н.П. Морфология грибов: учеб. пособие для студ. вузов, общ. по спец. Биология: доп. М-вом образов. Р.Ф. / Н.П. Кутафьева. – 2-е изд. исп. и доп. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003. – 215 с.
5. Семенкова И.Г. Лесная фитопатология: учеб. пособие. – 3-е изд., испр. и доп. – М.: ГОУ ВПРО МГУЛ, 2009. 225 с.
6. Семенкова И.Г. Фитопатология. Дереворазрушающие грибы, гнили и патологические окраски древесины (определятельные таблицы): учеб. пособие / И.Г. Семенкова. – М.: ГОУВПОМГУЛ, 2008. – 72 с.
7. Миркин Б. М., Наумова Л. Г. Краткий курс общей экологии. Часть I: Экология видов и популяций: Учебник. – Уфа: Изд-во БГПУ, 2011. – 206 с.
8. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. – 230 с.
9. Гаврилова В.П., Королева О.В. Перспективы промышленного получения специфических белков и биологических катализаторов из базидиомицетов//1 съезд микологов России. Тезисы докладов. 2002. С. 293-294
10. Яценко Т.А., Бойко С.М. Динамика изменения пектолитической активности культурального фильтрата базидиальных грибов *Auricularia auricular* (HOOK.) UNDERW. и *Tremella mesenterica* (RETZ.) FR.// Грибные биотехнологии, №1. М.: 2010, С. 276 – 277
11. Ферментные системы высших базидиомицетов/ Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Дудченко Л.Г., Тругнева И.А.; Отв. ред. Судьбина Е.Г., Дудка И.А.; АН УССР. Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного. – Киев: Наук. думка, 1989. – 280 с.
12. Тихонова О.В., Платунов А.В., Толстихина Т.Н., Ибрагимова С.И., Толстых И.В., Ефременкова О.В. Способ получения биологически активных веществ путём биосинтеза на питательных средах, основанных на отходе спиртового производства барде// Грибные биотехнологии в медицине и промышленности. 2010, № 1, С. 269-270
13. Горшина Е.С., Скворцова М.М., Бирюков В.В. Биотехнологический способ производства лекарственного гриба Кориола опушенного//1 съезд микологов России. Тезисы докладов. 2002. С. 253
14. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С., Дулькин Л.М., Гончаров Н.Г. Ликопин грибов: биотехнология получения и перспективы использования в медицине// Микробиология. 2006, т. 75, № 6, С. 725 – 730
15. Капич А. Н., Гвоздкова Т. С., Квачева З. Б., Николаева С. Н., Шишкина Л. Н., Галкин С., Хатакка А., Конопля Е. Ф., Верещако Г. Г., Ходосовская А. М., Рутковская Ж. А. Антиоксидантные, радиозащитные и противовирусные свойства экстрактов мицелия гриба *Laetiporus sulphureus* // Успехи медицинской микологии. 2004. 3: 146—148.
16. Сербин А.Г. и др. Медицинская ботаника = Botanique medicale = Medical botany: Учебник для студентов вузов/ А.Г. Сербин, Л.М. Серая, Н.М. Ткаченко, Т.А. Слободанюк; Под общ. ред. Л.М. Серой. – Х.: Изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2003. – 364 с.
17. Бабицкая В.Г., Иконникова Н.В., Пучкова Т.А., Осадчая О.В., Филимонова Т.В. Биохимический состав композиций функционально-корректирующих препаратов на основе липид- и полисахаридсинтезирующих грибов// Грибные биотехнологии, №1. М.: 2010, С. 237 – 238
18. Гзогян Л.А., Проскуряков М.Т. Протеолитические ферменты в экстрактах грибов//Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии.–2004.–вып.1. с. 67 – 77.

19. Гарибова Л.В. Основы микологии: Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов: учеб. пособие / Л.В. Гарибова, С.Н. Лекомцева. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 224 с.
20. Бойко М.И., Кузнецова И.А., Белун А.В. Определение оптимальных значений рН и температуры для культивирования *Irpex lacteus* FR А-ДОН-02-продуцента протеиназ молокосвертывающего действия// Современная микология в России: Материалы 2 съезда микологов России, 16-18 апреля 2008 г. / Национальная Академия Микологии; редкол.: Ю.Т. Дьяков [и др.], т. 2. – М.: Национальная академия микологии. 2008. С. 121-122
21. Дьяков Ю. Т., Шнырева А. В., Сергеев А. Ю. Введение в генетику грибов. — М.: изд. центр «Академия», 2005
22. Автономова А.В., Евсенко М.С., Усов А.И., Исакова Е.Б., Бухман В.М., Леонтьева М.И., Седакова Л.А., Трещалина Е.М., Краснопольская Л.М. Противоопухолевые свойства трутовика лакированного *Ganoderma lucidum*// Грибные биотехнологии в медицине и промышленности. 2010. № 1. С. 236 – 237
23. Белова Н.В. Базидиомицеты источники биологически активных веществ / Н.В. Белова // Раст. ресурсы. 1991. – Вып. 2. – С. 8 – 18.
24. Иванова И.Е. Изучение продуктивности и биологической активности нового штамма гриба LS 1106 *Laetiporus sulphureus* (BULL. FR) BOND. ET. SING// Грибные биотехнологии, №1. М.: 2010, С. 251
25. Автономова А.В., Краснопольская Л.М. Противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства трутовика лакированного (*Ganoderma lucidum*)// Микология и фитопатология. 2013. Т. 47. № 1. С. 3-11
26. Корсун В.Ф., Краснопольская Л.М., Корсун Е.В., Авхукова М.А. Противоопухолевые свойства грибов. – М., 2012. – 210 с.
27. Щегловитова О.Н., Бабаянц А.А., Склянкина Н.Н., Болдырева Н.А., Леонтьева М.И., Автономова А.В., Краснопольская Л.М. Полисахариды из погружного мицелия *Ganoderma lucidum* и *Flammulina velutipes* индуцируют интерферон в культуре лейкоцитов крови человека, но различаются по типу продуцируемого интерферона// Грибные биотехнологии в медицине и промышленности. 2010, № 1, С. 276
28. Оленников Д.Н., Агафонова С.В., Рохин А.В., Пензина Т.А., Боровский Г.Б. Разветвленный глюкан плодовых тел *Peplporus betulinus* (Bull.:Fr) Karst.//Прикладная биохимия и микробиология. №1. 2012. С. 74-79
29. Бабаянц О. В., Залогина-Кыркелан М.А., Никифорова Е.А. Культивируемые грибы – ресурсы и перспективы в Украине//Современная микология в России. Том 2. Материалы 2-го Съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2008. – С. 39-40.
- Сенюк О.Ф. Использование грибного препарата микотон в лечении пациентов / О.Ф. Сенюк, Н.Ф. Курочко, Л.Ф. Горовой // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. – 2010.– №1. – С. 266-267.
30. Baldrian P., Valaskova V. // FEMS Microbiol. Ref. 2008. V. 32. P. 501-521.
31. Kumar R., Singh S., Singh O. V.//J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. P. 377-391.
32. Aronson J.M. The Cell Wall//The Fungi/Ed. By C.C. Ainsworth and A.S. Sussman, New York – London. Vol.1.P.49.

УДК 577.151

ПЛОДОВЫЕ ТЕЛА ТРУТОВЫХ ГРИБОВ – ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ АМИЛАЗ

Бережнева З.А., Бережнев В.Е., Цветков В.О., Шпирная И.А., Ибрагимов Р.И.

Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

В лесах Южного Урала встречаются около 100 видов ксилотрофных грибов, представители которых относятся к отделу *Basidiomycota*. Среди данных видов распространенной группой являются трутовые грибы, относящиеся к представителям дереворазрушающих грибов класса *Basidiomycetes* (порядок *Aphylllophorales*).

Трутовые грибы своими ферментными системами разрушают субстрат, на котором они обитают. Биодеструкция естественных субстратов – это полиэнзимный процесс, в котором основную роль играют внеклеточные целлюлазы, протеиназы, пектиназы, часть которых находит практическое применение в медицине, фармакологии и пищевой промышленности [1].

В настоящее время основную часть ферментных препаратов получают с помощью низших грибов (*Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Fusarium sp.* и др.), однако, как показывают литературные источники, высшие базидиальные грибы, в том числе и трутовики, являются достаточно перспективными объектами в данном направлении. Гидролитические ферменты базидиомицетов характеризуются высокой активностью и стабильностью, специфичностью действия, и не уступают ферментам, полученным из растительного и животного сырья. Все это дает возможность использовать плодовые тела трутовых грибов в качестве источника для получения ряда ферментов [2]. В настоящее время главным источником амилаз являются микроорганизмы, особенно бактерии, грибы, реже дрожжи. Существуют данные, свидетельствующие о конститутивном характере биосинтеза амилаз у дереворазрушающих грибов [5].

Целью настоящей работы являлось изучение амилолитической активности плодовых тел трутовых грибов: серно-желтого (*Laetiporus sulphureus*), березового (*Piptoporus betulinus* (березовая губка), лиственничного (*Fomitopsis officinalis*), разноцветного (*Trametes versicolor*), окаймленного (*Fomitopsis pinicola*), настоящего (*Fomes fomentarius*).

Объектом исследования служили плодовые тела, собранные осенью 2012 года в Уфимском районе и замороженные после сбора.

Для получения экстракта с ферментативной активностью навеску плодового тела гомогенизировали в фарфоровой ступке с добавлением измельченного стекла. Заливали ацетатным буфером (рН 4,6) в соотношении 4:1. Выдерживали 1,5 часа при 4°C, центрифугировали при 10000 об/мин на центрифуге MPW-310 (Польша) в течение 10 мин. В супернатанте определяли активность амилолитических ферментов по гидролизу крахмала в агарозном геле [7].

Исследования показали, что все изученные образцы характеризуются довольно высокой активностью амилаз, наибольшие показатели выявлены для трутовика серно-желтого и настоящего – 127,67 и 220,35 Е/г сырой массы соответственно (табл.1).

Также представляло интерес получение препаратов амилаз из плодовых тел.

Для этого использовали метод аффинной хроматографии, был синтезирован сорбент для выделения амилолитических ферментов из экстракта плодового тела трутовика серно-желтого. В качестве носителя для сорбента использовали полиакриамидный гель (ПААГ) в концентрации 30%, высокой степени сшивки. В качестве лиганда амилолитических ферментов использовали крахмал [6].

Синтезированный таким образом сорбент вносили в колонку (объем 20 мл) и уравнивали ацетатным буфером. На колонку наносили экстракт в количестве 5 мл.

Таблица 1. Амилолитическая активность плодовых тел трутовых грибов.

Образец	Активность, Е/г сырой массы
Т. серно-желтый	127,67±1,31
Т. березовый	82,52±0,65
Т. лиственничный	41,28±1,13
Т. разноцветный	74,66±1,13
Т. окаймленный	44,18±0,65
Т. настоящий	220,35±1,13

Выделение ферментов производили на жидкостном хроматографе низкого давления BioLogic LP (Biorad, США). По истечении времени выдержки экстракта (10 мин) элюировали сорбированные белки. Элюцию ферментов производили раствором NaOH, pH 9,0-9,5, со скоростью 2 мл/мин. Сбор фракций осуществляли, контролируя выход белка с помощью проточного УФ-детектора при 280 нм (рис.1). В полученных фракциях определяли активность амилаз (табл. 2).

Таблица 2. Амилолитическая активность фракций.

№ фракции	Е/мл раствора	Е/г сырой массы
1	1,19±0,02	7,13±0,02
2	0,98±0,03	5,89±0,01
3	1,19±0,02	7,13±0,02
4	1,19±0,02	7,13±0,02
5	1,19±0,02	7,13±0,02
6	1,41±0,01	8,48±0,03
7	1,19±0,02	7,13±0,02

Все фракции, содержащие белок, общий объем которых составил 60 мл, обладали ферментативной активностью, что говорит о значительной емкости синтезированного сорбента. Наибольшая активность амилолитических ферментов выявлена в 6 и 7 фракциях- 8,48 и 7,13 Е/г сырой массы соответственно.

Таким образом, все исследованные образцы трутовых грибов характеризуются высоким уровнем активности амилолитических ферментов, выделение которых можно успешно осуществлять с помощью аффинного сорбента.

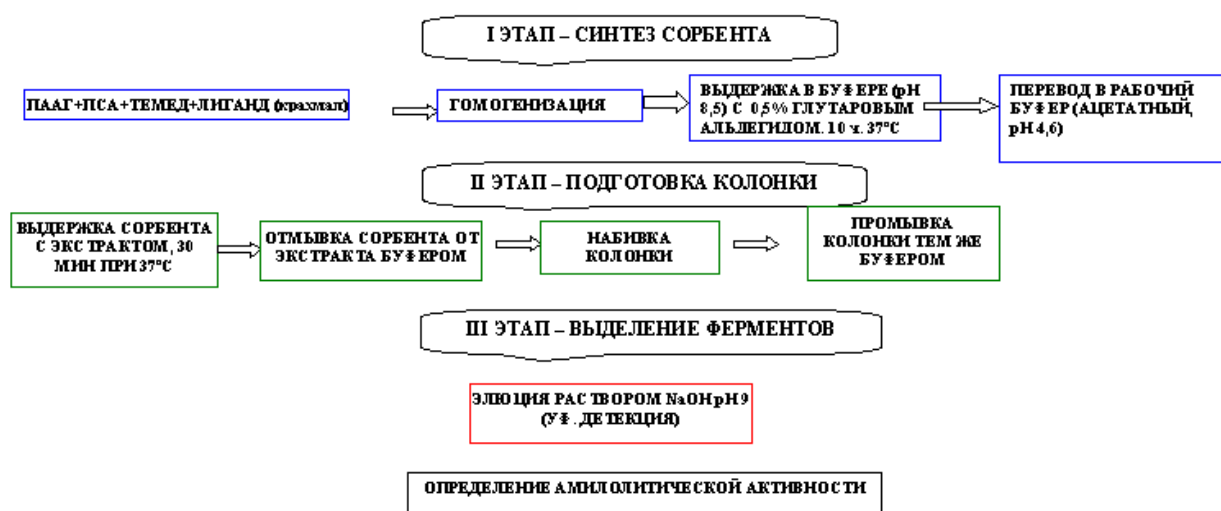


Рис. 1. Аффинное выделение экстрактивных амилаз плодового тела трутовика серно-желтого.

Литература

1. Бойко С.М., Филиппова Ю.О., Древаль К.Г. Возможность использования базидиальных грибов для биотехнологического получения препаратов мацерующего действия // 2 съезд микологов России. Тезисы докладов. 2008. С. 325-326
2. Гаврилова В.П., Королева О.В. Перспективы промышленного получения специфических белков и биологических катализаторов из базидиомицетов//1 съезд микологов России. Тезисы докладов. 2002. С. 293-294
3. Горшина Е.С., Скворцова М.М., Бирюков В.В. Биотехнологический способ производства лекарственного гриба Кориола опушенного // 1 съезд микологов России. Тезисы докладов. 2002. С. 253.
4. Тихонова О.В., Ефременкова О.В., Катруха Г.С. Оценка базидиальных грибов в качестве продуцентов антибиотиков // 2 съезд микологов России. Тезисы докладов. 2008. С. 520
5. Ферментные системы высших базидиальных грибов/Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Дудченко Л.Г., Трутнева И.А.; отв. ред. Судьина Е.Г., Дудка И.А. – Киев: Наук.думка, 1989-280с.
6. Цветков В.О., Шевченко Н.Д., Ибрагимов Р.И., Гарипова М.И. Выделение протеиназ колорадского жука с использованием аффинного сорбента на основе полиакриламида. // Материалы 14-й международной пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», г. Пушкино, 19 – 23 апреля 2010 г., с. 66-67.
7. Шпирная И.А., Умаров И.А., Шевченков Н.Д., Ибрагимов Р.И. Определение активности гидролаз и их ингибиторов с использованием субстратов, иммобилизованных в геле агарозы // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45. № 4. С. 497-501.

УДК 579.66

ПРИМЕНЕНИЕ БИОСУРФАКТАНТОВ В НЕФТЯНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Гильманшина К. А.

Уфимский государственный нефтяной технический университет,
karina777mk@mail.ru

В настоящее время заметно устойчивое повышение интереса к поверхностно-активным веществам биогенного происхождения (биоПАВ, биосурфактантам) как экологически безопасным и экономически эффективным поверхностно-активным агентам многоцелевого назначения с эмульгирующей, солюбилизующей, антиадгезивной, детергентной активностью. Это обусловлено требованиями экологической безопасности, которые предусматривают постепенное выведение из промышленных производств высокотоксичных химических препаратов, в частности, сурфактантов - как правило, продуктов нефтеорганического синтеза [1].

Биосурфактанты снижают натяжение поверхности и границы раздела фаз как в водных растворах, так и смесях углеводородов. Они имеют ряд преимуществ перед химическими сурфактантами, включая низкую токсичность, высокую биodeградельность, лучшую совместимость с окружающей средой, высокое пенообразование, селективность и специфическую активность к повышенным температурам, рН и солям, а также способность синтеза из возобновляемых материалов. Поэтому одним из потенциальных потребителей биосурфактантов является нефтяная промышленность, которая может использовать препараты с минимальной очисткой, включая суспензию целых клеток. По сравнению с химическими сурфактантами они требуются в меньших количествах, очень селективны, эффективны в широком диапазоне нефти и условий резервуара и экологически не опасны [2].

Биогенные ПАВ являются эффективными агентами нефтевытеснения. Благодаря своим физико-химическим свойствам, способности проявлять их в присутствии высоких концентраций солей и не адсорбироваться на известняках и песчаниках, биоэмульгаторы в смеси с другими (например, неионогенными) ПАВ могут быть эффективным средством повышения нефтедобычи. Введение микроорганизмов-продуцентов ПАВ в нефтяное месторождение с последующим размножением их и образованием биоПАВ непосредственно в пластах существенно влияет на вытеснение нефти.

Дополнительное вытеснение нефти в биотехнологиях обусловлено теми же механизмами, которые составляют основу физико-химических методов. Однако микробные метаболиты образуются преимущественно непосредственно при контакте с нефтью в пористой среде, что существенно увеличивает эффективность их воздействия.

При использовании большей части микробиологических технологий, закачиваемые питательные вещества проникают в промытые водой каналы и зоны и создают там благоприятные условия для метаболизма бактерий. В результате их жизнедеятельности закупориваются высокопроницаемые зоны и происходит перераспределение закачиваемого агента в непромытые малопроницаемые зоны. Лабораторными и промышленными экспериментами доказано, что продукты микробного синтеза изменяют межфазные натяжения между нефтью и водой, вызывают рост фильтрационных сопротивлений для водных растворов в высокопроницаемых зонах пласта, улучшают эффективность смачивания пород вытесняющей водой [3].

Практическое применение биотехнологии позволяет повысить нефтеотдачу на 40%, увеличить вовлекаемые в разработку запасы на 5-7%, повысить продуктивность скважин в

1,5-2 раза, а текущую добычу нефти – на 15-25%. На фоне постоянного роста цен на энергоносители биотехнологические методы окупаются в течение 1,5-2 лет [4].

Показано, что приблизительно на 30% увеличивается нефтеотдача из подземных песчаников при использовании трегалолипидов, синтезируемых *Nocardia rhodochrous*. Фирма «Multy-biotech», субсидируемая «Geodyne Technology», освоила промышленное производство биосурфактантов для повышения нефтеотдачи. Показано, что обработка сырой тяжелой нефти Венесуэлы биосурфактантом эмульсаном снижает её вязкость с 200 000 до 100 сП. Это позволяет перекачивать тяжелую нефть насосами по промышленному трубопроводу до 26 000 миль, что невозможно сделать это при обработке её химическими сурфактантами. В Кувейте показана возможность использования биосурфактанта для перекачки сырой нефти в нефтехранилища. Компанией «Petrogen Inc.» (США) достигнуто 90% удаление нефти, включенной в осадок сточных вод, за счёт использования образующих биосурфактант микроорганизмов. Важным направлением использования микроорганизмов, образующих биосурфактанты, являются технологии биоремедиации почв, загрязненных углеводородами. Так, рамнолипид, продуцируемый *Pseudomonas aeruginosa*, удалил значительные количества разлитой нефти из галечного песка Аляски, загрязненного фирмой «Еххон Valdez». Показано также, что этот биосурфактант способен удалять до 25-70% и 40-80% углеводородов из загрязненной супеси и суглинков соответственно [2].

Биосурфактанты синтезируются бактериями, дрожжами и некоторыми мицелиальными грибами [3]. Продукты микробного синтеза наиболее перспективны в плане биотехнологического применения, поскольку для культивирования продуцентов используются относительно простые по составу минеральные среды и доступные источники углерода. При этом возможность управления ферментационным процессом биосинтеза позволяет увеличивать выход продукта без значительных материальных и энергетических затрат [5].

Литература

1. Куюкина М.С. Биосурфактанты актинобактерий рода *Rhodococcus*: индуцированный биосинтез, свойства, применение / М.С. Куюкина // Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / ИЭГМ УрО РАН – Пермь, 2006. – 295 с.
2. Гоготов И.Н. Биосурфактанты: продуценты, свойства и практическое использование / И.Н.Гоготов, С.В. Белоножкин, Р.С. Ходаков, А.Н. Шкидченко // Международное сотрудничество в биотехнологии: ожидания и реальность: мат. 3-й Межд. конф. из серии «Наука и бизнес» / ПушГУ – Пушкино, 2006. – С. 73-75.
3. Самсонова А.С. Микробиологические методы повышения вторичной добычи нефти / А.С. Самсонова, А.В. Макаревич // Нефтехимический комплекс. – 2009. – № 1. – С. 56-64.
4. Ибатуллин Р.Р. Увеличение нефтеотдачи на поздней стадии разработки месторождений. Теория. Методика. Практика / Р.Р. Ибатуллин, Н.Г. Ибрагимов, Ш.Ф. Тахаутдинов, Р.С. Хисамов – М.: Недра, 2004. – 292 с.
5. Елисеев С.А. Поверхностно-активные вещества и биотехнология / С.А. Елисеев, Р.В. Кучер. – Киев: Наукова думка, 2001. – 60 с.

УДК 577.1:573.4:591.145

ВЛИЯНИЕ КОЖНЫХ ВЫДЕЛЕНИЙ *RANA RIDIBUNDA* НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ И ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРОЙ ЛЕСНОЙ ПОЧВЫ

Калимуллина А.Р., Григориади А.С.

Башкирский государственный университет, г.Уфа

Одна из наиболее древнейших защитных функций эктодермы амфибий – это выработка раздражающих и ядовитых веществ, которые обладают сильным токсическим действием и защищает влажную кожу амфибий от заселения микроорганизмами. Спектр активности ядовитых желез амфибий очень широк – от высокотоксичных соединений типа батрахотоксинов до обезболивающих пептидов – дерморфинов. Следует отметить, что у амфибий на первый план выходят токсические алкалоиды и стероиды, трудно разрушающиеся ферментами патогенного организма [1].

Антимикробная защита амфибий может стать эффективным средством борьбы с инфекциями, которые не поддаются лечению антибиотиками. К таким выводам пришли итальянские ученые, оценившие свойства четырех антимикробных пептидов, вырабатываемых распространенными видами жаб и лягушек [2]. Антимикробные вещества кожных секретов амфибий обладают быстрым мембранолитическим эффектом и характеризуются широким спектром антибиотического действия, что дает толчок к изучению их свойств для анализа возможностей их использования как в медицине. Однако данные вещества могут приобрести важное значение в области сельскохозяйственной биотехнологии, например в создании на основе кожных метаболитов эффективных препаратов, способных защитить сельскохозяйственные растения от патогенных почвенных микроорганизмов [3, 4].

Целью данной работы явилось определение возможного антимикробного влияния водного раствора, содержащего кожные выделения лягушкой озерной *Rana ridibunda*, на разные группы почвенных микроорганизмов.

Для проведения исследования использовалась серая лесная почва, обработанная водным раствором, содержащим секреты кожных желез амфибий. Почва предварительно подвергалась обработке данным раствором в различных концентрациях. 1% (1мл раствора в 100мл воды), 10% (10мл раствора в 100мл воды), 25% (25мл раствора в 100 мл воды), 50% (50мл раствора в 100 мл воды), 100% (матичный раствор, предоставленный заведующим зоологическим музеем БашГУ, к.б.н. Валуевым В.А.). В качестве матричного раствора использовалась вода из аквариума, где содержалось 7 особей в 7 литрах воды. Перед отбором был искусственно удлинен световой день и повышена температура внешней среды для выведения животных из пассивного состояния. Контролем служила необработанная почва.

Изменения микробиологической активности обработанных и контрольных образцов почвы оценивали по показателям численности некоторых физиологических групп микроорганизмов и ферментативной активности почвы. Учет численности микроорганизмов проводили общепринятым методом посева на агаризированные среды [5]. Каталазная активность определялась газометрическим, а дегидрогеназная активность – спектрофотометрическим методом [6].

Наиболее общей группой организмов, характеризующей микробиологическую активность почвы, являются гетеротрофы. Под воздействием водного раствора кожных выделений *Rana ridibunda* снижение численности гетеротрофных микроорганизмов отмечалось только при его высоком содержании в среде (50% и матричный раствор) (рис.1).

В остальных вариантах опыта достоверных различий между показателями не отмечалось.



Рис.1. Изменение численности гетеротрофных микроорганизмов при обработке почвы водным раствором кожных выделений *Rana ridibunda*

Важной группой микроорганизмов, регулирующей содержание азота, доступного растениям, являются азотфиксаторы. При обработке почвы не отмечалось угнетение развития данной группы микроорганизмов, а, начиная с концентрации 25% происходило увеличение численности в 2,5 раза по сравнению с контролем. Наибольший стимулирующий эффект был выражен при концентрации экстракта 50%, что проявлялось в увеличении численности микроорганизмов в 3,5 раза. Полученные данные свидетельствуют о том, что антимикробное действие кожных выделений не затрагивает микроорганизмы, участвующие в поддержании плодородия почвы.

Численность микроскопических грибов также является информативным показателем состояния почвы. Важная экологическая роль микромицетов - минерализации органических веществ, однако в их сообществе определенную долю занимают фитопатогенные виды, вызывающие заболевания у высших растений. В почве могут обнаруживаться и оппортунистические микромицеты, вызывающие заболевания человека и животных.

Водный раствор кожных выделений в малых концентрациях 1% и 10% от полученного матричного раствора стимулировал рост мицелиальных грибов. При дальнейшем увеличении содержания секретов в растворе (до 25%-50%), которым увлажнялась почва, достоверного ингибирующего влияния на данную группу микроорганизмов выявлено не было. Однако при обработке образцов почвы матричным раствором происходило снижение численности микромицетов на 43% по сравнению с таковым показателем в контрольном варианте (рис.2).

Биохимические исследования обработанной почвы показали, что водный раствор кожных выделений оказывает влияние на показатели активности каталазы и дегидрогеназы.

Каталаза широко представлена в клетках живых организмов, в том числе микроорганизмов. Высокую каталазную активность проявляет и почва. Роль каталазы заключается в том, чтобы разрушать токсичную для организмов перекись водорода [6]. Незначительное ингибирующее влияние на активность каталазы оказали обработки почвы матричным и 50%ным раствором, при которых наблюдалось уменьшение активности фермента в 1,8 и 1,6 раза соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наличие данных кожных выделений в среде не будет сильно препятствовать разложению перекиси водорода в почве.

Однако на активность дегидрогеназы внесение в почву водного раствора кожных выделений оказывало значительный угнетающий эффект, который проявлялся уже при самом малом содержании секретов озерной лягушки в растворе, вызывая снижение ферментативной активности в 4 раза по сравнению с контролем. Максимальный ингибирующий эффект отмечался при обработке почвы 50% раствором матричной суспензии, активность снизилась в 12 раз. В остальных вариантах опыта достоверной разницы между активностью фермента и содержанием в среде секретов не отмечалось.

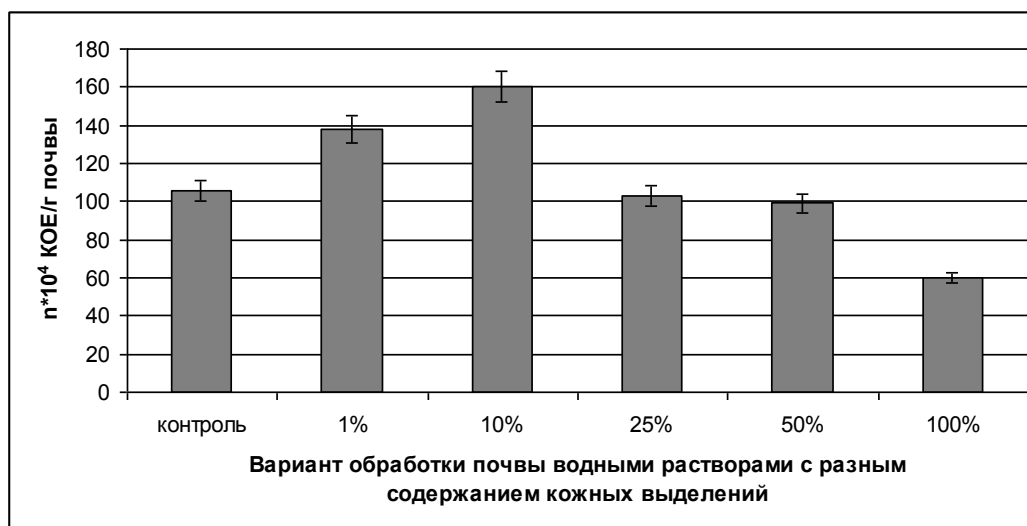


Рис. 2. Изменение численности мицелиальных грибов при обработке водным раствором кожных выделений *Rana ridibunda*.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии антимикробных и антифунгицидных свойств водного раствора кожных выделений *Rana ridibunda* в отношении почвенных микроорганизмов, однако для более явного их проявления следует использовать насыщенные растворы. Также выделения амфибии оказали ингибирующее действие на окислительно-восстановительные почвенные ферменты, продуцентами которых являются в первую очередь бактерии и микромицеты. Однако требуются дальнейшие исследования по изучению влияния кожных выделений амфибий на конкретные виды фитопатогенов.

Литература

1. Орлов Б. Н., Гелашвили Д. Б., Ибрагимов А. К. Ядовитые животные и растения. - М.: Высшая школа, 1990. - 272с.
2. Mangoni M. L., Miele R. T., Renda G., Barra D., Simmaco M. The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms // FASEB J.- 2001. - Vol.15.- P.1431–1432.
3. Yoshikawa T. T. Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? // J. Am. Geriatr. Soc. - 2002. - Vol. 50. - P.226 - 229.
4. Валуев В.А. Влияние экзометаболитов озерной лягушки *Rana ridibunda* на обработанное 0,1% хлором зерно пшеницы // Сборник материалов международной научно-практической конференции "Научные исследования и их практическое применение. Современное состояние и пути развития '2013". – Вып. 1, Том 38. - Одесса, 2013. - С. 38-40.
5. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1991. - 304 с.
6. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. – М.: Наука – 2005. – 252с.

УДК 599.731.1:591.175:[547.495.9]

КОНЦЕНТРАЦИЯ КРЕАТИНИНА В РАЗНЫХ МЫШЦАХ СВИНЕЙ

Канюка Е.Ю.

Институт свиноводства и агропромышленного производства Национальной академии аграрных наук Украины

Креатинин входит в число веществ, которые обуславливают аромат и вкус мясных продуктов [1, 2, 3], он дает горький вкус мясу [3]. В ветеринарной практике оценка содержания креатинина в крови животных является индикатором изменения направленности метаболических процессов в мышечной ткани [4]. Выделение с мочой креатинина также относительно постоянное и пропорциональное количеству (массе) мышц.

Некоторые исследователи установили, что креатин плюс креатинин в мышечной ткани является важным компонентом для образования мутагенности. Однако, в жареном мясе концентрация креатинина была непостоянна, с которой были связаны большинство мутагенов [5]. Креатинин и креатин являются предшественниками гетероциклических аминов в мясе, которые могут образовываться на поверхности мяса при варке при высоких температурах с применением сухого тепла, например при жарке или гриле [6]. По исследованиям Reuterswärd A., Skog K., Jäqeerstad M. креатинин плюс креатин образцов мяса, сердца и языка быков были в пределах 19-33 ммоль / г сырой ткани, а в печени и почках - около 2 ммоль / г [5]. Наряду с гистидин-содеожаскими дипептидами анзерином и карнозином, креатин и креатинин являются наиболее перспективными биомаркерами мышечной ткани, которые используются в пищевой промышленности [7].

Испанской исследователями L. Mora, M. A. Sentandreu, F. Toldra [8] с помощью гидрофильной хроматографии были установлены границы уровня креатинина в созревшем (24 часа после убоя) мясе свиней, что составляет в среднем 6 мкг / мл. Результаты дисперсионного анализа показали, что тип мышцы существенно влияет на содержание креатинина в мышце. Так значительное количество этого вещества имеют мышцы с гликолитическим типом обмена, по сравнению с мышцами окислительного типа (7-9 мг% против 3 мг%). По данным Mora L. и другими [9] свиная грудка имеет уровень креатинина $5,71 \pm 0,34$ мг%, куриная грудка - $1,78 \pm 0,13$ мг%. Выяснено также, что срок криосохранения образцов мяса не влияет на уровень данного показателя.

Целью наших исследований было выяснить уровень креатинина в мышцах свиней породы ландрас и крупная белая (кастраты) $n = 10$, табл 1.

Таблица 1

Место отбора на туше	Название	Латинское название
Окорок	Полуперепончатая мышца	m. semimembranosus
Длиннейшая мышца спины	Длиннейшая мышца спины	m. longissimus dorsi
Шея	вентрально-зубчатая мышца	m. serratus ventralis
Подбрюшная	Прямая мышца живота	m. rectus abdominis
Диафрагма	реберная часть диафрагмы	pars costalis diafragmatis
Спина	трапецеобразная мышца	m. trapezius (pars cervicalis)

В дальнейшем обсуждении материалов будем использовать для удобства сроки первой колонки таблицы 1. Сравнение проводили между группами мышц ($n = 10$), между одноименными мышцами свиней разных пород: ландрас и крупная белая ($n = 5$), между одноименными мышцами свиней разных весовых групп. Были сформированы 2 группы свиней весом 96-106 и 108-112кг (в каждой группе по 5 животных).

Креатинин определяли по реакции Яффе с пикриновой кислотой в щелочной среде, с последующим измерением интенсивности окраски образованного комплекса при длине волны 490 нм с отечественным набором ООО НПП «Филисит-Диагностика» для сыворотки крови и мочи [10]. Нами была адаптирована методика по следующей схеме: 0,5 г мышцы гомогенизировали с 4,5 мл дистиллированной воды (разведение 10 раз), а дальше делали согласно инструкции для сыворотки крови данного набора реактивов. В конечной расчетной формуле учитывали разведения.

Нами было проведено исследование для выявления величины креатинина в 60 образцах мышц свиней. Полученные данные содержания исследуемого вещества в мышечной ткани свиней мясного направления продуктивности представлены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели	Окорок	ДМС	Шея	Подбрюшная	Диафрагма	Спина
M, мкмоль/кг	3916,9	3918,6	2437,4	3691,7	3393,7	3769,3
±m	45,48	111,59	155,63	184,44	414,06	76,18
±S	143,83	352,87	492,14	583,24	1309,38	240,90
Cv, %	3,7	9,0	20,2	15,8	38,6	6,4
ДІ	3827,7 – 4006,0	3699,8 – 4137,3	2132,4 – 2742,5	3330,3 – 4053,3	2582,1 – 4205,2	3620,0 – 3918,6
t=3, p≤0,001	86,1	35,1	15,7	20,0	8,2	49,5

Из данных таблицы 2 видно, что величины лежат в пределах 2,4-3,9 ммоль / кг. Низшую величину имеет вентрально-зубчатая мышца свиней 2437,4 мкмоль / кг. Одинаковое высокое содержание креатинина имеют мышцы окорок и длинная мышца спины. Учитывая то, что креатинин придает мясу горький вкус, то такое свойство будет меньшей степени присуще шеи.

Если коэффициент вариации (Cv) меньше 10%, то выборку считают однородной и слабо меняющейся, если более 15%, то значительно изменчивой. По результатам полученных данных можно сказать, что величина уровня креатинина слабо изменяется при изменении факторов в мышцах окорока, НМС, спины, и существенно реагирует на изменения в мышцах шеи, подбрюшной и диафрагмы. При изменении любого фактора уменьшения изменчивости величины креатинина будем наблюдать в следующем порядке: диафрагма → шея → грудинка → НМС → спина → окорок. Нами был рассчитан доверительный интервал для 95%, для каждого вида мышцы, то есть с 100 исследований 95 должны находиться в пределах данного диапазона. Так доверительный интервал для длиннейшей мышцы спина составляет 3699,8 – 4137,3 мкмоль / кг.

Таким образом, можно сделать вывод, что концентрация креатинина в мышцах свиней находится в пределах 2,4-3,9 мкмоль / кг. Одинаковое высокое содержание креатинина имеют мышцы окорока и длиннейшая мышца спины. Меньше в шейной части (вентрально зубчатая мышца). При изменении любого фактора уменьшения изменчивости величины креатинина будем наблюдать в следующем порядке: диафрагма → шея → грудинка → НМС → спина → окорок. Установлены доверительные интервалы (95%) для величины креатинина в исследуемых мышцах.

Литература

1. Месхи А.И. Биохимия мяса, мясопродуктов и птицепродуктов / А. Месхи. –М.: Легкая и пищевая про-сть, 1984. –С.267.
2. Павловский П.Е. Биохимия мяса / П.Е. Павловский, В.В. Пальмин. –М.: Пищевая промышленность, 1975. –С.228.

3. Рогожин В.В. Биохимия мышц и мяса : Учеб. пос. / В. Рогожин. –СПб.: ГИОРД, 2006. –С.49-50.
4. Родина И.В. Азотистый обмен и мясная продуктивность бычков черно-пестрой породы при разных источниках кормового белка в рационе: автореф. дис... канд. б. н.: 06.02.02 / Ирина Васильевна Родина. –Боровск, 2008. –18 с.
5. Mutagenicity of pan fried bovine tissues in relation to their content of creatine, creatinine, monosaccharides and free amino acids / Laser Reuterswärd at al. // *Food Chem. Toxicol.* –1987. – №25 (10); oct. –P.755-762.
6. Formation of mutagenic / carcinogenic heterocyclic amines in dry-heated model systems meat, and meat drippings / P. Pais at al. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* –1999. – №47(3). –P.1098-1108.
7. Вострикова Н.Л. К проблеме выявления биомаркеров мышечной ткани в мясных продуктах / Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук: Материалы Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием (7-10 ноября 2011г.) / Под общей ред. В.П. Юстратова. –Кемерово: Кузбассвизиздат, 2011. –С.16-20.
8. Mora Leticia Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine and creatinine / Leticia Mora, Miguel Angel Sentandreu, Fidel Toldra // *Journal of agricultural and food chemistry.* –2007. –№55 (12). –P.4664-4669.
9. Mora Leticia Contents of creatine, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metadolic types / Leticia Mora, Miguel Angel Sentandreu, Fidel Toldra // *Meat Science.* – 2008. –№79. –P.709-715.
10. Набори реактивів для дослідження білкового обміну. – ТУ У 24.4-24607793-018-2003. –№ держ. реєстр. 2218/2003.

УДК 57.088.2

СОВМЕЩЕНИЕ ДВУХ ПРОЦЕССОВ: ОЧИЩЕНИЕ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЦИТОКИНОВ

Кособокова Е.Н., Косоруков В.С.

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН

В настоящее время основным продуцентом рекомбинантных терапевтически значимых белков является *Escherichia coli*. Разработанные бактериальные системы экспрессии позволяют получить высокий выход целевого продукта. Однако обычно при накоплении рекомбинантного белка в бактериальных клетках происходит их агрегации в виде плохо растворимых и неактивных телец включения (ТВ). Существующие технологии восстановления биологической активности значительно увеличивают время и затраты на получение субстанции, а также характеризуются низкой эффективностью и серьезными потерями целевого продукта. Целью нашего исследования стала разработка метода восстановления биологической активности рекомбинантного белка непосредственно на аффинной колонке в процессе очищения продукта.

Цитокины занимают важное место на фармацевтическом рынке в качестве иммуностимулирующих, противовирусных и противоопухолевых средств. Именно поэтому

основным объектом нашего исследования стали наиболее значимые из них: интерферон-альфа-2b человека (чИФН- α -2b) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека (чГМ-КСФ).

Материалы и методы

В работе были задействованы ранее полученные генетические конструкции чИФН- α -2b и чГМ-КСФ [1,2]. В качестве экспрессионной системы использовался бактериальный штамм *E.coli* BL21(DE3). Гены рекомбинантных белков находились под контролем промотора T7, что позволило провести индукцию добавлением IPTG до концентрации 0,5мМ.

Благодаря наличию в рекомбинантной конструкции полигистидинового домена возможно было проведение аффинной хроматографии. С целью увеличения эффективности очистки проводился предварительный этап очистки ТВ, заключающийся в последовательной отмывке ТВ растворами с повышением концентрации мочевины (от 0М до 4М). Очищенные и растворенные в присутствии денатурирующих агентов (6М гуанидин гидрохлорид для чИФН- α -2b и 8М мочевины для чГМ-КСФ) рекомбинантные белки наносились на колонку содержащую Ni²⁺-сефарозу (HisTrap™ HP Columns, GE Healthcare, Швеция). После серии отмывок следовал этап восстановления биологической активности (в процессе рефолдинга). Рефолдинг проводился в течение ночи при комнатной температуре посредством градиентного удаления денатурирующего реагента (гуанидин гидрохлорид или мочевины) в присутствии окислительно-восстановительных агентов (глутатион окисленный и восстановленный в соотношении 1:4 соответственно).

На заключительном этапе проводилась дифференцированная элюция: рефолдированный белок элюировался буферным раствором, содержащим 20мМ трис-НСl, 100мМ имидазол, рН 8,0, нерифолдированный – 20мМ трис-НСl, 100мМ имидазол, 0,5М NaCl, 8М мочевины для чГМ-КСФ (или 6М гуанидин гидрохлорид для чИФН- α -2b), рН 7,0.

Полученные пробы анализировались при помощи ПААГ-электрофореза. Качественная оценка электрофоретического профиля проводилась методом вестерн-блоттинга. Количественная оценка рекомбинантных белков осуществлялась при помощи иммуноферментного анализа (ИФА).

Для подтверждения биоэквивалентности полученных препаратов проводилось изучение биологической активности в сравнении с существующими фармацевтическими аналогами. В случае чИФН- α -2b использовалась стандартная международная методика изучения противовирусной активности цитокина на культуре перевиваемых диплоидных фибробластах легкого эмбриона человека по подавлению цитопатогенного действия вируса энцефаломиокардита. Изучение биологической активности чГМ-КСФ проводилось по стандартной методике, основанной на изучении стимуляции пролиферации человеческих промиелоцитных клеток линии HL-60.

Результаты и обсуждение

Бактериальная система экспрессии обеспечивала высокий выход рекомбинантных белков: более 30% всех белков бактериальной клетки. чИФН- α -2b и чГМ-КСФ полностью агрегировались в виде нерастворимых телец включения. Относительно высокая плотность ТВ обеспечивала их отделение от растворимых белков бактериальной клетки уже на этапе центрифугирования.

Следующий этап очистки ТВ был более эффективен для чИФН- α -2b: на выходе бактериальные белки, входящие в состав агрегатов, составляли менее 20%. Аналогичная цифра для чГМ-КСФ – 35-45%. Данные результаты можно объяснить тем, что интерфероны являются белками плохо растворимыми, а это позволяет удалять больше лучше растворимых бактериальных белков, используя растворы с высоким содержанием таких денатуратов как

мочевина в концентрациях до 4М. Для чГМ-КСФ отмывка телец включения растворами, содержащими более 2М мочевины, сопровождалась потерями целевого продукта. Тем не менее, этап предварительной очистки ТВ был необходим в обоих случаях, т.к. повышал эффективность посадки рекомбинантных белков и качество аффинной хроматографии.

Основная очистка осуществлялась при помощи аффинной хроматографии. В обоих случаях рекомбинантный белок полностью связывался с сорбентом. Такой подход обеспечивал высокую степень чистоты целевого продукта (более 95%).

Основным направлением данного исследования был подбор условий рефолдинга, проводимого непосредственно на аффинной колонке. При таком подходе эффективность рефолдинга достигала 80% (для сравнения: по литературным данным высоким показателем при стандартных методах проведения рефолдинга вне колонки являются 30% и более). Такие высокие показатели данного метода связаны со снижением риска межмолекулярных взаимодействий при адсорбции молекул денатурированного белка на твердом носителе. При этом происходит эффективное разделение молекул друг от друга во время ренатурации.

Биологическая активность полученных цитокинов была сопоставима с активностью коммерческих аналогов, что свидетельствует о применимости разработанной технологии для получения терапевтических белков.

Заключение

Развитие биотехнологии позволило получать в необходимых количествах многие ранее малодоступные терапевтические белки. Подавляющая часть таких белков синтезируется штаммами-продуцентами в виде нерастворимых и биологически неактивных ТВ. Для восстановления биологической активности целевого продукта требуются определенные шаги для растворения агрегатов, очищения белка и его рефолдинга. Данная работа посвящена совмещению нескольких этапов. Преимуществом такого подхода является простота, быстрота и высокая эффективность. Метод ренатурации на аффинной колонке высокотехнологичен, поскольку позволяет проводить эффективный рефолдинг совмещенный с процессом очистки рекомбинантного белка.

Выше приведенные данные свидетельствуют о том, что предложенная технология получения, очищения и восстановления биологической активности является универсальной и может быть легко перенесена на другие терапевтические белки.

Литература

1. Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. Исследование влияния поли-His доменов на уровень экспрессии и эффективность очистки Интерферона- α -2b человека // Российский биотерапевтический журнал. 2010. № 4. С. 107–112.
2. Кособокова Е.Н., Скрыпник К.А., Пинюгина М.В., Щербаков А.И., Косоруков В.С. Оптимизация процесса рефолдинга рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека, иммобилизованного на аффинном сорбенте // Биотехнология. 2013. №3. в печати.

УДК 581.1:577.214.625:578.853

СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С УВЕЛИЧЕННЫМИ И УМЕНЬШЕННЫМИ РАЗМЕРАМИ ОРГАНОВ

Кулуев Б.Р.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН

Размеры органов растений контролируются двумя основными механизмами, а именно регуляцией клеточного деления и клеточного растяжения. Во время первой, так называемой, пролиферативной фазы развития любого органа клетки митотически делятся и растет их число. Затем клетки, продолжая делиться, начинают постепенно увеличиваться в размерах за счет роста и растяжения, а также дифференцируются. Регуляция клеточного деления и растяжения в растениях скоординирована и контролируется фитогормонами, микроРНК и большим количеством белковых факторов. Регуляция роста растений – это, безусловно, самый сложный и скоординированный процесс, который, видимо, контролируется тысячами генов, поэтому на данный момент развития науки наибольший интерес представляет исследование основных генов, регулирующих величину органов, так называемых генов переключателей развития, число которых в растениях должно быть на порядок меньше. Предполагается, что используя генно-инженерные конструкции генов регуляторов роста совместно с сильными конститутивными, индуцибельными или тканеспецифичными промоторами возможно получение хозяйственно ценных растений с увеличенными размерами органов. Однако уже при проведении первых работ по получению трансгенных растений с увеличенными размерами органов исследователи столкнулись с проблемой компенсаторного механизма, направленного на поддержание размеров органов близких к норме. Например, при получении трансгенных растений с увеличенным количеством клеток в органе, уменьшались размеры отдельных клеток, а при стимулировании клеточного растяжения уменьшалось количество клеток. Все эти данные говорят о том, что процессы клеточного деления и клеточного растяжения тесно связаны друг с другом через целую сеть сигнальных молекул, которые представлены фитогормонами, транскрипционными факторами, гликопептидами, микроРНК и другими. Одним из хорошо изученных регуляторов величины органов растений, контролирующих клеточную пролиферацию, является ген *AINTEGUMENTA A. thaliana* (*ANT*). Белковый продукт этого гена относится к транскрипционным факторам подкласса AP2 семейства AP2/ERF. Одним из генов-мишеней *ANT* является ген *CYCLIND3;1*, который регулирует клеточное деление и способствует поддержанию клеток органа на стадии S. Транскрипция гена *ANT* регулируется трансмембранным белком ARGOS, экспрессия которого в свою очередь индуцируется фитогормонами ауксинами и цитокинами. Было показано, что трансгенные растения экспрессирующие ген *ANT* под контролем 35S промотора характеризуются более быстрым развитием и большими размерами не только генеративных, но и вегетативных органов. Причём эти данные были получены не только на трансгенных рекухонидках *A. thaliana*, но и с табаком *Nicotiana tabacum* L., относящимся к другому семейству, что говорит об определенной универсальности гена *ANT*, а также свидетельствует о его консервативности. Размер органа растения может зависеть также от изначального количества недифференцированных клеток в апикальной, флоральной и боковой меристемах. Наиболее известными генами регуляторами клеточной пролиферации в апикальной меристеме побега являются *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*), *WUSCHEL* (*WUS*) и *CLAVATA3* (*CLV3*). Продуктом гена *CLV3* является небольшой секреторирующийся в межклеточное пространство пептид, состоящий из 78 аминокислот, способный к транспорту по апопласту, при этом в зрелом

состоянии он гликозилирован L-арабинозой и состоит из 12-ти аминокислот, которые составляют так называемый CLE-домен. CLV3 осуществляет негативную регуляцию пролиферации апикальной и флоральной меристем, его сверхэкспрессия приводит к репрессии гена *WUS*, что теоретически может привести к уменьшению размеров органов. А вот ген *WUS*, наоборот, поддерживает меристематически компетентные клетки в центре апикальной меристемы и его сверхэкспрессия приводит к репрессии гена *CLV3*, тем самым у растения могут увеличиться размеры органов. Из генов регуляторов клеточного растяжения отметим ген *ARGOS-LIKE (ARL)*, экспрессия которого индуцируется брассиностероидами. Повышенная экспрессия данного гена в трансгенных растениях приводит к увеличению всех органов в результате увеличения размеров клеток. Оказалось, что по уровню гомологии данный ген близок к регулятору клеточного деления *ARGOS* и также содержит трансмембранный домен. Гены *ARGOS* и *ARGOS-LIKE* относятся к так называемым OSR-генам (Organ Size Related) и располагаются на эндоплазматическом ретикулуме. В процессе регуляции клеточного растяжения важная роль принадлежит экспансинам. Экспансины – белки, участвующие в разрыве нековалентных связей между целлюлозными микрофибриллами и гликановыми поперечными мостиками. Благодаря своим способностям разрыхлять клеточную стенку, экспансины стимулируют клеточное растяжение и таким образом участвуют в контроле роста всех органов растений. Анализ промоторов генов экспансинов риса показал наличие доменов связывания с ауксинами, гиббереллинами, брассиностероидами, цитокининами и этиленом. В каждом растении присутствуют большое количество разнообразных экспансинов, но лишь у немногих растений они идентифицированы и начались работы по определению их функций. Одним из эффективных методов изучения экспансинов является получение трансгенных форм с повышенным или пониженным уровнем экспрессии целевых генов и проведение морфофизиологического анализа опытных растений в сравнении с контрольными. Кроме экспансинов в регуляции клеточного растяжения участвуют и другие белковые факторы, такие как GRF5, XET и др.

Исходя из данных GenBank, нами был осуществлен поиск открытых рамок считывания различных генов регуляторов роста, а затем подобраны праймеры для амплификации их полноразмерных форм или кДНК копий. В результате проведенной работы на данный момент удалось амплифицировать и клонировать гены *ARGOS*, *AINTEGUMENTA*, *CYCLIND3;1*, *CLAVATA3*, *ARL*, *WUSCHEL*, и *AtEXPA10* из генома арабидопсиса. Используя тот же алгоритм работы, нами впервые был выделен и клонирован полноразмерный ген *AINTEGUMENTA* рапса [1]. При помощи базы нуклеотидных последовательностей GenBank и программы MegaBlast был проведен поиск гомологов гена *AINTEGUMENTA* в геноме тополя. В результате проведенных теоретических исследований в геноме тополя нами было обнаружено 4 гомолога гена *AINTEGUMENTA*. Затем был проведен сравнительный анализ уровня схожести этих 4 генов с геном *ANT* арабидопсиса при помощи программы MegAlign. В итоге из этих 4-х генов было выбрано 2, отличающихся наибольшим уровнем схожести с геном *ANT* арабидопсиса: RAP10 (XM_002307275) и RAP13 (XM_002310846). Был осуществлен поиск открытых рамок считывания и подобраны праймеры к этим генам, в результате они были выделены и клонированы, размер их оказался примерно равным 3000 п.н., что почти в два раза больше их кДНК копий [2]. Нами был также впервые выделен и клонирован ортолог гена *AINTEGUMENTA* из генома табака, причем как полногеномная, так и кДНК копии. Из геномной ДНК табака также выделен ген *NtEXGT* (колирует ксилоглюканэндотрансгликозилазу). После проведенных работ по выделению генов и анализу их нуклеотидных последовательностей, все известные последовательности гена *AINTEGUMENTA* из различных растений были выровнены при помощи программы MegAlign, что позволило определить две его консервативные области. К данным консервативным участкам были подобраны универсальные праймеры. Используя эти праймеры, нам удалось выделить оба консервативных участка гена *AINTEGUMENTA* не

только из арабидопсиса, но и из рапса, табака, а также тополя черного (*Populus nigra*). Эти короткие последовательности ДНК (120-250 п.н.) были нами клонированы с конститутивными промоторами каулимовирусов в антисмысловой ориентации с целью получения трансгенных растений с подавленной экспрессией гена *AINTEGUMENTA*. Точно также нами был амплифицирован и клонирован в антисмысловой ориентации короткий участок гена *ARGOS*, соответствующий консервативному трансмембранному домену. Из генов, кодирующих экспансины, нами были амплифицированы и клонированы *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXPA6* табака, *PtEXPA1* и *PtEXPA3* тополя. Так как экспансины тополя практически не изучены и были выделены нами не из *Populus trichocarpa*, а из *Populus nigra*, то они были названы нами *PnEXPA1* и *PnEXPA3*. Из выделенных нами генов экспансинов, лишь по генам *AtEXPA10* и *PtEXPA1* имеются сведения в литературе, остальные экспансины пока остаются не изученными. При помощи универсальных праймеров нами были выделены консервативные участки генов экспансинов из табака, тополя и арабидопсиса. Они были клонированы в антисмысловой ориентации в бинарных векторах для создания трансгенных растений со сниженной экспрессией экспансинов. Также был осуществлен поиск гомологов гена *ARGOS* в геноме тополя и было обнаружено два гена, самый близкий из которых был выделен нами из тополя черного и назван *PnARGOS*. Ген *WUS* нами был выделен не только из арабидопсиса, но и из петунии. Параллельно нами были подобраны праймеры для количественного ОТ-ПЦР генов *WUS*, *ANT* и *NtEXPA5* табака, чтобы определять содержание их мРНК в полученных нами трансгенных растениях. Все исследуемые гены были субклонированы одновременно в 2-3 бинарных векторах с селективными генами устойчивости к канамицину или гигромицину под контролем 35S промотора или промотора вируса мозаики георгина. Затем генно-инженерные конструкции были внедрены в клетки *A. tumefaciens*, а полученные клоны использовались для создания трансгенных растений табака. В результате проведенных работ на данный момент уже получены трансгенные растения табака, с повышенным и пониженным уровнем экспрессии всех выделенных ранее генов. Полученные трансгенные растения были проанализированы на наличие целевого гена, уровня экспрессии при помощи ОТ-ПЦР и количества копий трансгена при помощи количественного ПЦР в режиме реального времени. Трансгенные по гену *CLAVATA3* растения второго поколения характеризовались снижением высоты стебля, уменьшением числа листьев и цветков, существенным увеличением размеров клеток в листьях и, соответственно, сокращением их количества, приходящегося на один орган, при этом уровень экспрессии гена *AINTEGUMENTA* уменьшался, а экспансина *NtEXPA5* оставался в пределах нормы. Опытные растения зацветали раньше контрольных и характеризовались повышенным содержанием цитокининов, при этом изменений в содержании ауксинов и АБК не наблюдалось. Полученные данные свидетельствуют в пользу вовлечения цитокининов в регуляцию процесса клеточного растяжения, компенсирующего уменьшенное количество клеток, позволяя листьям трансгенных растений поддерживать размеры, соответствующие контрольным растениям. Трансгенные по гену *ARGOS* растения табака характеризовались увеличением размеров листьев на 24%, стеблей на 31% и цветков на 8%, по сравнению с контролем. Однако в отличие от литературных данных нами не было зафиксировано увеличение времени роста. Нами было показано, что экспрессия гена *ARGOS* в табаке приводит к активации не только клеточного деления, но и клеточного растяжения [3]. Трансгенные по гену *ARGOS-LIKE* растения табака характеризовались увеличением размеров листьев и стебля, а величина цветков изменялась в меньшей степени. Увеличение размеров органов было обусловлено стимулированием клеточного растяжения, при этом число клеток в органе даже уменьшалось. Эктопическая экспрессия гена *ARGOS-LIKE* способствовала повышению уровня мРНК экспансина *NtEXPA5* табака. Были также проанализированы трансгенные по гену *PnARGOS* растения табака. Было показано увеличение длины листьев на 20-25%, что обуславливалось увеличением размеров клеток.

Интересно отметить, что размеры цветков у трансгенных по гену *PnARGOS* растений табака в некоторых линиях не только не увеличивались, но и уменьшались по сравнению с контролем. Трансгенные по гену *CYCLIND3;1* растения табака мало отличались по морфологии от нетрансгенных табаков, однако у всех этих растений цветы быстро высыхали, не давая семян, также зафиксировано уменьшение длины тычинок по сравнению с длиной завязи. При получении трансгенных растений табака экспрессирующих ген *AINTEGUMENTA* рапса нами также зафиксировано увеличение размеров листьев на 20%, а стебля на 30%, при этом наибольшая разница с контролем наблюдалась при использовании промотора вируса мозаики георгина вместо 35S промотора. Цветки у этих растений не отличались по размеру от контрольных растений. Трансгенные по гену *PnANTL1* (1-й ген *AINTEGUMENTA* тополя черного) растения табака характеризовались увеличением длины листьев, уменьшением размеров цветка и различными дефектами в развитии венчика и тычинок [2]. Трансгенные по гену *PnANTL2* (2-й ген *AINTEGUMENTA* тополя черного) растения табака отличались увеличением длины листьев и цветков. Увеличение размеров листьев во всех трансгенных растениях было обусловлено стимулированием клеточного растяжения, при этом в случае с геном *PnANTL1* число клеток даже уменьшалось. Эктопическая экспрессия генов *PnANTL1* и *PnANTL2* способствовала повышению уровня мРНК гена *NtEXPA5* табака. Полученные данные свидетельствуют об участии транскрипционных факторов подсемейства AP2 в регуляции клеточного растяжения. Нами было получено большое количество трансгенных растений, экспрессирующих консервативные участки гена *AINTEGUMENTA* в антисмысловой ориентации. Около половины полученных трансгенных растений табака характеризовалось уменьшением размеров листьев, стеблей и цветков, при этом их форма и симметрия не изменялась. Также трансгенные растения прекращали свой рост раньше контрольных, зацветали позже и отличались уменьшением количества цветков. Было показано, что основной причиной уменьшения органов у трансгенных растений явилось сокращение количества клеток, приходящейся на один орган, при этом размеры отдельных клеток оставались неизменными или даже увеличивались [4].

Литература

1. Кулуев Б.Р., Чемерис А.В. Амплификация и клонирование полноразмерного гена *AINTEGUMENTA* рапса // Аграрная Россия. 2009. С. 124.
2. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Ильясова А.А., Чемерис А.В. Эктопическая экспрессия генов *PnANTL1* и *PnANTL2* тополя черного в трансгенных растениях табака // Генетика. 2012. Т. 48. №10. С. 1162–1170.
3. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Ильясова А.А., Чемерис А.В. Конститутивная экспрессия гена *ARGOS* в растениях табака под контролем промотора вируса мозаики георгина // Физиология растений. 2011. Т. 58. №3. С. 443-452.
4. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Лебедев Я.П., Постригань Б.Н., Чемерис А.В. Получение трансгенных растений табака, экспрессирующих консервативные участки гена *AINTEGUMENTA* в антисмысловой ориентации // Физиология растений. 2012. №3. С. 341–353.

УДК 615.012.6; 577.112.083

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКООЧИЩЕННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО КОАГУЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА VII ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГИПОПРОКОНВЕРТИНЕМИИ

Кустов П.А., Бодягин В.В., Милехин Д.А., Красоткина Ю.В.

ЗАО «Генериум», 6011125, Владимирская обл., Вольгинский, 17

Введение

Коагуляционный фактор VII (FVII, проконвертин) является одним из ключевых компонентов системы свертывания крови [1]. Он представляет собой одноцепочечный белок с молекулярной массой около 50 кДа, который синтезируется в печени, после чего секретируется в кровеносное русло. В месте повреждения сосуда FVII образует комплекс со своим рецептором - тканевым фактором, в результате чего переходит в активированную форму и запускает процесс тромбообразования. При недостаточном содержании FVII в крови развивается геморрагический диатез. Дефицит FVII (гипопронвертинемия) может быть как врожденным, который составляет от 0,2 до 1 % всех наследственных коагулопатий, так и приобретенным, например вследствие нарушения синтеза витамина К в печени [2]. Дефицит фактора VII включен во второй перечень редких заболеваний, согласно Федеральному закону «Об основах охраны здоровья граждан Российской Федерации».

Терапия и профилактика кровотечений при дефиците FVII состоит в нормализации его уровня в крови пациента. В основном применяют плазменные концентраты факторов протромбинового комплекса, получаемые путем фракционирования донорской крови [3]. Такие концентраты характеризуются низкой степенью очистки целевого компонента. Кроме того, их применение сопряжено с риском вирусного и прионного заражения, в связи с чем, например, Вахтер рекомендует потребителям этих препаратов вакцинацию против гепатитов А и В. Применение рекомбинантного фактора VII для терапии дефицита FVII обеспечит вирусную безопасность пациентов. Кроме того, использование высокоочищенного белка вместо плазменного концентрата снизит вероятность развития аллергических реакций.

К сожалению, препараты рекомбинантного фактора VII на сегодняшний день отсутствуют. Это связано с тем, что FVII быстро самоактивируется в процессе очистки белка [4]. Поэтому для получения неактивированного FVII необходимо использовать ингибиторы сериновых протеаз, присутствие которых недопустимо в гемостатическом инъекционном препарате. На сегодняшний день не известно ни одного способа получения неактивированного фактора VII без использования ингибиторов сериновых протеаз. Разработка такого метода и явилась целью данной работы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи исследования:

1. Разработка эффективного и экономичного метода выделения rFVII, без использования ингибиторов сериновых протеаз, позволяющего получать гомогенный препарат с содержанием активированной формы не более 1%.
2. Характеристика терапевтически значимых физико-химических, структурных и каталитических свойств rFVII.
3. Определение коагуляционной активности rFVII.

Методы исследования

Рекомбинантный белок был синтезирован методом генной инженерии с использованием перевиваемой линии адгерантных клеток сирийского хомячка ВНК-21 [6].

Продуцент культивировали на модифицированной Дульбекком среде Игла (Invitrogen) с добавлением фетальной бычьей сыворотки (Gibco). Кондиционированную среду, содержащую rFVII, очищали от клеток и клеточного дебриса тангенциальной микрофильтрацией с использованием мембран с диаметром пор 0,45 мкм (Sartorius). Целевой белок выделяли методом колоночной хроматографии с применением анионообменного (Q-sepharose, GE Healthcare) и аффинного сорбентов (VIISelect, GE Healthcare).

Концентрацию белка определяли (1) методом ИФА с применением наборов Immubind Factor VII (American Diagnostica); (2) спектрофотометрическим методом с использованием коэффициента экстинкции $\epsilon_{280}^{0,1\%}=1,4$. Степень чистоты фактора определяли (1) методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия и в восстановленных условиях; (2) методом эксклюзионной ВЭЖХ с использованием колонки TSK-Gel G2000SWXL (Tosoh Bioscience). Структурную целостность rFVII характеризовали (1) методом ультрафиолетовой спектроскопии; (2) анионообменной ВЭЖХ с использованием колонки DNAPac PA-100 (Dionex). Количество активированного FVIIa измеряли кинетическим анализом с использованием хромогенного субстрата S2288 (Chromogenix). Коагуляционную активность rFVII определяли (1) в одностадийном тесте с помощью коагулометра (ЭМКО) и с использованием дефицитной по FVII плазмы и тромбопластин-кальциевой смеси (Ренам); (2) методом хромогенного анализа с применением набора Factor VII Human Chromogenic Activity Kit (Abcam).

Результаты и обсуждение

Фактор VII синтезируется в клетках продуцента в виде полипептида, состоящего из 465 аминокислотных остатков, первые 21 из которых представляют собой сигнальную последовательность, отщепляемую при секреции из клетки. Рекомбинантный белок накапливается в культуральной среде в течение 48 часов, после чего среду сливают и передают на очистку.

Для одного цикла очистки использовали от 8 до 10л кондиционированной среды. В среднем содержание целевого белка по данным иммуноферментного анализа составляло от 0,62 до 0,86 мкг rFVII в 1 мл среды. Клеточный дебрис и перешедшие в раствор клетки продуцента удаляли фильтрацией. Предварительно в среду добавляли неионный детергент Тритон X-100 до конечной концентрации 0,1% с целью предотвращения полимеризации белка и его адгезии на мембранах.

Полученный фильтрат наносили на колонку с Q-сефарозой, предварительно уравновешенную 20 мМ гистидиновым буфером, содержащим 100 мМ NaCl, pH 6,3 (буфер А). При таком низком pH значительная часть примесных белков, в отличие от rFVII, не связывается с анионообменным сорбентом и обнаруживается в проскоке. Фракцию, обогащенную целевым белком, элюировали ступенью 15 мМ CaCl₂ в буфере А. Такое Ca²⁺-зависимое взаимодействие с анионообменной смолой обусловлено наличием у FVII N-терминального домена (Gla-домена), в состав которого входят 10 γ -карбоксилированных глутаминов. В отсутствие двухвалентных катионов данный участок заряжен отрицательно, что обеспечивает сильное связывание с положительно заряженным носителем. Добавление кальция, который быстро связывается с карбоксильными группами, нарушает взаимодействие с носителем и способствует элюции белка. Gla-домен играет важную роль в коагуляционной активности rFVII. Именно этот участок белка отвечает за связывание фактора с отрицательно заряженными фосфолипидами в месте повреждения сосуда, обеспечивая тем самым сайт-специфическую инициацию коагуляции.

Далее для очистки rFVII использовали аффинный сорбент, который представляет собой зерна поперечно-сшитой агарозы с лигированными на ней фрагментами мышинных антител к плазменному фактору VII человека. Использование носителя с фрагментами вместо полноразмерных антител обеспечивает большую емкость носителя и высокую

селективность. Кроме того, такой лиганд стабилен в широком диапазоне рН от 2 до 12. Это позволяет проводить химическую санацию сорбента в щелочных условиях для предотвращения бактериального заражения. Отсутствие эндотоксинов в растворе фармацевтически активной субстанции является важным для производства лекарственных препаратов.

Элюат с предыдущей стадии очистки наносили на аффинный сорбент, уравновешенный буфером А, рН 7,0. Гидрофобные примеси, неспецифически связанные с носителем удаляли промыванием колонки 10 мМ гистидиновым буфером, рН 7,0. Также очистке от примесей способствовала промывка 10 мМ гистидиновым буфером, содержащим 1М NaCl. Целевой белок элюировали 20 мМ гистидиновым буфером, рН 7,0, содержащим 50% полипропиленгликоль.

Для перевода гFVII в раствор лекарственной формы, пригодный для парентерального использования, применяли анионообменную хроматографию. Для этого, аффинный элюат разбавляли в 5 раз 20 мМ гистидиновым буфером, рН 7,0 и наносили на колонку с Q-сефарозой, предварительно уравновешенную тем же буфером. Затем сорбент промывали 20 мМ гистидиновым буфером, содержащим 30 мг/мл сахарозы, 3 мг/мл глицина, 0,6 мг/м метионина, 0,1 мг/мл полисорбата-80, рН 6,3 до стабилизации рН на выходе колонки. Белок элюировали тем же буфером, содержащим 300 мМ NaCl.

Такая схема очистки позволяет получать гомогенный гFVII с выходом от 30% до 40%. Денситометрическая оценка результатов электрофореза в ДСН-ПААГ, показала, что гомогенность препарата составляет не менее 98 %. При этом, согласно данным ГФ-ВЭЖХ от 90 до 92% гFVII представлено мономерной формой. Содержание белков продуцента в полученных сериях препаратах и бычьих IgG не превышало соответственно 200 нг и 30 нг на 1 мг гFVII. Такая степень чистоты соответствует международным требованиям к данному классу активных фармацевтических субстанций.

Основной проблемой при очистке FVII является его самоактивация. Гидролиз пептидной связи между Arg152 и Ile153 превращает FVII в сериновую протеазу – активированный фактор FVIIa, который, в свою очередь, и катализирует этот гидролиз. Поэтому FVIIa является автокаталитическим ферментом. Механизм первичного расщепления связи Arg152-Ile153 до сих пор неясен: наиболее вероятным полагают спонтанную деградацию и неспецифический протеолиз. Тем не менее, известно, что в растворе FVII всегда присутствует небольшое количество активированного фактора. При концентрировании белка, особенно пространственно упорядоченного взаимодействием с подложкой, например хроматографическим сорбентом, запускается автолиз, что приводит к быстрому переходу всего фактора в активированную форму. Кроме того, образующийся FVIIa инактивирует обе формы белка, отщепляет Gla-домен. Такие свойства FVII, необходимые для сайт-специфической инициации, а затем локализации тромбообразования *in vivo*, являются проблемой при очистке FVII.

Для выделения неактивированного FVII в растворы белка добавляют ингибиторы сериновых протеаз, такие как бензамидин, PMSF, апротинин и др. [4]. Однако присутствие даже следовых количеств серпинов в гемостатическом препарате недопустимо. В данной работе для предотвращения активации гFVII очистку проводили при рН 6,3, когда протеазная активность гFVIIa не проявляется. В результате по данным хромогенного анализа содержание гFVIIa в полученных препаратах не превышало 1%. Результаты спектрофотометрического анализа и ОФ-ВЭЖХ показали, что количество белка без Gla-домена составляло в среднем $1,2 \pm 0,4\%$. Коагуляционная активность гFVII, измеренная в одностадийном тесте с использованием стандарта FVII Ph.Eur. BRP 907 составила 2160 ± 240 ед/мг. Специфическая активность, определенная с помощью хромогенного анализа оказалась несколько выше и равной 2350 ± 280 ед/мг. Результаты усреднены по 3-м выделениям.

Полученные значения соответствуют удельной активности очищенного плазменного фактора VII человека [4].

Заключение

Разработана методика очистки рекомбинантного фактора VII человека без использования ингибиторов сериновых протеаз. Описанный способ получения rFVII пригоден для изготовления инъекционных гемостатических препаратов.

Литература

1. Structure, function, and activation of coagulation factor VII / C. Eigenbrot // Curr. Protein. Pept. Sci. -2002. -Vol. 3.- P.287-99.
2. Rare bleeding disorders/ F. Peyvandi, P.H. Bolton-Maggs, A. Batorova, P. De Moerloose// Haemophilia. – 2012. – Vol.18.-P. 148-53.
3. Registry of clotting factor concentrates/ M. Brooker // Facts and Figures.- 2012. Vol.6.- P.12.
4. Purification and properties of human coagulation factor VII/ G.J. Broze Jr., P.W. Majerus/ J. Biol. Chem.// -1980.- Vol. 255.- P. 1242-1247.
5. Пат. 2448160 Российская Федерация МКП⁷ C12N15/63 (2006.01)C12N15/12 (2006.01)C12N5/16. Рекомбинантная плазмидная ДНК pAP271, кодирующая полипептид фактора VII свертываемости крови человека, и линия клеток *Mesocricetus auratus* ВНК 21 к.13 (2Н7) – продуцент рекомбинантного фактора VII свертываемости крови человека/Александров А.Н., Григорьева О. В., Мартыанов В.А., Петров А.В., Шустер А.М.; Патентообладатель: Закрытое акционерное общество "Генериум". - № 2010145842/10; заявл. 11.11.2010

УДК 577.112.085.4+577.15+615.322+547.963.61.001.6

СИСТЕМЫ ПСЕВДОПОЛИСАХАРИДЫ-СВЯЗЫВАЮЩИХ И (ГЛИКО)ОКСИДАЗЫ-СОДЕРЖАЩИХ ФРАКЦИЙ РАСТЕНИЙ МЕДИЦИНСКОГО ЗНАЧЕНИЯ: ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИ РАЗДЕЛЕННЫЕ МЕМБРАННЫЕ ФОРМЫ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЕЙ В ЖИВОМ ИЗОБРАЖЕНИИ

Лахтин М.В.¹, Лахтин В.М.¹, Алешкин А.В.¹, Афанасьев С.С.¹, Корсун В.Ф.²

¹ФБУН «МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова 10;

²Институт фитотерапии, 117647, Россия, Москва, ул. Профсоюзная 123-А, к. 2

Антимикробные лектины (Л) и (глико)оксидазы (О) в биологических источниках представлены системными формами (ЛС и ОС, соответственно). Цель – идентифицировать растительные ОС и затем ЛС.

Материалы и методы: Конканавалин А (ConA, Sigma), псевдополисахариды на основе биотинилированного (б) полиакриламидной (ПАА) линейной цепи (Углеводы-ПАА-б; www.lectinity.com). Концентраты высокомолекулярных компонентов (> 27 кД) растительных фракций [1]: ФГ-II смеси 7 растений медицинского значения «ФитоГор»; ИЧ-I, II, III из листьев «Иван-Чая»; ФК2-I, II из корней растений и березового гриба «Фитокомпозиции № 2»; ЧВ-II из березового гриба (материала чаги) «ЧагоВита». Фракции

разделяли изоэлектрическим фокусированием (ИЭФ) в блоке ПАА-геля в градиенте рН 2-6 в присутствии мочевины и сахарозы [2]. Разделенные компоненты в треках образцов электрооблотировали на гидрофобные незаряженные мембраны Immobilon-P. ОС на иммобиллоне проявляли хемилюминесцентным устойчивым при длительных инкубациях хемилюминесцентным субстратом повышенной чувствительности BioWest (UVP). ЛС в треках на иммобиллоне предварительно обрабатывали посредством Углеводы-ПАА-б: Ман-ПАА-б и затем Gal-ПАА-б. Связавшиеся гликоконъюгаты далее проявляли обработкой блота Стрептавидин-пероксидазой и затем - BioWest. Хемилюминесценцию на блоте регистрировали в оптимизированных подобранных режимах с использованием «живого» кинетического ступенчатого изображения картин в системе BioChem System (UVP).

Результаты: 1. Идентифицированы ОС в интервале изоэлектрических точек рI 3.2-3.7 (фракции ФК2-II, ЧВ-II). 2. Наблюдалось синергистическое действие Ман-ПАА-б и Ман-6-Р-ПАА-б в условиях детекции расширенного ряда форм ЛС. Псевдо(фосфо)маннан-связывающие ЛС (ConA и ФК2-II были распределены сходным образом в области рI 5-6 (система ConA характеризовалась максимальным числом форм). Дополнительное окрашивание псевдогалактаном не изменяло протяженность областей ЛС. 3. ИЭФ в ПАА-геле и электрооблотинг приводили к значительной очистке и разделению ЛС и ОС, получению активных иммобилизованных индивидуальных компонентов и биосистем. **Заключение:** Предложенные подходы и технологии позволяют упрощенно идентифицировать Л, О, ЛС и ОС в грубых микрообразцах, например, биологического происхождения. Открываются перспективы использования иммобилизованных активных систем в биохимии и биотехнологии.

Литература

1. Лахтин В.М., Корсун В.Ф., Лахтин М.В., Корсун Е.В. Изучение цитоагглютинирующих активностей (фитолектиновой, рассасывающей агглютинаты и агглютинирующей цветными примесями). Практическая фитотерапия. 2004. № 3. С. 9-16.
2. Lasne F., Martin L., Crepin N., de Ceauriz J. Anal. Biochem. 2002, 311, 119-126.

УДК 579: 616.992.282: 57. 063.8+615.322+547.963.61.001.6

АНТИМИКРОБНЫЕ СТРАТЕГИИ НА ОСНОВЕ СИНЕРГИСТИЧЕСКИХ СИСТЕМНЫХ ФАКТОРОВ: ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ АНТИМИКРОБНЫЕ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЛЕКТИНЫ, ФИТОЛЕКТИНЫ, В СОЧЕТАНИИ С АНТИБИОТИКАМИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ

Лахтин М.В.¹, Лахтин В.М.¹, Афанасьев С.С.¹, Алешкин А.В.¹,
Байракова А.Л.¹, Корсун В.Ф.²

¹ФБУН «МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова 10; ²Институт фитотерапии, 117647, Россия, Москва, ул. Профсоюзная 123-А, к. 2

В связи с широким применением антибиотиков, вызывающих появление в организме пациентов широкого ряда устойчивых к антибиотикам условно-патогенных микроорганиз-

мов, поиск эффективных альтернативных антибиотикам антимикробных агентов и разработка на их основе системных антипатогенных формул являются актуальными. Использование пробиотиков имеет серьезные ограничения, когда клеточные ингредиенты часто неустойчивы, а их действие подвергается супрессии в условиях длительной и/или повторяющейся антибиотикотерапии пациента. Новыми и перспективными антимикробными агентами являются препараты и формулы, содержащие лектины (Л - широко распространенные в природе гликоконъюгаты/углеводы-распознающие и обратимо связывающие белки и их комплексы) пробиотических бактерий (ЛПБ: ЛБ и ЛЛ – Л бифидобактерий и лактобацилл, соответственно) человеческой природы и фитолектины-содержащие фитопрепараты (ФЛФП) медицинского значения [1-9], представляющие собой новый класс деструкторов биопленок патогенов и способные имитировать защитные реакции пробиотических бактериальных клеток, поддерживать защитные системы организма человека [10-21]. Цель - предложить антимикробные стратегии на основе сочетанного использования синергистических антимикробных Л-содержащих препаратов.

Антимикробные стратегии на основе принципов (в скобках - пояснение, конкретизация, примеры):

*противопоставления ЛПБ системам «грибки+грамположительные бактерии» типа «стафилококки+кандиды» (ЛЛ – усиленный пролонгированный удар по массивам стафилококков, ЛБ – по массивам кандид);

*рефлексии эукариотического условного патогена как коммуникационного тела (достижение коммуникационного разобщения - появления островков массива грибка и достижение коммуникационной гибели патогена в условиях задаваемой мозаики мультиточечной атаки антифунгалом/«сочетанием антифунгалов» в рамках грибкового массива: кислых или катионных ЛПБ в периферических или внутренних областях, соответственно);

*инициации каскадов саморазрушения массива эукариотического патогена в присутствии антимикробных агентов (взаимодополняющие картины пролонгированного разрушения массива стафилококков в присутствии ЛЛ и ЛБ, запуск волнового направленного лизиса (массива кандид) двух типов: раннего [преимущественно в периферических направлениях; преимущественно кислыми ЛБ] и позднего [преимущественно в центростремительном-центробежном направлениях - преимущественно щелочными ЛЛ]);

*синергизма антимикробных агентов с различающимися механизмами действия (по соотношению выраженности микростатического (МС) и микробоцидного лизисного действия: антибиотики [ранний эффект: МС>>лизис(нет)], ФЛФП [преимущественно поздний эффект: МС>лизис], раннее действие ЛПБ [лизис: ЛБ>ЛЛ], позднее действие ЛПБ [лизис ЛБ<ЛЛ, поддержание «стерильности» лизированной территории массива стафилококков и/или кандид как вариант максимального пролонгированного МС-действия после первичного эффекта лизиса]; позднее микробоцидное действие (гребни валов массива кандид как невозстанавливаемые на территории первичного лизиса дрожжеподобного гриба в присутствии ЛПБ);

*каскадного (во времени и по охвату территории массива условного патогена) действия антимикробных агентов (антибиотики—кислые ЛПБ[ЛБ>ЛЛ]—щелочные ЛПБ[ЛЛ]);

*мультифункционального действия антимикробного агента (прямое и опосредованное действие ЛПБ: маскирование важных участков на слизистой, нормализация процессов в слизистой, проявление антагонизма в отношении процессов клеточных сборок с участием условных патогенов, избирательное блокирование важных поверхностно-клеточных рецепторов условного патогена для предотвращения последующего клеточного деления и выброса нежелательных гидролаз);

*возможности внутриклеточной доставки и дальнейшего сортировки низкомолекулярного агента (в том числе использование факта, что олигоманнозид- или «гликаны комплексного

типа)-меченые природные гликоконъюгаты сохраняются/накапливаются внутри эукариотических клеток или секретируются во вне, соответственно);

*использования преимуществ пробиотических Л по сравнению с антителами (меньшая молекулярная масса, повышенная проницаемость, внутриантигенная мспецифичность, способность к направленной сборке/разборке ассиметричных активных мультимолекулярных ансамблей; «неправильная» сборка условным патогенном в присутствии ЛЛ или ЛБ приводит к последующей деградации конструкций патогена); использование возможностей кофункционирования пробиотических Л и антител;

*использования ресурсов окружения и условного патогена-мишени (увеличение активных специфически узнающих молекул Л в результате ограниченного протеолиза разными типами избирательных протеиназ; выход Л из комплексов под воздействием гидролаз; возможен подбор пулов Л, дающих максимальный антимикробный эффект, в зависимости от типа гидролаз клеточной мишени или привнесенной с Л выбранной гидролазой рестриктоного/ограниченного типа).

*использования естественного синергизма фито- и пробиотических Л с пробиотиками или пробиотическими штаммами микроорганизмов (ЛПБ и/или ФЛФП и пробиотиков, ЛЛ и органических кислот+аминокислот+ЛЖК Ацилакта).

Заключение: Приведенные выше данные об антимикробных стратегиях на основе лектиновых систем пробиотического типа (ЛПБ и ФЛФП медицинского значения) открывают широкие перспективы к созданию новых системных синергистических антимикробных препаратов и формул (в сочетании с антибиотиками или альтернативных им) пролонгированного действия для профилактики и терапии. Такого рода препараты и формулы перспективны в будущем для применения в популяционной и персонализированной медицине.

Литература

1. Lakhtin V., Lakhtin M., Alyoshkin V. Lectins of living organisms // *Anaerobe*. – 2011. - V. 17; No 6, P.452-455.
2. Лахтин В.М., Поспелова В.В., Лахтин М.В., Медведкова Н.А., Бовин Н.В. Взаимодействие компонентов культуральной жидкости лактобацилл и бифидобактерий с синтетическими растворимыми аналогами полисахаридов. Материалы международной конференции «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы». М., 2004. С. 28 - 29.
3. Lakhtin V.M., Lakhtin M.V., Pospelova V.V., Shenderov B.A. Lactobacilli and bifidobacteria lectins as possible signal molecules regulating intra- and interpopulation bacteria-bacteria and host-bacteria relationships. Part I. Methods of bacterial lectin isolation, physicochemical characterization and some biological activity investigation // *Microb. Ecol. Health Dis.* - 2006. - V.18. – P. 55–60.
4. Lakhtin V.M., Lakhtin M.V., Pospelova V.V., Shenderov B.A. Lectins of lactobacilli and bifidobacteria. II. Probiotic lectins of lactobacilli and bifidobacteria as possible signal molecules regulating inter- and intrapopulation relationships between bacteria and between bacteria and the host // *Microb. Ecol. Health Dis.* - 2007. - V. 19. - P. 153-157.
5. Лахтин М.В., Алешкин В.А., Лахтин В.М., Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Поспелова В.В. Роль лектинов пробиотических микроорганизмов в жизнеобеспечении макроорганизма // *Вестник РАМН*. - 2010. - № 2. - С. 3-8.
6. Lakhtin M., Lakhtin V., Alyoshkin V., Afanasyev S. Lectins of beneficial microbes: system organization, functioning and functional superfamily // *Beneficial Microbes*. - 2011. – V. 2(2). – P. 155–165.
7. Lakhtin M., Lakhtin V., Aleshkin A., Bajrakova A., Afanasiev S., Aleshkin V. Lectin systems imitating probiotics: potential for biotechnology and medical microbiology. In the book:

- “Probiotics 2012”, Edited by E.C. Rigobelo, <http://dx.doi.org/10/5772/3444>. – 2012. – P. 417–432.
8. Лахтин В.М., Алешкин В.А., Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Пожалостина Л.В., Поспелова В.В. Лектины пробиотических штаммов лактобацилл и бифидобактерий: антипатогенные свойства // Мат. юбил. Всеросс. научно-практич. конф. «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения». – Н.Новгород: Издатель Гладкова, 2009. - С. 146-149.
 9. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Кахановская Н.А., Пожалостина Л.В., Корсун В.Ф. Лечебный и пробиотический потенциал лектинсодержащих фитопрепаратов. (Новые подходы на примере фитокомплекса Эндокринола) // Практическая фитотерапия. - 2009. - № 1. - С. 5-12.
 10. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Пожалостина Л.В., Поспелова В.В., Корсун В.Ф. Фито- и пробиотические лектины – синергичные антипатогены // Практ. фитотер. - 2010. - № 1. - С. 5-11.
 11. Lakhtin M., Alyoshkin, V., Lakhtin V., Afanasyev, S., Pozhalostina, L., and Pospelova, V. Probiotic lactobacillus and bifidobacterial lectins against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* clinical strains: new class of pathogen biofilm destructors // Probiotics & Antimicrobial Proteins, 2010, 2(3), 186-196.
 12. Лахтин М.В., Алешкин В.А., Лахтин В.М., Галимзянов Х.М., Афанасьев С.С., Караулов А.В., Несвижский Ю.В., Байракова А.Л., Воропаева Е.А., Алешкин А.В., Рубальский Е.О. Анти-*Candida-non-albicans* действие пробиотических лектинов // Астраханский мед. ж. – 2011. – Т. 6; № 2. - С. 73-76.
 13. Лахтин М.В., Алешкин В.А., Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Караулов А.В., Галимзянов Х.Л., Несвижский Ю.В., Байракова А.Л., Воропаева Е.А., Алешкин А.В., Рубальский Е.О. Поведение *Candida tropicalis* и *Candida krusei* в присутствии пробиотических лектинов // Астраханский мед. ж. – 2011. – Т. 6; № 3. – С. 97-101.
 14. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алешкин В.А., Байракова А.Л., Афанасьев С.С., Корсун В.Ф. Фито- и пробиотик-аналоговая терапия грибковых инфекций: теория и практический потенциал в развитии // ARS MEDICA. - 2011. – № 15. – С. 183-187.
 15. Лахтин М.В., Байракова А.Л., Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Корсун В.Ф. Пробиотические лектины человека в защите от дисбиозов в различных биотопах человека // Практ. фитотер. - 2011. - № 1. – С. 4-13.
 16. Лахтин М.В., Байракова А.Л., Лахтин В.М., Алешкин А.В., Афанасьев С.С., Алешкин В.А. Кофункционалирование лектинов мультикомпонентного пробиотика и потенциального пробиотического компартмента биотопа на примере ауторегуляторной лактобациллярной системы // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. - 2012. - № 5; Часть 1. – С. 250 – 253.
 17. Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Лахтин В.М., Алешкин В.А. Прогнозирование выживания и гибели ассоциатов микробных патогенов в присутствии лектинов пробиотических бактерий: значение для терапии // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. - 2012. - № 5 (87); Часть 1. – С. 254–256.
 18. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алешкин А.В., Байракова А.Л., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Корсун В.Ф. Пробиотические лектины - ингредиенты биопрепаратов, БАД и лекарственных форм // Практ. фитотер.-2012.-№ 1.-С.4-9.
 19. Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Лахтин В.М., Байракова А.Л., Алешкин А.В., Корсун В.Ф. Препараты, содержащие лектины, в комбинационной терапии // Практ. фитотер. – 2012. - № 4. – С. 4-14.
 20. V.M. Lakhtin, M.V. Lakhtin, A.L. Bajrakova, S.S. Afanasiev *Candida albicans*: New Aspects of Patogenicity, Interaction to Antifungals, Biofilms and Preventive Anti-*Candida* Strategies. In

the Book: "*Candida Albicans: Symptoms, Causes and Treatment Options*". Editors: Leon A. Dietrich and Tim S. Friedmann. Nova Science Publishers, 2013.

21. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Алешкин А.В. Лектины и ферменты в биологии и медицине. М.: Издательство «Династия», 2010. - 496 с. УДК 634.8

УДК 579.262: 579.64:631.46

ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПОВЕРХНОСТНОГО АГГЛЮТИНИНА RAR A, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩЕГО РИЗОБИИ С КОРНЯМИ РАСТЕНИЙ

Нигматуллина Л.Р., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х.

Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г.Уфа, пр.Октября,71.

Ассоциативная симбиотическая система – это система симбиотических взаимоотношений между микроорганизмами и растениями. Особое значение среди них имеют ризосферные бактерии, обладающие совокупностью полезных для растений свойств, способствующих их росту. Они относятся к грамтрицательным бактериям, способным вступать в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями. Исследования этой перспективной для практического использования группы микроорганизмов вызывают большой интерес для развития экологически-ориентированного земледелия [Mishra et al., 2006; Mehboob et al., 2012; Ashraf, 2013].

На ранних стадиях инфекции, ризобии придерживаются корневых волосков растений-хозяев. Адгезия - комплексно многоступенчатый процесс, состоящий из нескольких взаимодействий, как специфических, так и неспецифических [Dazzo и Hubbell 1975]. В качестве адгезинов ризобий могут выступать различные поверхностные компоненты: экзополисахариды (ЭПС), капсулярные полисахариды (КПС), липополисахариды (ЛПС) и поверхностные белки, такие как рикадгезин [Dazzo F.B., Truchet G. 1983].

Согласно модели, представленной Смиттом и др. (1987, 1992), первый шаг в процессе проникновения является неспецифичным. Бактерии могут использовать по крайней мере два механизма для первичного связывания с корневыми волосками растений. Один из них может быть опосредован рикадгезинами, другой же взаимодействием бактериальных глюкоманнан и растительных лектинов. Эта модель представляет один из двух механизмов, который будет использован для прикрепления бактерий в зависимости в кислых или щелочных условиях проходит прикрепление. В слегка щелочной среде (рН 7.4) лектины, располагающиеся на кончиках корневых волос будут освобождены в ризосферу в результате увеличения их растворимости. В таких условиях прикрепление бактерий будет осуществляться с помощью рикадгезин-опосредованного механизма. В противоположность этому, в кислых условиях (например, рН 5,6) лектины не становятся растворимыми и будут удерживаться на корневых волосках, а рикадгезин будет освобожден в среду. Следовательно, при кислых условиях бактерии будут использовать лектин-опосредованный механизм [Rodriguez-Navarro D.N., et al., 2007].

Рикадгезин – молекула, которая обладает двумя обязательными функциональными центрами, первый – для рецептора, локализованного на бактериальной поверхности клетки, а другой – для конкретной структуры на поверхности корневых волосков. Показано, что решающее значение в заякоривании белка в клетке играют наличие ионов Ca^{2+} на поверхности бактерии [Смит и др., 1991].

В связи с этой целью работы было обнаружено и изучено бактериальный поверхностный белок RapA, который является производным только небольшой группы ризобий: *Rhizobium leguminosarum* и *Rhizobium etli* и состоит из двух гомологичных Р-доменов, представляющие собой рецептор-связывающие сайты. RapA белки способны агглютинировать клетки бактерий путем связывания со специфическими рецепторами, расположенными на одном полюсе бактерий. [Ausmees et al., 2001]. Для обнаружения белка RapA произвели подбор олигонуклеотидных праймеров к специфическим консервативным последовательностям ДНК. При подборе использовали программу «PrimerSelect» из пакета компьютерных программ «Lasergene» («DNASTAR, Inc.», США). С помощью этих праймеров был обнаружен RapA белок у *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Для его выделения использовали элюцию из агарозного геля и очистку ДНК при помощи набора фирмы Цитокин. Далее клонировали ген RapA во вспомогательный вектор pAL-TA, лигирование проводили с помощью T4 ДНК-лигазы. Трансформировали RapA в компетентные клетки *E. coli* XL-Blue и выращивали их на среде LB с добавлением ампициллина. Для визуализации трансформированных колоний в питательную среду были добавлены Iptg и x-gal. В результате трансформированные колонии вырастали белыми, а нетрансформированные были голубого цвета. Наличие гена RapA белка проверяли с помощью ПЦР анализа.

Таким образом, на основании сравнительного анализа с помощью множественного выравнивания последовательностей ДНК микроорганизмов, зарегистрированного в международных базах данных генов EMBL./GenBank/DDBJ были подобраны специфические олигонуклеотидные праймеры к консервативным последовательностям генов 16S рРНК. Были подобраны оптимальные условия для ПЦР анализа. С помощью специфичных олигонуклеотидных праймеров были обнаружены гены соответствующие гену RapA белка бактерий.

В дальнейшем предполагается получение растений, трансгенных по генам бактериальных адгезинов (агглютининов), исследование возможности и характер колонизации ризосферы трансгенных по генам агглютининов растений флуоресцентно мечеными штаммами клубеньковых бактерий.

Литература

1. Ahmad F., Ahmad I., Khan M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities // Microb. Res. 2008. V. 163. P. 173-181.
2. Ausmees N., Jacobsson K., Lindberg M. A. Unipolarly located, cell surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* // Microbiology, 2001, V.147. P. 549–559
3. Dazzo, F. B. & Hubbell, D. H. (1975). Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium* clover association. // Appl Microbiol, 1975, V. 30. P. 1017-1033.
4. Dazzo F.B., Truchet G. (1983) J. // Membrane Biol. V. 73. P. 1-16.
5. Rodriguez-Navarro D.N., Dardanelli M.S., Ruiz-Sainz J.E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants // FEMS Microbiol Lett 272, 2007. P.127–136.
6. Mehboob I., Naveed M., Zahir A. Z. Ashraf M. Potential of Rhizobia for Sustainable Production of Non-legumes // Crop Production for Agricultural Improvement. Springer Netherlands. 2012. P.659-704.

7. Mishra R.P., Singh R. K., Jaiswal H. K., Kumar V., Maurya S. *Rhizobium*-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.) // Curr. Microbiol. 2006. V. 52. P. 383–389.
8. Smit, G., Kijne, J. W. & Lugtenberg, B. J. Involvement of both cellulose fibrils and a Ca²⁺-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips // Bacteriol 1987. V. 169. P. 4294-4301.
9. Smit, G., Tubbing, D. M. J., Kijne, J. W. & Lugtenberg, B. J. J. Role of Ca²⁺ in the activity of rhicadhesin from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, which mediates the first step in attachment of *Rhizobiaceae* cells to plant-root hair tips // Arch Microbiol, 1991. V. 155. P. 278-283.
10. Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B. J. & Kijne, J. W. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots // Mol Microbiol, 1992. V. 6. P. 2897-2903.

УДК 581.1:577.214.625:578.853

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *CLAVATA3 A. THALIANA*

Нургалеева Э. З.

ФГБОУ ВПО Башкирский государственный университет

Развитие высших растений представляет собой сложный процесс, в основе которого лежат клеточные деления и рост клеток путем растяжения. Эти процессы регулируются на генетическом уровне путем изменения пространственно-временного паттерна экспрессии генов развития. Органогенез, продолжающийся в течение всей жизни растений, приурочен к меристемам, и именно в меристемах реализуется большинство генетических программ развития. В функциональном отношении наиболее важной является апикальная меристема побега (АМП), так как она продуцирует все наземные органы растения, включая меристемы боковых побегов, меристемы соцветий и цветочные меристемы. Центральная зона АМП образована недетерминированными и недифференцированными клетками, которые, переходя в периферическую зону, дифференцируются и дают начало боковым органам, а переходя в подстилающую зону, дают начало центральным тканям побега [1]. На генетическом уровне благодаря взаимодействию продуктов большого числа генов, растению удается поддерживать в CZ постоянное число недетерминированных клеток и непрерывно рекрутировать клетки из этого пула для образования новых тканей и органов [2]. Гены *CLAVATA* являются негативными регуляторами клеточного деления в АПМ. Белки CLV являются компонентами одной сигнальной цепи. Мутации генов CLV приводят к накоплению большого числа недифференцированных клеток в центральной части АПМ [3, 4, 5, 6]. Ген *CLV1* кодирует белок цитоплазматической мембраны, который состоит из внеклеточного домена, содержащего богатые лейцином повторы, трансмембранного домена и функционального киназного домена, расположенного в цитоплазме [4, 7]. Ген *CLV2* кодирует рецепторный белок, сходный по своему строению с белком CLV1, который отличается от него отсутствием киназного домена [6]. Активированный рецепторный комплекс белков CLV1 и CLV2 включает в себя и другие регуляторные и сигнальные белки, которые связываются с киназным доменом рецептора CLV1 через фосфорилированные

аминокислотные остатки, которые выступают в роли сайтов связывания для этих эффекторных молекул [8]. Рецепторный комплекс активируется при взаимодействии с лигандом, которым служит продукт гена *CLV3*. Сигнал от активированного рецепторного комплекса передается через MAP-киназный каскад в ядро, где его мишенью служит ген *WUS*.

Цель данной работы заключалась в исследовании регуляции клеточной пролиферации в апикальной меристеме и выяснения взаимосвязи этого процесса с делением и ростом клеток в листьях трансгенных растений табака с повышенной экспрессией гена *CLV3* *A. thaliana*.

Материалы и методики исследования

В работе использованы бактерии *E. coli* штамма XL1-Blue и *A. tumefaciens* штамма AGL. Из плазмид использовали T-вектор pKRX и бинарный вектор pCambia 1301 с геном устойчивости к гигромицину и репортерным геном *GUS* (CAMBIA, Австралия). Ген *CLV3* был выделен из тотальной ДНК арабидопсиса при помощи праймеров ClaF CACTCAGTCACTTTCTCTCT и ClaR GAAAATCATGAGATATAATAGTG. Для получения ампликонов с “тупыми” концами использовали Pfu ДНК-полимеразу (Сибэнзим, Россия), для “затупления” липких концов после рестрикции или амплификации использовали T4-ДНК-полимеразу (Сибэнзим, Россия). Для поиска целевых клонов при лигировании в векторе pCambia 1301 использовали праймер 35SCambF: AGAGGACСТААCAGAАСТCG в паре с праймером 1301R TGCTCTAGCATTCGCCATTС. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, США). Электропорацию компетентных клеток *A. tumefaciens* проводили при помощи электропоратора фирмы Bio-Rad модели Micropulser. Поиск гомологичных генов осуществляли при помощи программ MegAlign пакета Lasergene (DNASTAR, США) и программы MegaBlast, доступной через сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Трансгенные формы табака (*Nicotiana tabacum* L. Petit Havana SR1) получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков. Первичные трансгенные T₀-побеги отбирали на селективной среде (соли среды МС с добавлением 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л НУК), содержащей 25 мг/л гигромицина (Нуг). Качественную оценку активности репортерного гена *GUS* в листьях T₀-побегов определяли гистохимически, используя субстрат X-Gluc. Образцы ткани листьев инкубировали в течение ночи при 37⁰С в 0.1% растворе X-Gluc (натриевая соль 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-глюкуроновой кислоты, Fermentas), содержащем 0.1 М натриевый фосфатный буфер (pH 7.0), 10 мМ Na₂EDTA и 0.1% Triton X-100. После инкубации с гистохимическим реактивом в течение ночи, зеленые ткани отбеливались обработкой 70% этанолом и исследовались под стереомикроскопом на наличие синей окраски. Все полученные T₀ GUS+ побеги каждого варианта укореняли в присутствии 25 мг/л Нуг, затем переносили в почвенную смесь, акклиматизировали к условиям светоплощадки, доводили до цветения, самоопыляли и получали семена (T₁ потомство).

Для контроля наследования трансгенов и определения количества вставок, часть T₁ семян каждой полученной линии поверхностно стерилизовали последовательным погружением в 70% спирт, 5% раствор гипохлорита натрия, промывали в стерильной дистиллированной воде и проращивали на среде МС с добавлением гигромицина в климатической камере Binder (Германия). Через 3 недели производили подсчет устойчивых и неустойчивых к селективному агенту семян и определяли расщепление при наследовании гена селективного маркера. Результаты обрабатывали методом χ^2 по стандартной методике. Подсчитывали количество цветков и листьев и определяли массу надземной части растения в период цветения. Для изучения влияния конститутивной экспрессии целевого гена на размер и количество клеток, проводили измерения площади клеток нижнего эпидермиса листьев

одного возраста. Также определяли среднее число клеток, приходящихся на один лист и на 1 мм² листовой поверхности.

Результаты исследования

В результате проведенной агробактериальной трансформации листовых дисков табака был отобран 21 трансгенный побег, из которых успешно укоренились лишь 12. Репортерный ген *GUS* хорошо экспрессировался в 6-ти отобранных растениях табака. 3 трансгенных растения с высоким уровнем экспрессии репортерного гена были акклиматизированы к условиям почвы. При выращивании поколения T₀ у двух растений (№14 и №18) были выявлены определенные морфологические особенности. Экспрессия целевого гена была показана только для этих двух растений при помощи метода ОТ-ПЦР, причем размер ампликона составил немногим более 250 п.н., что совпадает с теоретически ожидаемым размером в 285 п.н. Из трансгенных растений №14 и №18 удалось получить семена, второе поколение которых и использовалось в дальнейших экспериментах по морфологической характеристике.

В ходе роста опытные и контрольные растения практически не различались по длине и площади листьев. Высота стебля лишь у линии опытных растений №18 была снижена на 17% по сравнению с контролем. Размеры цветка у опытных растений были лишь немного меньше, чем у контрольных, а также всегда зацветали раньше. У растений, сверхэкспрессирующих ген *CLV3* табака, уменьшалось число цветков. Несмотря на одинаковые размеры листьев у исследуемых растений, размеры клеток у опытных растений всегда были заметно больше, чем у контрольных форм. У опытных растений линии №14 размеры клеток по сравнению с контрольной группой были увеличены на 38%, а число клеток на 1 мм² листовой поверхности уменьшалось на 28%. Еще более значительным оказалось увеличение размеров клеток эпидермиса листьев у растений линии №18, которое составило 64%. При этом число клеток эпидермиса листьев, приходящихся на 1 мм² листовой поверхности, напротив, уменьшалось на 36%. Исходя из этого, можно сделать вывод, что морфологические особенности исследуемых трансгенных растений обусловлены эктопической экспрессией гена *CLV3*. К тому же все анализируемые опытные растения, в отличие от контрольных, характеризовались наличием экспрессии мРНК целевого гена.

Результаты проведенного нами морфологического анализа соотносятся с литературными данными о том, что продукт гена *CLV3* способствует уменьшению количества стволовых клеток в апикальной меристеме побега, что проявляется в снижении числа клеток, приходящихся на один орган. Наши данные также позволяют говорить о существовании взаимосвязи регуляции клеточной пролиферации в апикальной меристеме побега, зачатках листьев и растущих листьях.

Литература

1. Gross-Hardt R., Laux, T. Stem cell regulation in the shoot meristem // Cell Sci. 2003. V. 116. P. 1659-1666.
2. Sharma V.K., Fletcher J.C. Maintenance of shoot and floral meristem cell proliferation and fate // Plant Physiology. 2003. V. 129. P. 31-39.
3. Clark S.E., Running M.P, Meyerowitz E.M. CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis // Development. 1993. V. 1. P. 397-418.
4. Clark S.E., Williams R.W., Meyerowitz E.M. The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis // Cell. 1997. V. 89. P. 575-585.
5. Kayes J.M., Clark S.E. CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis // Development. 1998. V. 125. P. 3843-3851.

6. DeYoung, B.J., Clark S.E. "Signaling through the CLAVATA1 receptor complex // Plant Molecular Biology. 2001. V. 46. P. 505-513.
7. Stone J.M., Trotochaud A.E., Walker J.C., Clark S.E. Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions // Plant Physiol. 1998. V. 117. P. 1217–1225.
8. Fletcher J. Shoot and floral meristem maintenance in Arabidopsis // Annu. Rev. Plant Biol. 2002. V. 53. P. 45–66.

УДК 576.32.36: 582.282.23

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ PMA1 H⁺-АТРАЗЫ ДРОЖЖЕЙ: РОЛЬ ТРАНСМЕМБРАННЫХ СЕГМЕНТОВ M6 И M8

Петров В. В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Г.К. Скрыбина, 142290, Пущино
Московской обл., пр. Науки 5; тел.: +7 496 731 8698; факс: +7 495 956 3370; электронная почта:
vpetrov07@gmail.com

Pma1 H⁺-АТРаза дрожжей – ключевой фермент энергетического обмена, генерирующий электрохимический градиент протонов через плазматическую мембрану и играющий важную роль в поддержании внутриклеточного pH и ионного гомеостаза клетки. Относящийся к семейству P2-АТРаз, он является интегральным мембранным белком и, как и остальные АТРаза, сопрягает энергию гидролиза АТФ с транспортом катионов (H⁺). Трансмембранные сегменты M4, M5, M6 и M8 содержат аминокислотные остатки, образующие сайты, через которые происходит транспорт катионов в H⁺-, Ca²⁺-, K⁺, Na⁺-, H⁺, K⁺- и других P2-АТРазах.

В настоящем исследовании использовали аланин-сканирующий мутагенез для сравнительного изучения структурно-функциональной организации Pma1 H⁺-АТРаза плазматической мембраны дрожжей в мембранных сегментах M6 и M8. Сегмент M6 содержал значительное количество остатков, замена которых на Ala (или Ser) приводила к нарушению функционирования фермента, вызывая полное блокирование его биогенеза и/или потерю активности и в 3 случаях – уменьшение сопряжения фермента. В свою очередь в сегменте M8 замена на Ala только 6 остатков приводила к блокированию биогенеза и/или потере активности, в то время как замена еще 6 остатков вызывала значительное изменение сопряжения фермента – от почти полного разобщения до почти трехкратного сверхсопряжения. Полученные данные позволяют предположить, что, кроме структурной, роль сегмента M6 связана с определением катионной специфичности транспорта, в то время как сегмент M8 регулирует стехиометрию транспорта, а также постулировать наличие у фермента двух сайтов связывания протонов (ионов H₃O⁺), подобно наличию двух сайтов связывания Ca²⁺ в гомологичной Ca²⁺-АТРаза эндоплазматического ретикулюма.

При изучении Pma1 АТРаза использовали штамм дрожжей *S. cerevisiae* SY4, в котором присутствовали хромосомная (*PMA1*) и плазмидная (*pma1*) копии гена, кодирующего Pma1 H⁺-АТРаза [5]. Хромосомная копия гена АТРаза дикого типа находилась под контролем промотора *GAL1* (*P_{GAL}-PMA1*), плазмидная (на центромерной плазмиде YCr2HSE) – под контролем индуцируемого тепловым шоком промотора *HSE* (*P_{HSE}-pma1*); сам плазмидный ген *pma1* был или родительского типа или мутантный. Для введения мутаций в ген *pma1* использовали ПЦР.

Затем ген переносили в плазмиду YCr2HSE, которой трансформировали штамм SY4. Штамм SY4 также содержал температурно-чувствительную мутацию в *SEC6* гене, блокирующую слияние секреторных везикул с плазматической мембраной при тепловом шоке и приводящую к накоплению секреторных везикул. Дрожжи выращивали при 23°C на среде с галактозой до середины логарифмической фазы роста; при этом с хромосомного гена *PMA1* синтезировался фермент дикого типа. Когда клетки переносили на среду с глюкозой, синтез с гена *PMA1* прерывался, при повышении температуры до 37°C синтез фермента начинался с плазмидного гена *pma1* (кодирующего дикий или мутантный тип АТРаза). При этом секреторные везикулы, содержащие фермент, вновь синтезированный с плазмидного гена *pma1*, накапливались в клетке. В качестве контроля на присутствие плазматических мембран, несущих АТРаза дикого типа, синтезированную с хромосомного гена, использовали секреторные везикулы, выделенные из штамма, несущего плазмиду YCr2HSE без гена *pma1*. Секреторные везикулы, практически свободные от примеси плазматических мембран (не более 3-4%), выделяли с помощью дифференциального центрифугирования и центрифугирования в градиенте плотности сахарозы и определяли уровень экспрессии фермента и его активность. Протонный транспорт в секреторные везикулы регистрировали по гашению флуоресценции рН-чувствительного красителя акридинового оранжевого, как описано ранее [2]. Чтобы оценить степень сопряжения гидролиза АТРа с транспортом H⁺, проводили параллельные измерения АТРазной активности и гашения флуоресценции в одинаковых условиях, но при различных концентрациях MgАТРа.

Известно, что остатки Asp, соответствующие Asp-730 Pma1 АТРаза дрожжей *S. cerevisiae*, участвуют в образовании сайтов связывания катионов в Ca²⁺-, K⁺, Na⁺-, H⁺, K⁺- и других P2-АТРазах животных клеток, растений и дрожжей. Были сделаны дополнительные консервативные замены этого остатка на Glu и Asn. Замена Asp-730 на Glu (D730E) существенно увеличивала экспрессию фермента (48% от дикого типа), увеличивая также активность, которая тем не менее оставалась очень низкой (14%). В то же время замена D730N мало меняла ситуацию по сравнению с D730A: экспрессия составляла 8%, а активность отсутствовала. Таким образом, эти данные свидетельствуют об исключительно важной роли Asp-730 в структурно-функциональной организации Pma1 H⁺-АТРаза дрожжей и других ферментов этого типа.

Подобным же образом происходило исследование роли трансмембранного сегмента M8, образуемого 21 аминокислотным остатком (791-MNGIMFLQISLTENWLIFITR). Эти остатки также были последовательно заменены на Ala, мутантные ферменты были экспрессированы в секреторных везикулах, где были изучены уровень их экспрессии, АТРа-гидролазной и H⁺-транслоказной активностей и степень их сопряжения. В отличие от сегмента M6, где мутации приводили к блокированию биогенеза только в 2 случаях, нарушение экспрессии при мутациях в сегменте M8 наблюдалось в 4 случаях (I794A, F796A, Q798A, DI799A), экспрессия которых составляла 1-9 % от уровня фермента дикого типа; еще в двух случаях (L801A и I807A) экспрессия была незначительной (18-19%), а активность практически отсутствовала. У активных мутантов экспрессия составляла от 19 до 94%, а активность варьировала от 15 до 69% уровня дикого типа.

Считается, что при нормальных условиях стехиометрия транспорта H⁺ у H⁺-АТРаза грибов и растений составляет 1 H⁺ на 1 молекулу АТРа, хотя в некоторых случаях (у мутанта гриба *Neurospora crassa*) она может увеличиваться до 2 H⁺/1 АТРа [1]. Существенно отличными от данных, полученных для сегмента M6, оказались также данные о сопряжении гидролиза АТРа мутантными ферментами в M8 и транспорте ими ионов H⁺ (ионов гидроксония H₃O⁺). В 6 случаях замены (M791A, N792A, G793A, M795A, E803A и R811A) приводили к значительному падению сопряжения или почти полному его отсутствию. В то же время в случае замены S800A мутантный фермент при гидролизе молекулы АТРа транспортировал почти в 2 раза больше H⁺, чем фермент дикого типа. Так как остаток Glu-803 также участвует в образовании транспортного сайта в Ca²⁺-АТРаза, а в Na⁺, K⁺-АТРаза на его месте находится Gln, были

сконструированы дополнительные мутации этого остатка с заменами его на Gln, Asp, Asn, а также Arg (E803Q, E803D, E803N, E803R). В случае замены E803D наблюдалось 4-кратное падение экспрессии фермента и практическое отсутствие его активности. Фермент, несущий мутацию E803R, экспрессировался на уровне дикого типа и был неактивен, в то же время ферменты E803Q и E803N экспрессировались на уровне дикого типа и обладали значительной (E803Q – уровня дикого типа) активностью, однако при этом E803N, как и E803A, был практически расслаблен, а E803Q – сверхсопряжен, транспортируя почти три иона гидроксония на одну молекулу АТФ. Таким образом, в 6 случаях наблюдалось значительное падение сопряженности фермента, а в двух (Ser-800 и Glu-803) – сверхсопряжение.

Совместно с трансмембранными сегментами M4 и M5 сегменты M6 и M8 формирует часть Ca^{2+} -связывающих сайтов в Ca^{2+} -АТФазе саркоплазматического ретикулума и других P2-АТФаз, участвуя остатками Thr-799 (сайт I), Asn-796 (сайт II), Asp-800 (оба сайта) в сегменте M6 и остатком Glu-908 (сайт I) в сегменте M8. В Pma1 АТФазе этим остаткам соответствуют Ala-729, Ala-726, Asp-730 и Glu-803. Как показано, роль последних двух остатков, Asp-730 и Glu-803, оказалась чрезвычайно важна. Замены Asp-730 (D730A и D730N) вызывали блокирование биогенеза фермента и только консервативная замена D730E частично восстанавливала биогенез (48% от уровня дикого типа, но фермент обладал очень низкой активностью (15%), не позволявшей продолжить его изучение. В случае Glu-803 ситуация была другой: ни одна из замен не приводила к полному блокированию трафика синтезированных *de novo* мутантных АТФаз, однако эти ферменты оказывались либо неактивными, либо существенно изменяли сопряжение транспорта H^+ и гидролиза АТФ от почти полного разобщения до сверхсопряжения. Замена остатка Ala-726 (A726S), соответствовавшего Asn-796 сайта II Ca^{2+} -АТФазы, приводила к частичному разобщению сопряжения H^+ транспорта и гидролиза АТФ. Таким образом, кроме структурной, присущей обоим трансмембранным сегментам, роль сегмента M6 связана с определением катионной специфичности и селективности транспорта, подобно тому, что найдено для Ca^{2+} , Mn^{2+} -АТФазы дрожжей [3,4] в то время как роль сегмента M8 выражается в регулировании стехиометрии транспорта. Полученные данные позволяют также постулировать, что в отличие от имеющегося представления о том, что в H^+ -АТФазах грибов и растений имеется лишь один сайт связывания протонов (ионов гидроксония H_3O^+), этот фермент так же, как и Ca^{2+} -АТФаза, обладает двумя такими сайтами, один из которых обычно является дормантным и становится активным лишь в результате мутации, как в данном исследовании, или в условиях хронической энергетической недостаточности, также вызванной мутацией, как показано для *N. crassa*, а сам транспортируемый специмен является гидратированным ионом гидроксония подобно гидратированным катионам кальция.

Автор благодарен К. И. Слейман (Yale University School of Medicine, Нью-Хейвен, США), бывшей научным консультантом данной работы, в лаборатории которой проводились эксперименты. Работа частично поддержана грантом РФФИ №12-08-01157-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Warnke J., Slayman C.L. Metabolic modulation of stoichiometry in a proton pump // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 591. №2. P. 224-233.
2. Petrov V. V., Padmanabha K. P., Nakamoto R. K., Allen K. E., Slayman C. W. Functional role of charged residues in the transmembrane segments of the yeast plasma membrane H^+ -ATPase. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. №21. P.15709-15716.
3. Wei Y., Chen J., Rosas G., Tompkins D. A., Holt P. A., Rao R. Phenotypic screening of mutations in Pmr1, the yeast secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, reveals residues critical for ion selectivity and transport. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. №31. P. 23927-23932.

4. Mandal D., Woolf T. B., Rao R. Manganese selectivity of pmr1, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue Gln783 in transmembrane segment 6. Residue Asp778 is essential for cation transport. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. №31. P. 23933-23938.
5. Nakamoto R. K., Rao R., Slayman C. W. Expression of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase in secretory vesicles. A new strategy for directed mutagenesis. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. №12. P. 7940-7949.

УДК 579.262: 579.64:631.46

СОЗДАНИЕ НОВЫХ АССОЦИАТИВНЫХ СИМБИОЗОВ МЕЖДУ СЛАДКИМ ПЕРЦЕМ И РИЗОБИЯМИ, ОБЛАДАЮЩИМИ ФУНГИСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Оркодашвили А. М.¹, Вершинина З. Р.², Нигматуллина Л. Р.², Лутфуллин А. З.²,
Баймиев Ал. Х.²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный университет»

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН

Сладкий перец (*Capsicum annuum* L.) – экономически значимая культура для многих европейских и азиатских государств, обладает высокими пищевыми, технологическими и вкусовыми достоинствами. Популярность сладкого перца постоянно растет; объясняется это тем, что в его плодах содержатся глюкоза, белки, витамины С, Е, Р1, В1, В3, провитамин А и минеральные соли. Основную трудность при выращивании данной культуры, формировании ее высокой продуктивности и качества плодов представляют поражения растений комплексом болезней, вызываемых фитопатогенными грибами [1].

Большинство болезней растений контролируется использованием пестицидов [2]. Однако широкое использование химических веществ в сельском хозяйстве может привести к масштабным экологическим проблемам [3]. Биологическая борьба с болезнями растений является альтернативным методом защиты, в связи с этим проводится интенсивный поиск бактерий, актиномицетов и грибов, способных служить агентами биологического контроля развития болезней [4]. Среди бактерий семейства *Rhizobiaceae* также обнаружены штаммы, способные ингибировать рост грибов [5, 6, 7]. Это связано с такими механизмами защиты как синтез токсичных веществ, например, ризобитоксина и цианида, индукцией системной устойчивости растений и выделением сидерофоров [8,9]. Кроме того, колонизируя корни растений, ризобии препятствуют прикреплению к ним грибных гиф [10].

Несмотря на то, что ризобии известны как природные микросимбионты бобовых растений, они могут выступать в качестве ассоциативных для многих небобовых культур, в том числе и для перца [11]. Однако ассоциативные процессы в природе (в отличие от лабораторной практики) сложно-контролируемы, и в естественных условиях полезные бактерии не выдерживают конкуренции и вытесняются более агрессивными, в том числе и патогенными, бактериями. Задача исследователей состоит в том, чтобы придать растениям способность контролировать микрофлору своей ризосферы, и одним из инструментов для создания устойчивых искусственных ассоциаций ризобий с небобовыми культурами

являются лектины бобовых растений. Накопленные за последние десятилетия данные свидетельствуют о том, что лектины могут связываться с бактериями-симбионтами, в том числе и с ассоциативными, способствуя узнаванию и прикреплению микросимбионта к макросимбионту. Таким образом, трансгенное растение, синтезирующее лектин определенного бобового растения, будет преимущественно колонизироваться только микросимбионтами этого бобового. Использование подобной стратегии дает ключ к конструированию «искусственной ризосферы», специфически колонизируемой только теми микробами, которые выполняют полезные для растений трофические, ростостимулирующие и/или защитные функции.

Альтернативой полной регенерации растений из культуры «бородатых корней» или каллусов является создание «химерных» растений с помощью почвенных бактерий *Agrobacterium rhizogenes*, которые вызывают образование на растениях «бородатых корней». Таким образом можно получить растение, состоящее из нетрансгенной надземной части и трансгенного по гену лектина корня, которое будет удобным модельным объектом для изучения ассоциативных взаимодействий.

Целью данной работы состояла в получении «химерных» растений сладкого перца (*Capsicum annuum* L.) с корнями, экспрессирующими ген лектина гороха, и изучение их колонизации клубеньковыми бактериями гороха *Rhizobium leguminosarum*, обладающими фунгистатической активностью.

Методика

Получение «химерных» растений сладкого перца

Для трансформации растений и получения на них «бородатых корней» использовался штамм *Agrobacterium rhizogenes* A4, трансформированный вектором pCambia 1301 со встроенным в область T-ДНК геном лектина гороха посевного *psl* [12].

Суточные культуры *A. rhizogenes* (pCambia 1301-*psl*) и *A. rhizogenes* (исходный), выращивали при 28°C на шейкере (150 об/мин) в минимальной среде MinA [13], с добавлением 100 мг/л рифампицина и 50 мг/л канамицина. Перед инокуляцией культуру агробактерий центрифугировали (3500 об./мин., 10 мин.) и ресуспендировали в жидкой среде MinA. Плотность суспензии агробактерий была доведена до 10⁸ КОЭ/мл.

Объектом исследований являлся сладкий перец (*Capsicum annuum* L.) сорта «Подарок Молдовы». Для получения композитных растений семена стерилизовали в течение 2 мин в 70% спирте и 15 минут в 15% растворе гипохлорита натрия, а затем проращивали на фильтровальной бумаге, смоченной стерильной водой в чашках Петри. Далее растение выращивали в почве в течение двух недель до появления второй пары листьев.

Для создания «химерных» растений верхняя часть стебля с листьями отрезалась с помощью стерильного скальпеля. Срез ставился в минеральную вату, пропитанную суспензией агробактерий (5 мл на 1 растение), а затем накрывался прозрачным стаканом. На следующий день стакан убирали и давали вате полностью высохнуть, далее растения выращивали, поливая стерильной водой по мере высыхания. Спустя 3 недели отделяли растения от ваты и пересаживали в смесь почвы и песка.

Анализ β-глюкуронидазной (*gus*) активности и ПЦР-анализ ДНК и РНК из «бородатых корней»

По Jefferson [15] проводили гистохимический анализ корней на *gus*-активность. ДНК выделяли фенольно-хлороформным методом. Выделение тотальной РНК и проведение ревертазной реакции осуществляли с использованием наборов TRizolReagents («Invitrogen», США) и GenePakRTCore НПФ («Галарт-Диагностикум», Россия).

Наличие гена лектина *psl* в препаратах ДНК и кДНК проверяли с помощью ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих участок гена лектина, и стандартных наборов в

амплификаторе Терцик МС2 («ДНК-технология», Россия) при оптимальной для каждой пары праймеров температуре отжига.

Оценка антагонистической активности бактерий

В качестве микросимбионтов в полученных симбиотических системах был использован штамм *Rhizobium leguminosarum* 116, выделенный из клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и обладающий фунгистатической активностью. Степень агглютинации данного штамма семенным лектином гороха посевного проверялась согласно методике, описанной в статье [12]. В качестве фитопатогена был выбран штамм *Fusarium oxysporum*, выделенный из корней сладкого перца, пораженных фузариозом. Антагонистическую активность *R. leguminosarum* 116 по отношению к грибу оценивали, используя метод двойной культуры [14].

Совместная инокуляция растений бактериями и грибами

Для инокуляции композитных растений использовали бактерии *R. leguminosarum*, которые наращивали при 28°C в течение суток в жидкой среде УМ до концентрации 10⁷ КОЕ/мл. Далее в течение суток в инокуляте выдерживали корни растений. После чего корни отмывали стерильной водой, растения пересаживали в почву, содержащую 10 мл суспензии спор гриба *F. oxysporum* с концентрацией 10⁵/мл, и выращивали в течение трех суток. Затем корни растений отмывали и окрашивали толуидиновым синим в течение часа. При этом гифы грибов приобретали фиолетовую окраску, а клетки растений – голубую. После отмывания в цитратном буфере корни рассматривали и фотографировали с помощью микроскопа AxioImager M1 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Результаты исследований и их обсуждение

Через 10-12 дней после инокуляции суспензией *A. rhizogenes* «бородатые корни» образовывались у 96% растений. У проростков обработанных *A. rhizogenes* (pCambia 1301-*psl*) *gus*-окрашивающиеся корни были обнаружены в 90% случаев анализа. ПЦР-анализ этих корней показал присутствие гена лектина и на уровне мРНК его конститутивную экспрессию. У контрольных композитных растений (полученных с помощью исходного штамма *A. rhizogenes*) ПЦР и *gus*-окрашивание дали отрицательный результат.

Ранее были получены полностью трансгенные растения табака, а также химерные растения рапса и томатов, экспрессирующие ген лектина гороха [12, 16]. На данных растениях было обнаружено увеличение количества бактерий *R. leguminosarum* 1078 на порядок и более по сравнению с нетрансгенными растениями. Этот факт подтверждал взаимодействие ризобий с лектином на поверхности трансгенных корней. Аналогичные результаты были получены и для штамма *R. leguminosarum* 116. Антагонистическая активность этого микросимбионта по отношению к *F. oxysporum* определялась методом двойной культуры и составила около 70% (рис. 1).

Следовательно, были получены все предпосылки для создания искусственной симбиотической системы, повышающей устойчивость растений сладкого перца к фитопатогену *F. oxysporum*. Для создания искусственной симбиотической системы композитные растения с трансгенными по гену лектина корнями и обычными, инкулировали суспензией штамма *R. leguminosarum* 116 и сажали в почву, содержащую споры гриба *F. oxysporum* а затем выращивали в течение трех суток. Проводили окрашивания корней растений толуидиновым синим и их микроскопический анализ (рис. 2 а - д). В результате проведенных экспериментов было выяснено, что обработка трансгенных по гену *psl* корней штаммом *R. leguminosarum* 116 уменьшает количество гиф патогена *F. oxysporum* в ризосфере сладкого перца (рис. 2 д). Такой же эффект, но в гораздо меньшей степени, наблюдается на корнях контрольных растений, на которых адсорбция *Rhizobium* происходит менее эффективно (рис. 2 в).

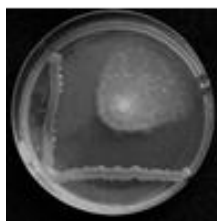


Рис. 1. Ингибирование *R. leguminosarum* 116 роста колоний *F. Oxysporum*

Через неделю после инокуляции *F. oxysporum* преимущественно выживали лишь растения с трансгенной ризосферой, обработанные *R. leguminosarum* 116. Полученные результаты подтверждают, что, использование лектинов бобовых растений в качестве трансгенов позволяет получать искусственные корневые ассоциации с ризобиями у несимбиотрофных растений, таких как сладкий перец, что в сочетании с использованием микроорганизмов с фунгистатической активностью может более эффективно защищать корневую систему растений от патогенов. Данная работа проводилась при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы» (Госконтракт 16.740.11.0671, Соглашение 8115), РФФИ (Соглашения 12-04-31277, 12-04-31284).

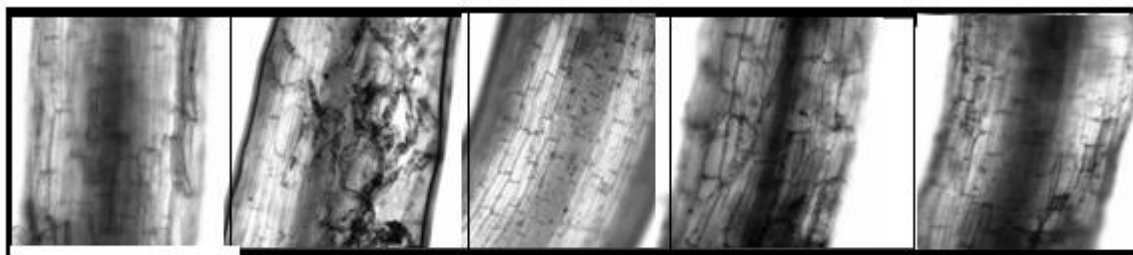


Рис. 2. Заражение растений сладкого перца *F. oxysporum*:

- а – не инокулированные контрольные растения;
- б – контрольные растения + *F. oxysporum*
- в – контрольные растения + *F. oxysporum* + *R. leguminosarum* 116
- г - растения с трансгенными по *psl* корнями + *F. oxysporum*
- д - растения с трансгенными по *psl* корнями + *F. oxysporum* + *R. leguminosarum* 116

Литература

1. Garcí'a-Fraile P., Carro L., Robledo M., Rami' rez-Bahena M.-H., Flores-Fe'lix J.-D. // PLoS ONE. 2012. V. 7. № 5. e38122. doi:10.1371/journal.pone.0038122
2. Попов С. Я., Дорожкина Л. А., Калинин В. А. Основы химической защиты растений / Под ред. профессора С. Я. Попова. М.: Арт-Лион, 2003, 208 с.
3. Белов Д.А. Химические методы и средства защиты растений в лесном хозяйстве и озеленении: Учебное пособие для студентов. –М.: МГУЛ, 2003. – 128 с.
4. Биологические и биорациональные средства защиты растений: Краткий справочник / В. Ф. Кобзарь. - Краснодар, 1995. - 42 с.
5. Ehteshamul-Haque S., Ghaffar A. // J. phytopathology. 1993. V.138. P. 157-163.
6. Chandra S., Choure K., Dubey R.C, Maheshwari D.K. // Braz J Microbiol. 2007. V.38. P.128–130.
7. Arfaoui B., Sifi A., Boudabous I., Hadrami El., Cherif M. // Journal of Plant Pathology. 2006, V. 88. P. 67-75.
8. Antoun H, Beauchamp C.J, Goussard N, Chabot R, Lalande R. // Plant Soil. 1998. V.4. P.57–68
9. Arfaoui A., Sifi B., El-Hassni M., El Hadrami I., Boudabous A., Cherif M. // Plant Pathol. J. 2005. V.4. P. 35–42.

10. Handelsman J., Stabb E. V. //The Plant Cell. 1996. V. 8. P. 1855-1869.
11. Mao W., Lewis J.A., Lumsden R.D., Hebbar K.P. Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants // Crop Protection, Volume 17, Issue 6, August 1998, Pages 535-542
12. Vershinina Z. R., Baymiev An. K., Blagova D. K., Chubukova O. V., Baymiev Al. K., Chemeris A. V. Artificial colonization of non-symbiotic plants roots with the use of lectins // Symbiosis. 2012. V. 56. N.1, P. 25–33.
13. Miller J.H Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab., 1972. 432 p.
14. Whipps J.M. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi // New Phytologist. 1987. V. 107. P. 127–142.
15. Jefferson R. A. Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System // Plant Mol. Biol. Rep. 1987. V. 5. P. 387–405.
16. Вершинина З. Р., Баймиев Ан. Х., Благова Д. К., Князев А. В., Баймиев Ал. Х., Чемерис А. В. Биоинженерия симбиотических систем: создание новых ассоциативных симбиозов с помощью лектинов на примере табака и рапса // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. №3. С. 336-342.

УДК 581.192.2

ЛИШАЙНИКОВЫЕ КИСЛОТЫ КАК ВОЗМОЖНЫЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ МАРКЕР В ЛИХЕНОИНДИКАЦИИ

Саитова З.Р., Фархутдинов Р.Г.

Башкирский государственный университет, г. Уфа

Лишайниковые кислоты – обширная группа органических соединений, содержащихся в лишайниках. Встречаются во многих родах лишайников (*Ramalina*, *Evernia*, *Cladonia*, *Anzia* и др.). Обычно для каждого вида лишайников характерно несколько определённых лишайниковых кислот (Л.к.), что может служить систематическим (таксономическим) признаком. Для химического строения всех лишайниковых кислот характерно наличие двух остатков полизамещённых фенолов или фенолкарбоновых кислот, связанных друг с другом в различных комбинациях.

В состав лишайников входят многие элементы и вещества. Все их можно разделить на две большие группы — первичные и вторичные. К первичным относятся те вещества, которые непосредственно принимают участие в клеточном обмене веществ; из них построено тело лишайников. К вторичным относятся конечные продукты обмена веществ, располагающиеся обычно на стенках гиф. Многие из этих вторичных лишайниковых веществ (в более старой литературе их называли лишайниковыми кислотами) специфичны для лишайников и не встречаются в организмах из других систематических групп.

Первичные вещества в лишайниках в общем те же, что и в других растениях. Оболочки гиф в лишайниковом слоевище составлены в основном углеводами. Часто обнаруживается в гифах хитин ($C_{30}H_{50}N_4O_{19}$). Характерной составной частью гиф является полисахарид лишенин ($C_6H_{10}O_5$)_n, называемый лишайниковым крахмалом. Реже встречающийся изомер лишенина — изолишенин — найден, кроме оболочек гиф, в

протопласте. Из высокомолекулярных полисахаридов в лишайниках, в частности в оболочках гиф, встречаются гемицеллюлозы, являющиеся, очевидно, резервными углеводами. В довольно большом количестве (3—5% от воздушно-сухой массы) встречаются низкомолекулярные углеводы — дисахариды (сахароза, α -трегалоза, умбилицин), полиспирты (эритрит, D-маннит, волемит, сифулит). В межклеточных пространствах у некоторых лишайников обнаружены пектиновые вещества, которые, впитывая в большом количестве воду, набухают и ослизняют слоевище. В лишайниках встречаются также многие ферменты — инвертаза, амилаза, каталаза, уреазы, зимаза, лихеназа, в том числе и внеклеточные. Из азотсодержащих веществ в гифах лишайников обнаружены многие аминокислоты — аланин, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, лизин, валин, тирозин, триптофан и др. Фикобионт продуцирует в лишайниках витамины, но почти всегда в малых количествах.

К структурному типу депсидов относятся антибиотики сферородин, леканоровая (I), анациевая, рамалиноловая и др. кислоты. Простейший представитель Л. к. структурного типа депсидонов — антибиотик физодовая кислота (II). К структурному типу дибензофурана относится широко распространённая в лишайниках усниновая кислота (III) — эффективный антибиотик, используемый при лечении кожных заболеваний и столбняка. Все эти типы Л. к. биосинтезируются целиком из остатков уксусной кислоты; большинство из них активно против микобактерий. К четвёртому структурному типу лишайниковых кислот (1,4-дифенилбутана) относятся ядовитые вульпиновая, хризопетраровая и лепрариновая кислоты, а также эпанорин и ризокарповая кислота, содержащие остатки аминокислот лейцина и тирозина.

Лишайники обладают удивительной способностью извлекать из окружающей среды и накапливать в своем слоевище различные элементы, в том числе и радиоактивные. В США после испытаний атомного оружия в умбиликарии (*Umbilicaria mammulata*) был обнаружен радиоактивный цезий в количестве, губительном для высших растений. В лишайниках накапливается намного больше цинка, кадмия, олова и свинца, чем в мхах и цветковых растениях.

У некоторых лишайников, особенно растущих на камнях и скалах, накапливаются соли железа, придающие слоевищу ржаво-красный цвет (например, у ризокарпона — *Rhizocarpon oederi*). У многих видов в слоевище накапливается щавелевокислый кальций (CaC_2O_4), иногда в очень большом количестве. Например, у аспидии съедобной (*Aspicilia esculenta*) он составляет до 66% от сухой массы. Биологическое значение этого вещества в слоевище лишайников неизвестно.

Вторичные лишайниковые вещества представляют большую группу органических соединений, относящихся к разным биосинтетическим группам. Сейчас их известно уже около 250, и каждый год химики обнаруживают еще 3 – 4 новых.

Из этого числа примерно 75 являются специфическими лишайниковыми веществами, т. е. встречаются только в лишайниках, остальные содержатся и в других организмах, особенно в грибах.

Количество вторичных лишайниковых веществ в слоевищах лишайников колеблется в довольно широких пределах, обычно их бывает 0,1 – 2% от воздушно-сухой массы, реже до 2–5%. Так, например, атранорин содержится в пределах 1,2 – 3%, фумарпротоцетрариевая кислота – 0,5 – 1,5%, гирофоровая кислота – 1 – 4%, салациновая кислота 4 – 6%, усниновая кислота – 0,2 – 4,0 % и т.д. В некоторых исключительных случаях концентрация лишайниковых веществ в слоевище может быть очень высокой. Так, например, в пармелии окрашенной (*Parmelia tinctorum*) леканоровой кислоты содержится 36% от сухой массы.

Что касается генезиса лишайниковых веществ, то об этом известно еще очень мало. Ясно одно — эти вещества образуются микобиотом лишайника в симбиозе с фикобиотом, т. е. углеводы, синтезированные фикобиотом, превращаются в лишайниковые вещества

микобионтом. Сам по себе гриб, выделенный из слоевища лишайника, почти никогда специфического лишайникового вещества не образует.

Несмотря на тщательное, в течение почти ста лет, изучение лишайниковых веществ, даже в настоящее время мы еще очень мало знаем об их биологическом значении. На этот счет имеется несколько объяснений, но большинство из них носит гипотетический характер.

Существует мнение, что вторичные вещества защищают лишайники от поедания животными. В то же время известно, что многие кустистые лишайники, содержащие горькие вещества, хорошо поедают животные — северные олени, карибу, улитки, пауки и др.

Но лишайники весьма резистентны в отношении бактерий. Против них лишайниковые вещества выполняют, несомненно, защитную функцию.

Многие исследователи считают лишайниковые вещества резервом дополнительного питания, но экспериментальные данные этого не подтверждают — при ухудшении условий питания количество лишайниковых веществ в слоевище не уменьшается.

Иногда лишайниковые вещества рассматриваются как отходы обмена веществ, что также является сомнительным. Для этого они слишком многообразны в химическом отношении и появляются в одинаковой химической форме у систематически и экологически очень далеких видов.

Большинство лишайников очень медленно растет, что резко снижает их способность конкурировать с другими организмами за пространство и другие условия существования. По-видимому, лишайниковые вещества являются одним из видов «оружия» в суровой борьбе за существование. Установлено, что лишайниковые вещества подавляют рост грибов и мхов (последние чаще всего являются конкурентами лишайников) и всхожесть семян цветковых растений.

Некоторые авторы считают, что биологическое значение лишайниковых веществ может заключаться в защите гиф от чрезмерного смачивания водой и обеспечении внутренней атмосферы для фотосинтеза. Но и это предположение не нашло фактического подтверждения. Более вероятно, что окрашенные лишайниковые вещества (пигменты) действуют как светофильтры, защищающие фикобионт от чрезмерной радиации. Установлено, что некоторые лишайники в более освещенных местообитаниях всегда содержат больше пигментов (например, париетина).

Некоторые экспериментальные данные показывают, что лишайниковые вещества способствуют передвижению углеводов, синтезируемых фикобионтом, в гифы микобионта. В этом может заключаться одна из важных функций лишайниковых веществ.

Лишайниковые вещества имеют большое значение в систематике лишайников: определенные виды, группы видов или роды содержат определенные вещества. При распознавании видов многих родов, особенно морфологически близких, необходимо аналитически определять лишайниковые вещества. Для этого разработана методика микрокристаллизации веществ: под влиянием определенных реактивов образуются специфические для каждого вещества кристаллы, которые затем изучают под микроскопом и определяют по эталонам или фотоснимкам. Среди лишайников имеется группа видов, у которых в разных частях ареала разный состав лишайниковых веществ, поэтому в последнее время в таксономии лишайников возникло особое направление — хемотаксономия (химическая таксономия).

Некоторые лишенологи считают химические вариации морфологически единого вида самостоятельными видами, другие же называют их просто химическими расами одного и того же вида.

Интересные данные получены в последнее время в отношении функционального значения атранорина — вещества, содержащегося во многих лишайниках. Установлено, что оно чаще и в большем количестве встречается у тенелюбивых и теневыносливых видов. Атранорин, генерируя коротковолновый свет, повышает эффективность фотосинтеза в

фикобионте. Нами в ходе экспедиционного исследования лишенобиоты южного предуралья. Атранорин содержится у вида *Parmelia sulcata* L. который встречается во всех 7 районах исследования (Ишимбайский, Мелеузовский, Стерлибашевский, Миякинский, Альшеевский, Аургазинский, Гафурийский, г. Стерилитамак).

Основным критерием определения состояния атмосферного воздуха на территории данных районов являлся учет выбросов загрязняющих веществ от стационарных (все действующие предприятия) и передвижных (автотранспорт) источников. По веществам, выбрасываемым в атмосферу предприятиями, лидирует сернистый ангидрид - 69,6%, углеводороды предельные - 9,3%, аммиак - 6,8% от всех выбросов.

Первичный мониторинг показал, что изменения агрохимических свойств почв предуральской степной и горно-лесной зон республики обусловлены прежде всего выносом питательных веществ из почв сельскохозяйственными культурами, применением удобрений и техногенными выбросами.

Таким образом, если нам удастся установить изменчивость в данных в содержании лшайниковых кислот связанную с колебаниями экологических параметров, то можно будет говорить о наличии более «динамичного» показателя в лишеноиндикации.

Литература

1. Sokolov, D. N.; Luzina, O. A.; Salakhutdinov, N. F. Usnic acid: preparation, structure, properties and chemical transformations. Russian Chemical Reviews 2012, 81, 747–768.
2. Solomina, O.N., Ivanov, M.N and Bradwell, T., 2010: Lichenometric studies on moraines in the Polar Urals. *Geogr. Ann.*, 92 A (1): 81–99.
3. Михайлова В.А., Саитова З.Р., Фархутдинов Р.Г. Особенности видового состава лишенобиоты Башкортостана. Вестник Башкирского университета. 2013. Т. 18. № 2. С. 392-394.

УДК 57091:632.938:581.19

ON POSSIBLE APPLICATIONS OF THE ELLIPTIC OSCILLATOR MODEL IN A BIOCHEMICAL PROCESS

Yamaleeva A.A., Usachev S.A., Yamaleev O.A.*

Bashkir State University (Ufa),
*Russian Centre of Forest Protection (SPb)

The oscillator model is one of basic models of classical and quantum physics. The oscillator model is widely used in different branches of physics, chemistry and technology. It is worth mentioning that in the last decade evidence of oscillator motion has been discovered in different forms of biological systems.

For example, receptors in the cell membrane undergo a special kind of oscillation. The activation of membrane lectins is a complex periodic process which serves as a regulator [5].

In this article, we suggest that the cell membrane and the membranes surrounding the organelles which transfer impulses of the signal systems, such as the Ca^{++} -canal, NO-system, the NADH-system and others, are activated by a process analogous to the process of the elliptic oscillator.

Oscillator motion serves as one of the basic factors that generates DNA replication in the nuclear membrane. Supposedly, biological oscillator belong to the class of elliptic oscillators

The concept of elliptic oscillators has been proposed Yamaleev R.M. [1],[2] in relation to the problem of oscillator-like models in Nambu mechanics [3]. In the development of oscillatory self-sustained behaviour in a nonequilibrium Nambu system, this features the exchange between different kinetic and potential energy forms[4]. In particular, the elliptic oscillator (named "The Yamaleev Oscillator") in a canonical-dissipative framework has been studied. The bifurcation diagram of the nonequilibrium elliptic oscillator was derived, and different bifurcation routes that lead to limit cycle dynamics and involve pitchfork and Hopf bifurcations were discussed. Futhermore, an analytical expression for the probability density of the stochastic nonequilibrium oscillator was derived, and it was shown that the shape of the density function is consistent with the oscillator properties in the deterministic case.

Mongkolsakulvong *et al.*[4] demonstrated that the elementary biochemical reactions defined by mass-action kinetics satisfy a particular Nambu structure. For this purpose, the biochemical reaction equations in terms of Nambu brackets and certain w-factors have been expressed. The w-factors account for the fact that mass-action kinetics exhibits in general flow fields with finite divergence. The proposed approach by means of Nambu brackets and w-factors unifies divergence-free flow fields of classical dynamics and flow fields with finite divergence of mass-action kinetics.

The evolution of chemical and biochemical reactions are typically formulated in terms of dynamic systems [3]. As an example, we may consider a chemical reaction of two molecules A and B producing a molecule C : $A + B \rightleftharpoons C$, where, as indicated, we are dealing with a reversible reaction such that both forward and reverse reactions are possible. In general, we consider a single (reversible) reaction that involves $L + R$ molecules (macromolecules, biomolecules, or species). We have L components that react together in order to produce another R components such that



Note that we consider only elementary reactions for which stoichiometric coefficients are either unity or zero [3]. In Eq. 1 the parameters $k_1 > 0$ and $k_2 \geq 0$ denote the reaction rates for the forward and reverse reactions, respectively. In the special case $k_2 = 0$, we are dealing with a nonreversible reaction. Let a_i and b_j denote the concentrations of the molecules A_i and B_j , respectively. From the law of mass action, it follows that the reaction kinetics reads [3]

$$\frac{d}{dt}a_i = k_2 \prod_{j=1}^R b_j - k_1 \prod_{m=1}^L a_m, \quad \frac{d}{dt}b_j = k_1 \prod_{i=1}^L a_i - k_2 \prod_{m=1}^R b_m \quad (2)$$

with $i = 1, \dots, L$ and $j = 1, \dots, R$. For example, the reaction $A + B \rightleftharpoons C$ yields

$$\frac{d}{dt}a = -k_1 ab + k_2 c, \quad \frac{d}{dt}b = -k_1 ab + k_2 c, \quad \frac{d}{dt}c = k_1 ab - k_2 c, \quad (3)$$

where a , b , and c denote the concentrations of molecules A , B , and C .

As a step towards developing the broader scope of dissipative, nonequilibrium systems, including limit cycle oscillators, let us focus on the generalization of the harmonic oscillator suggested in [1], [2]. The elliptic oscillator is an important Nambu system because (as opposed to Nambu rotator systems) the elliptic oscillator involves a generalization restoring force [4]. Moreover, the oscillator yields certain insights into oscillations subjected to anharmonic potential forces and for appropriately chosen initial conditions the oscillator describes solutions of the relativistic harmonic oscillator.

The elliptic oscillator is defined on a three-dimensional state that is spanned by one spatial

coordinate x and two kinetical variables v_1 and v_2 that might be regarded to as generalized velocities. The oscillator dynamics is given by the following equation:

$$\frac{d}{dt} r = \nabla H_1(r) \times \nabla H_2(r), \quad (4)$$

where H_1 and H_2 are Hamilton-like functions defined

$$H_1 = \frac{v_1^2 + ax^2}{2} \quad (5)$$

and

$$H_2 = \frac{v_2^2 + ax^2}{2} \quad (6)$$

with $a > 0$. Note that in what follows we use nabla operator $\nabla = (\partial/\partial x, \partial/\partial v_1, \partial/\partial v_2)$. From equation (4) it follows that the oscillator equations in components are given by

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} x &= v_1 v_2, \\ \frac{d}{dt} v_1 &= -axv_2, \\ \frac{d}{dt} v_2 &= -axv_1. \end{aligned} \quad (7)$$

A key property of the oscillator dynamics (7) and of any Nambu system in general is that the Hamiltonian functions are invariants of the dynamics. That is, from equation (4) it follows that H_1 and H_2 as functions of time are constants. For graphical illustration purposes it is useful to introduce re-scaled variables: $u_1 = v_1/\sqrt{a}$ and $u_2 = v_2/\sqrt{a}$. Substituting this variables into the Hamiltonian functions (5) and (6), we obtain

$$H_1 = \frac{a}{2}(u_1^2 + x^2) \quad (8)$$

and

$$H_2 = \frac{a}{2}(u_2^2 + x^2). \quad (9)$$

References

1. Yamaleev R.M. Generalized Lorentz-force equations. Ann.Phys. N.Y. 292,157- 178 (2001)
2. Yamaleev R.M. Generalized Newtonian equations of motion. Ann.Phys. N.Y. 277, 1-18 (2001)
3. Nambu Y. Generalized Hamiltonian dynamics. Phys. Rev. D7, 2405-2412 (1973)
4. Mongkolsakulvong S., Chaikhan P., Frank T.D. Oscillatory nonequilibrium Nambu systems: the canonical-dissipative Yamaleev Oscillator. Eur.Phys. J.B (2012) 85-90
5. Yamaleeva A.A. Plants lectins and their biological function. ISBN 978-5-7501-1152-7. Ufa, ed. Konarev V.G., 203 p., 2001
6. Ямалеева А.А., Сахибгареев А.А., Ямалеев А.М. Геномный анализ иммунитета и фитозащита. ISBN 978-5-9613-0256-1. Уфа, КП РБ изд. «Мир печати» 256 с., 2013

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 615.322

БИОГЕННЫЕ ФТАЛАТЫ В РАСТЕНИЯХ – ПОКАЗАТЕЛЬ АКТИВНОСТИ ЭНДОФИТОВ

Баширова Р.М., Данилова Е. Д., Грицаенко Д. И.*, Галкин Е. Г.,
Кудашкина Н. В*.

ФГБОУ ВПО Башкирский государственный университет,
*ФГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет

В последние годы объектом пристального внимания экологов стали производные бензолдикарбоновой (БДК) или фталевой кислоты. С начала XXI века их стали относить к эндокринным дизрупторам. Как правило, наличие фталатов в растительных продуктах рассматривается как результат антропогенного загрязнения окружающей среды.

Вместе с тем, фталаты обнаруживались в эфирных маслах многих растений еще в доиндустриальную эпоху [1]. По существу открытие репеллентных свойств эфиромасличных растений послужило в начале XX века толчком для органического синтеза таких популярных инсектицидов, как диэтилфталат и дибутилфталат. Известно, что они широко распространены в лекарственных и пряно-ароматических растениях. Так, из листьев *Aloe vera* Linn.[2], из корней *Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf, используемого в китайской и вьетнамской медицине в качестве тонизирующего средства, выделен бис-(2-этилгексил)-фталат (ВЕНР). Разнообразен спектр фталатов в эфирном масле листьев пряно-ароматического растения, широко используемого в кулинарии, базилика *Ocimum basilicum*: диэтилфталат (2,07%), бутил-гексилфталат (0,62%); дибутилфталат; бифенил-4,4-бензолдикарбоновая кислота [3].

Учитывая изложенное, нами проведено изучение содержания фталатов в четырех представителях башкирской флоры – бубенчике лилиелистом *Adenophora lilifolia* (сем. *Campanulaceae*), курильском чае *Pentaphylloides fruticosa* (s. *Dasiphora fruticosa* сем. *Rosaceae*), плодах *Vitis labrusca* (сем. *Vitaceae*) и листьях *Archangelica officinalis* (сем. *Ariaceae*), используемых в пищу.

Корни и листья бубенчиков используют как источник антиоксидантов в лечебно-профилактическом питании народов Юго-Восточной Азии. Отвар корней бубенчика применяют как тонизирующее и общеукрепляющее средство при функциональных расстройствах центральной нервной системы, как антисклеротическое средство. Представители рода *Adenophora* официнальны в большинстве азиатских стран и представляют интерес как средства для лечения диабета, гриппа и гепатита С [4]. Листья и цветки *P. fruticosa* используют в лечебно-профилактическом питании лиц, страдающих гепатитами вирусной и токсической этиологии, диабетом, желудочно-кишечными и гинекологическими заболеваниями [5].

Проведены исследования эфирного масла и спиртового экстракта корней бубенчика, отобранных в фазу бутонизации, и облиственных побегов *P. fruticosa*, отобранных в фазу цветения. Места отбора проб изучаемых растений находились в экологически чистой зоне, удаленной от потенциальных антропогенных источников загрязнения окружающей среды фталатами.

В работе использовали хромато-масс-спектрометр Termo Finnigan– хроматограф – Finnigan 800, масс-спектрометр высокого разрешения MAT-95XP ЭВМ “Delta” с системой обработки данных “Data Sistem” содержащей библиотеку (Database “NIST02”) в количестве 250 000 масс-спектров.

Идентификацию проводили по полным масс-спектрам “Data Sistem” Идентифицировано 18 соединений, у которых, индексы сходства библиотечных и зарегистрированных спектров составляли не ниже 80%.

В эфирном масле бубенчика обнаружено более 20% фталатов. В спиртовом экстракте содержится 1,02% диизобутилфталата, 0,63% дибутилфталата, 2,26% диизооктилфталата.

В спиртовом экстракте курильского чая обнаружено 0,1% диэтилфталата, 0,24% диизопропилфталата, 0,37% дибутилфталата, 33,72% бис(2-этилгексил) фталата, что в сумме составляет 34,4%.

В спиртовом экстракте плодов *V. labrusca* обнаружен гептил- октиловый эфир фталевой кислоты. Из листьев и корней *A. officinalis* выделены бис(2-этилгексил)фталат, бис(н-октил)фталат и бис(н-бутил)фталат.

Наличие фталатов в растениях, популярных при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта (гастритов, панкреатита и пр.) свидетельствует, по-видимому, о безопасности их при воздействии на низком уровне. Более того, есть основания полагать, что именно фталаты обуславливают терапевтические эффекты указанных растений при ряде гинекологических заболеваний.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что производные бензолдикарбоновой кислоты являются нормальными ингредиентами растений, продуцируемыми их эндофитами. Производные БДК синтезируются в основном эндофитными грибами и стрептомицетами из продуктов распада целлюлозы и лигнина.

Изученные спиртовые экстракты растений представляет смесь продуктов метаболизма растения-хозяина и его эндосимбионтов. Как известно, эндофиты повышают устойчивость растения-хозяина неблагоприятным факторам окружающей среды, в том числе и к биотическим. Судя по данным литературы, инокуляция растений бактериями рода *Pseudomonas* и *Azospirillum* или же грибами рода *Glomus* приводит к повышению общей массы и площади корней и к повышению концентрации диэтилфталата в корнях [6]. Показано, что инокуляция корневой системы казуарины хвощевидной *Casuarina equisetifolia* L. азотфиксирующими симбионтами эндофитами *Frankia* Brunchorst активизировала биосинтез производных фталевой кислоты [7].

Обитающие в ризосфере и эндофитные *Streptomyces* sp. защищают растения, синтезируя фталаты, обладающие репеллентной, ларвицидной и инсектицидной активностью. Так фталаты *Lantana camara* являются эффективными ларвицидами по отношению к личинкам переносчика желтой лихорадки *Aedes aegypti* и *Culex quinquefasciatus*, переносящего вирусы лихорадки Западного Нила и энцефалита Сент-Луиса [8].

Производные фталевой кислоты из корней риса *Oryza sativa* L. и гречихи *Fagopyrum esculentum* выступают в роли аллелопатических агентов, ингибирующих рост корней *Echinochloa crusgalli* и прорастание семян *Lactuca sativa* L., *Amaranthus lividus* L., *Digitaria sanguinalis* (L.), *Echinochloa crusgalli* L., китайской капусты и редиса [9,10].

В лимонах, апельсинах и мандаринах, колонизированных эндофитами *Pantoea agglomerans* содержание бис этилгексилфталата составляет $29,9 \cdot 10^{-4}$ %, а диизобутилфталата $62,0 \cdot 10^{-4}$ % [11].

Таким образом, наличие производных БДК в растениях обуславливает необходимость разработки специальных эколого-гигиенических регламентов по отношению к традиционным растительным или лекарственным продуктам, к таким, например, инжир или плоды цитрусовых.

Для снижения давления алармистов на экологов, необходимо создавать базу данных растительных продуктов, содержащих биогенные фталаты, с указанием среднего содержания их в экологически чистых продуктах.

Литература

1. Parry E.J. The Chemistry of essential oils and artificial perfumes // Monographs on essential oils, London. 552 p. 1922
2. Lee, K. H., Kim, J. H., Lim, D. S. and Kim, C. H. 2000. Antileukaemic and anti-mutagenic effects of Di-(2-ethylhexyl) phthalate isolated from *Aloe vera* Linn.// J. Pharm. Pharmacol. 2000 N52, p.593-598.
3. Dev N., Das A. K., Rahman M. A. Chemical Compositions of Different Extracts of *Ocimum basilicum* Leaves // J. Sci. Res. 2011. (1), p. 197-206
4. Баширова Р.М., Грицаенко Д.И., Кудашкина Н.В., Тимербаева Г.Р., Зимин Ю.С. Бубенчик *Adenophora lilifolia* (L.) A. DC как источник пектина// Вестник ОГУ, 2009, №6. с.67-69
5. Данилова Е.Д., Долотовский И.М., Баширова Р.М., Борисова Н.С. Фитохимическое сравнение интродуцированных сортов курильского чая *Pentaphylloides fruticosus* (L.) O. Schwarz в Республике Башкортостан// Вопросы биол., мед. и фарм. химии. 2012. №7. с. 54-55
6. Walker V., Couillerot O., Von Felten A. et al. Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions// Plant and Soil. 2012. V. 356, №1-2, pp 151-163
7. Santhi S. et al. Profiling metabolites in different day cultures of a root endophyte, *Frankia Brunchorst* from *Casuarina equisetifolia* L. using GC-MS-MS// European J. of Experimental Biology, 2012, 2 (3):p.539-542
8. Kumar S. M., Maneemegalai S. Evaluation of Larvicidal Effect of *Lantana Camara* Linn Against Mosquito Species *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* // Advances in Biological Research. 2008. №2. p. 39-43
9. Rimando A.M., Olofsdotter M., Dayan F.E. Duke S.O. Searching for Rice allelo-chemicals: an example of bioassay-guided isolation// Agronomy J. 2001. V.91. p.16-20
10. Earn S. H., Kim M. J., Kang W. H., Rim Y. S., Yu C. Y. Bioassay of Allelochemical in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench)// The proceeding of the 8th ISB 2001, p.57-62
11. Di Bella G, Saitta M, Pellegrino M, Salvo F, Dugo G. Contamination of Italian citrus essential oils: presence of phthalate esters// J. Agric Food Chem. 1999;47. №3. p.1009-1012

УДК 57.022

РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА КЛЕТОК РАСТЯЖЕНИЕМ В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ НАЗЕМНЫХ РАСТЕНИЙ К УСЛОВИЯМ ОБИТАНИЯ

Веселов Д.С.¹, Веселов С.Ю.²

¹ Институт Биологии УНЦ РАН

² Башкирский государственный университет, БашГУ

Изменение скорости роста – одна из наиболее важных реакций, обеспечивающих приспособление растений к условиям обитания. Поддержание роста листьев обеспечивает формирование фотоассимилирующей поверхности, а изменение скорости их роста играет важную роль при адаптации к засухе [1-2]. Важность процессов, обеспечивающих ростовую

реакцию растений на изменение условий обитания, определяет интерес к изучению механизмов, лежащих в их основе.

Гормоны действуют как на деление, так и растяжение клеток, из которых складывается рост растений. Было показано, что при изменении внешних условий рост растяжением меняется раньше, чем скорость деления клеток [3]. Обнаружено, что длительное и кратковременное действие осмотического стресса оказывает противоположное действие на способность клеток листьев к растяжению: при длительном действии дефицита воды она снижается, а при кратковременном – возрастает [4]. Адаптивное значение снижения способности клеток листа к растяжению при длительном действии дефицита воды очевидно: именно эта реакция обеспечивает уменьшение размера листьев и экономию воды [5]. Не менее важна реакция растений на непродолжительное действие дефицита воды.

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СКОРОСТЬ РОСТА КЛЕТОК РАСТЯЖЕНИЕМ

Зависимость скорости роста растяжением от осмотического потенциала клеток

Движение воды в клетки, как известно, происходит по градиенту водного потенциала [6]. Более высокое содержание осмотически активных соединений в клетке поддерживает градиент водного потенциала между ней и окружающей средой и тем самым обуславливает приток воды в клетку [7]. Концентрация осмотиков в клетках возрастает на фоне засухи и засоления [8], что очевидно необходимо для поддержания притока воды в клетки. Значение этого процесса для поддержания роста при длительном действии засухи широко обсуждается [8; 9]. Однако лишь недавно было показано, что накопление осмотически активных веществ может начинаться быстрее, чем это предполагалось ранее, т.е. после часа действия засоления [10-11]. Хотя этот процесс запаздывает по сравнению с быстрым возобновлением роста на засолении в этих условиях, тем не менее, осмотическое приспособление может способствовать дальнейшему поддержанию роста.

Физико-химические свойства клеточной стенки

Совершенно очевидно, что способность к росту определяется свойствами самой клетки (ее клеточной стенки). На это указывает хотя бы тот факт, что не все клетки способны к росту растяжением. Способность к пластичным (необратимым) изменениям размера – свойство молодых, способных к росту клеток. Растяжение клеточной стенки связано с присутствием в ней микрофибрилл целлюлозы, погруженных в аморфный матрикс из гемицеллюлозы и пектина [12]. В результате их скольжения относительно друг друга клеточная стенка раздвигается под действием тургора и ее поверхность увеличивается. Таким образом, способность клетки к растяжению зависит от химической структуры ее клеточной стенки. Способность к растяжению клеточной стенки молодых клеток может меняться. Их разрыхление или, наоборот, увеличение жесткости связано с физико-химическими модификациями.

В последнее время большое внимание уделяется белкам экспансином [13]. Они были обнаружены при изучении способности к растяжению мертвой растительной ткани [14]. Оказалось, что растяжение такой ткани под влиянием внешнего тянущего усилия возможно в кислой среде в присутствии белкового экстракта из клеточной стенки. Белок был очищен и назван экспансином. Позднее было идентифицировано целое семейство генов экспансинов из тканей разных видов растений [15]. Оказалось, что некоторые из них экспрессируются лишь в клетках зоны растяжения, что указывает на их важную роль в регуляции роста. Попытка обнаружить гидролитическую активность экспансинов закончилась неудачей, но вместо гидролитической активности была обнаружена способность экспансинов разрывать водородные связи между микрофибриллами клеточной стенки [16].

Таким образом, активность определенных компонентов клеточной стенки обеспечивает ее разрыхление и снижает жесткость, облегчая процесс растяжения.

Необратимость деформации обеспечивается образованием новых связей между микрофибриллами. В совокупности эти процессы составляют рост растяжением.

Гидравлическая проводимость тканей растений как фактор, влияющий на рост растяжением клеток многоклеточного организма

В предыдущих разделах мы рассматривали факторы, от которых зависит скорость увеличения размеров отдельных клеток. Рост растяжением клеток многоклеточного организма наряду с перечисленными выше факторами зависит также от того сопротивления потоку воды, которое оказывают ткани растения на пути воды из питательного раствора к растущим клеткам. Способность ткани пропускать воду характеризуется гидравлической проводимостью: величиной, обратной гидравлическому сопротивлению. Существует два способа передвижения воды по растению – это либо межклетники (апопластный путь), либо от клетки к клетке [17]. Эти два пути взаимодействуют друг с другом. Так вода поступает в ксилему через обкладочные клетки [18]. Из клетки в клетку вода может двигаться по плазмодесмам (симпластный путь) или последовательно проходя через мембраны отдельных клеток (трансклеточный путь). Апопластный путь по первичным стенкам и межклетникам отличается низким сопротивлением току воды. У разных видов растений может доминировать один из двух путей [19]. Так у транспирирующих растений *Zea mays* преобладает апопластный путь [20], а у растений *Hordeum vulgare* – трансклеточный [21].

Поскольку основной движущей силой для потока воды по апопласту является градиент гидростатического давления, возникающий в растении в результате транспирации, у транспирирующих растений апопластный путь используется в большей степени [22]. При снижении скорости транспирации, которое происходит, например, при стрессе, возрастает роль трансклеточного пути для воды, который поддерживается за счет осмотического градиента [23]. Как уже упоминалось выше, апопластный путь в основном имеет более высокую гидравлическую проводимость и поэтому суммарная проводимость тканей выше у транспирирующих растений. Таким образом, гидравлическая проводимость тканей растений зависит от внешних условий, которые влияют на скорость транспирации.

На проницаемость мембран для воды влияет активность и количество водных каналов аквапоринов [24]. Открытые сравнительно недавно аквапорины стали одним из наиболее популярных объектов молекулярной биологии растений. Количество аквапоринов зависит от уровня экспрессии соответствующих генов, которых насчитывают, например, у растений *Zea mays* около 30 [25]. Показано, что повышение уровня экспрессии вакуолярных аквапоринов сопровождалось ускорением роста клеток растяжением [26]. Было высказано предположение, что рост клеток корня растяжением зависит от синтеза аквапоринов, формирующих дополнительные водные каналы, в результате чего облегчается поступление воды в растягивающиеся клетки, необходимое для усиления тургора и вакуолизации [27].

Заключение

Таким образом, растения удивительно быстро реагируют на воздействия, нарушающие водный обмен и рост клеток растяжением. Их реакция направлена на восстановление оводненности тканей и поддержание роста растяжением, но механизм может быть неодинаковым при разных воздействиях. Быстрый запуск процессов, обеспечивающих поддержание роста листьев растяжением в изменяющихся внешних условиях, является важной адаптивной реакцией, направленной на формирование фотоассимилирующей поверхности и обеспечение жизнеспособности растений.

Литература

1. Quarrie S.A., Stojanovic J., Pekic S. Improving drought resistance in small-grained cereals: A case study, progress and prospects // *Plant Growth Regul.* 1999. V. 29. P. 1-21.

2. Tardieu F., Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress // *Geosci.* 2005. V. 337. P. 57–67.
3. Granier C., Tardieu F. Leaf expansion and cell division are affected by reducing absorbed light before but not after the decline in cell division rate in the sunflower leaf // *Plant Cell Environ.* 1999. V. 22. P. 1365-1376.
4. Acevedo E., Hsiao T.C., Henderson D.W. Immediate and subsequent growth responses of maize leaves to changes in water status // *Plant Physiol.* 1971. V. 48. P. 631-636.
5. Bacon M.A. The biochemical control of leaf expansion during drought // *Plant Growth Regul.* 1999. V. 29. P. 101–112.
6. Boyer J.S. Cell wall biosynthesis and the molecular mechanism of plant enlargement // *Func Plant Biol.* 2009. V. 36. P. 383–394.
7. Cosgrove D.J. Water uptake by growing cells: an assessment of the controlling roles of water relaxation, solute uptake, and hydraulic conductance // *J Plant Sci.* 1993. V. 154. P. 10-21.
8. Serraj R., Sinclair T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? // *Plant Cell Environ.* 2002. V. 25. P. 333–341.
9. Zhang J., Nguyen H.T., Blum A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants // *J Exp Bot.* V. 1999. 50. P. 291–302.
10. Ахиярова Г.Р., Сабиржанова И.Б., Веселов Д.С., Фрике В. Быстрая реакция растений пшеницы на засоление // *Физиология растений.* 2005. Т. 52. С. 891-896.
11. Fricke W., Akhiyarova G., Wei W., Alexandersson E., Miller A., Kjellbom P. O., Richardson A., Wojciechowski T., Schreiber L., Veselov D., Kudoyarova G., Volkov V. The short-term growth response to salt of the developing barley leaf // *J Exp Bot.* 2006. V. 57. P. 1079 –1095.
12. Cosgrove D.G. Expansive growth of plant cell walls // *Plant Physiol Biochem.* 2000. V. 38. P. 109–124.
13. Muller B., Bourdais G., Reidy B., Bencivenn C., Massonneau A., Condamine P., Rolland G., Conejero G., Rogowsky P., Tardieu F. Association of specific expansins with growth in maize leaves is maintained under environmental, genetic, and developmental sources of variation // *Plant Physiol.* 2007. V. 143. P. 278–290.
14. McQueen-Mason S., Durachko D.M., Cosgrove D.J. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants // *Plant Cell.* 1992. V. 4. P. 1425–1433.
15. Shcherban T.Y., Shi J., Durachko D.M., Gultinan M.J., McQueen-Mason S., Shieh M., Cosgrove D.J. Molecular cloning and sequence analysis of expansins - A highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995. V. 92. P. 9245–9249.
16. McQueen-Mason S., Cosgrove D.J. Disruption of hydrogen bonding between wall polymers by proteins that induce plant wall extension // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994. V. 91. P. 6574–6578.
17. Steudle E., Peterson C.A. How Does Water Get Through Roots? // *J Exp Bot.* 1998. V. 49. P. 775-788.
18. Kaldenhoff R, Carbo M.R., Sans J.F., Lovisolo C., Heckwolf M., Uehlein N. Aquaporins and plant water balance // *Plant Cell Environ.* 2008. V. 31. P. 658-666.
19. Bramley H., Turner N.C., Turner D.W., Tyerman S.D. Comparison between gradient-dependent hydraulic conductivities of root using the root pressure probe: the role of pressure propagation and implication for the relative roles of parallel radial pathways // *Plant Cell Environ.* 2007. V. 30. P. 861-874.
20. Hose E., Steudle E., Hartung W. Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a root cell- and pressure probe study // *Planta.* 2000. V. 211. P. 874-882.
21. Steudle E., Jescke WD. Water transport in barley roots // *Planta.* 1983. V. 177. P. 281-295.
22. Steudle E. Water uptake by roots: effects of water deficit // *J Exp Bot.* V 2000. 51. P. 1531-1542.

23. Aroca R., Ferrante A., Vernieri P., Chispeels M. J. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants // Ann Bot. 2006. V. 98. P. 1301–1310.
24. Gomes D., Agasse A., Thiebaud P., Delrot S., Geros H., Chaumont F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms // Biochim Biophys Acta. 2009. V. 1788. P. 1213–1228.
25. Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M.J., Jung R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 1206–1215.
26. Okubo-Kurihara E., Sano T., Higaki T., Kutsuna N., Hasezawa S. Acceleration of vacuolar regeneration and cell growth by overexpression of an aquaporin NtTIP1; in tobacco BY-2 cells // Plant Cell Physiol. 2009. V. 50. P. 151–160.
27. Обручева Н.В., Синькевич И.А. Аквапорины и рост клеток // Физиология растений. 2010. Т.57. № 2. С. 163-176.

УДК 581.1

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕФТЕШЛАМОВОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ФИТОРЕМЕДИАНТА *TAGETES ERECTA* L.

Григориади А.С., Гареева А.Р., Лопатин Н.В.

Башкирский государственный университет, г.Уфа

Проблема утилизации и рекультивации нефтешламowych амбаров особо остро стоит в районах нефтедобычи и нефтепереработки. В качестве завершающего этапа рекультивации целесообразно использовать растения-фиторемедианты. Растения, самостоятельно и совместно с микроорганизмами, способны аккумулировать и трансформировать различные поллютанты, в том числе нефтяные углеводороды [1-3]. В настоящее время предлагается большой выбор растений, устойчивых к загрязнению, однако для достижения максимальной эффективности от применения методов фиторекультивации необходимо учитывать климатическую зону, где планируется проведение восстановительных работ, а также тип загрязнения (хронической или залповое, качественный состав нефтяных углеводородов).

Целью данного исследования явилось изучение влияния хронического нефтешламowego загрязнения на физиолого-биохимические параметры растения *Tagetes erecta* L. Устойчивость растения к действию нефти и обоснование выбора вида фиторемедианта были показано ранее [4], однако не проводилось исследований влияния на растения хронической формы загрязнения нефтяными углеводородами.

Объектом изучения служили растения *Tagetes erecta* L., произрастающие на грунте ликвидированного нефтешламowego амбара, расположенного на территории республики Башкортостан. В предыдущий сезон на территории амбар проводился технический этап рекультивации. Опыты проводились на участках 1×1 м в 3-кратной повторности. Степень загрязнения составляла от 0,3 до 6% масс. Бархатцы высаживались в загрязненную почву в фазе появления первых настоящих листьев. В качестве контроля использовали незагрязненную почву, засеянную растениями. Влияние нефтяного загрязнения на растения оценивали по содержанию пигментов в листьях [5, 6]. Отбор проб проводили через 30 и 60

сут с момента высадки растений в загрязненных грунт. Спектральные характеристики экстрактов пигментов регистрировали на спектрофотометре UV 2401 Shimadzu. Статистическую обработку проводили с помощью пакета компьютерных программ Statistica V 6.0 и Microsoft Office 2000.

Анализ пигментов исследуемых растений показал, что наименьшее воздействие на физиолого-биохимические показатели растений оказывает концентрация поллютанта 0,3%, в течении всего эксперимента физиологические показатели *Tagetes erecta* отклонялись от контрольного варианта незначительно. Существенные изменения содержания фотосинтетических пигментов в листьях бархатцев произошли при концентрации поллютанта в грунте нефтешламового амбара 1–6%. Через 30 суток после высадки растений в грунт содержание хлорофилла а и b повысилось примерно в 2 раза. Хотя отношение хлорофиллов а/в существенно не отличалось от контрольного значения (рис. 1).

На 60 сутки после начала эксперимента наблюдалось увеличение концентрации хлорофилла а для проб с содержанием поллютанта 1–3% масс. Наибольшее отклонение от контроля отмечено в пробе 3%, значения превышали контроль на 75%. Следует отметить, что не отмечалось существенного влияния нефтяных углеводородов на соотношение хлорофилла а/ b для проб с загрязнением 1%-3%, что говорит о нормальном протекании процессов фотосинтеза [7].

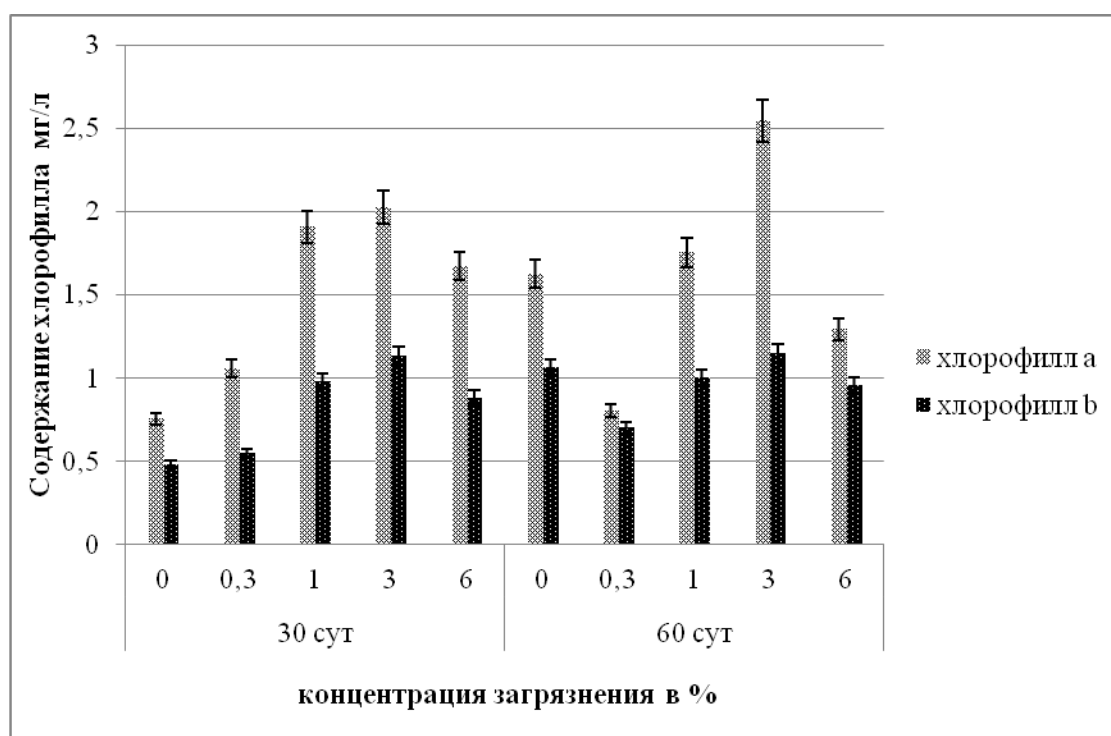


Рис. 1. Изменение концентрации хлорофилла а и b через 30 и 60 суток после высадки растений *Tagetes erecta* в загрязненный грунт.

Для растений *Tagetes erecta*, высаженных на почве нефтешламового амбара, было характерно увеличение содержания каротиноидов. Известно, что каротиноиды, в частности лютеин, выполняют функцию защиты фотосинтетического аппарата от повреждения [8].

Концентрация каротиноидов также возрастала в пробах с загрязнением 1–6%, причем наибольшие отклонения от нормы были характерны для пробы с загрязнением 3% (рис. 2).

Загрязнение почвы нефтешламом в концентрациях 1–3% в течении всего периода исследований, вызывало увеличение содержания фотосинтетических пигментов до 50%, что говорит об активизации процессов фотосинтеза и, соответственно, устойчивости растений к

действию углеводов, содержащихся в грунте рекультивируемого амбара.

Так как основной ролью растений в процессе фиторекультивации является стимулирование процессов разложения загрязнителя в почве, то в исследовании непременно проводилась оценка степени загрязненности грунта. Скорость деструкции нефтяных углеводов изменялась в зависимости от начальной концентрации загрязнителя. Так в течение первых 30 суток эксперимента деструкция нефтяных углеводов составила 38% для почвы с начальным загрязнением 1%, 23% для почвы с загрязнением 3%, 20% для почвы с начальным загрязнением 6%. Спустя 60 суток после высадки растений фиторемедиантов деградация нефтепродуктов составляла для участка с концентрацией загрязнителя 3 и 6% - 27 и 25 % соответственно. Однако после окончания эксперимента произошло вторичное загрязнение исследуемых участков, в результате поднятия загрязнителя с нижних слоев амбара, и контрольный забор проб через 90 суток не дал достоверных результатов.

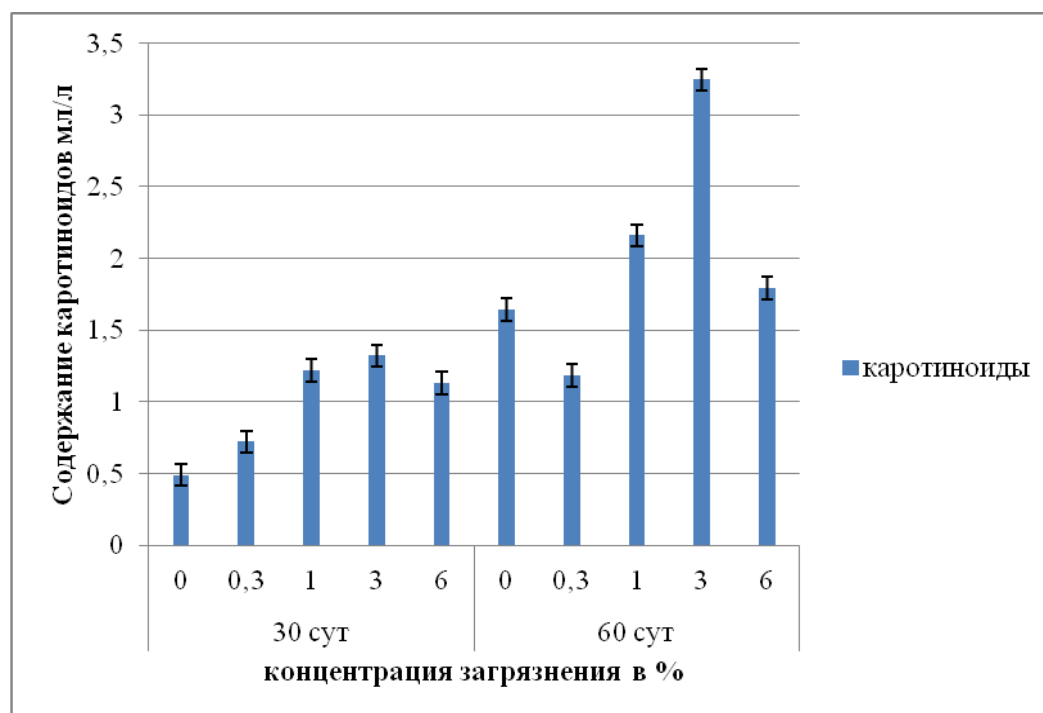


Рис. 2. Изменение содержания каротиноидов через 30 и 60 суток после высадки растений *Tagetes erecta* в загрязненный грунт.

Таким образом, в результате проведенных исследований была выявлена устойчивость фотосинтетического аппарата *Tagetes erecta* L., произрастающего на территории нефтешламового амбара в условиях хронического загрязнения. При загрязнении до 6% (максимальная выбранная концентрация загрязнителя, соответствующая предлетальной дозе) наблюдалось увеличение содержания пигментов. Основные изменения были связаны с относительным увеличением хлорофилла *b* и каротиноидов. В тоже время, под посевами бархатцев снижалось содержание нефтяных углеводов, что свидетельствует об актуальности их применения в качестве фиторемедиантов.

Литература

1. Турковская О.В., Муратова А.Ю. Биодegradация органических загрязнителей в корневой зоне растений // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями. - М: Наука, 2005. - С. 180-208.

2. Meagher R.B. Phytoremediation of toxic elements and organic pollutants // Curr. Opin. Plant Biol. - 2000. - V.3. - P.153-162.
3. Peer W.A., Baxter I.R., Richards E.L., Freeman J.L., Murphy A.S. Phytoremediation and hyperaccumulator plants // Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification. - Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. - P. 299-340.
4. Киреева Н.А., Григориади А.С., Баширова Р.М., Амирова А.Р. Использование бархатцев прямостоячих *Tagetes erecta* L. для фиторемедиации почвы, загрязненной нефтяными углеводородами // Агрехимия. - 2012. - № 5. - С. 66-72.
5. Шлык А.А. Определение хлорофилла и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. О.А. Павлиновой -М.: Наука, 1971. - С. 154-170.
6. Jeffrey S.W., Humphrey G.R. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton // Biochem. Physiol. Pflanzen Bd. - 1975. - V. 167. - P. 191-194.
7. Баширова Р.М., Григориади А.С.; Киреева Н.А., Борисова Н. С., Зимин Ю. С. Устойчивость дягиля лекарственного к загрязнению почвы сырой нефтью // Физиология растений. - 2012. - Т. 59. - №5. - С. 710-715.
8. Мокроносков А.Т., Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Фотосинтез. Физиолого-биохимические аспекты. - М.: Издательский центр «Академия», 2006. - 448с.

УДК 581.557.24

ИНТЕНСИВНОСТЬ МИКОРИЗООБРАЗОВАНИЯ ПЯТИЛИСТНИКА КУСТАРНИКОВОГО *PENTAPHYLLOIDES FRUTICOSA* (L.) O.SCHWARZ

Данилова Е. Д., Долотовский И. М. *, Баширова Р. М.

Башкирский Государственный университет, г.Уфа
*ЗАО «НПП Академпром», г. Москва

Последние годы внимание аграриев привлекают эндофитные (ЭГ) грибы, способствующие поглощению, таких эссенциальных элементов, как фосфор, цинк, медь, железо, кобальт и марганец [1]. Использование симбионтов нередко является альтернативой внесению больших количеств удобрений, в первую очередь фосфорных. ЭГ стимулируют иммунную систему растения либо путем непосредственного синтеза антибиотиков, либо за счет индукции синтеза защитных соединений растением-хозяином [2, 3, 4]. ЭГ могут повышать выход вторичных метаболитов при культивировании лекарственных растений [5]. В частности показано, что продуктивность различных сортов тимьяна, базилика и мяты возрастала при инокуляции их *Glomus mosseae*, *G. fasciculatum*, *G. microcarpum* [6,7].

Целью проведенных исследований было изучение влияния различных агротехнических приемов и плодородия почвы на уровень микоризации корней пятилистника кустарникового *Pentaphylloides fruticosa* (L.) O. Schwarz (=Dasiphora) аборигенной формы и сорта 'Gold finger'.

В каждом варианте по 6 трехлетних растений. Растения были размещены на трех участках с различным уровнем содержания доступных элементов питания в почве.

В эксперименте оценивали также влияние на уровень микоризации растений угольного дренажа. Предполагалось, что древесный уголь, обладающий высокой ионообменной активностью, абсорбирует соединения ингибирующие развитие спор ЭГ. Активированный уголь вносили в момент пересадки отчеренкованных растений в дозе 50 г слоем 2 см на дно лунки.

Оценку интенсивности микоризообразования на фрагментах корней *P. fruticosa* проводили по методике J.M. Phillips, D.S. Nayman [8]. Определяли следующие параметры: встречаемость микоризной инфекции в корневой системе (F,%); интенсивность микоризной инфекции в корневой системе (M,%); интенсивность микоризной инфекции в микоризованных фрагментах корней (m, %); обилие арбускул во всей корневой системе (A,%); обилие арбускул в микоризованных фрагментах корней (a,%); обилие везикул во всей корневой системе (B, %); обилие везикул в микоризованных фрагментах корней (b, %).

Результаты и обсуждение

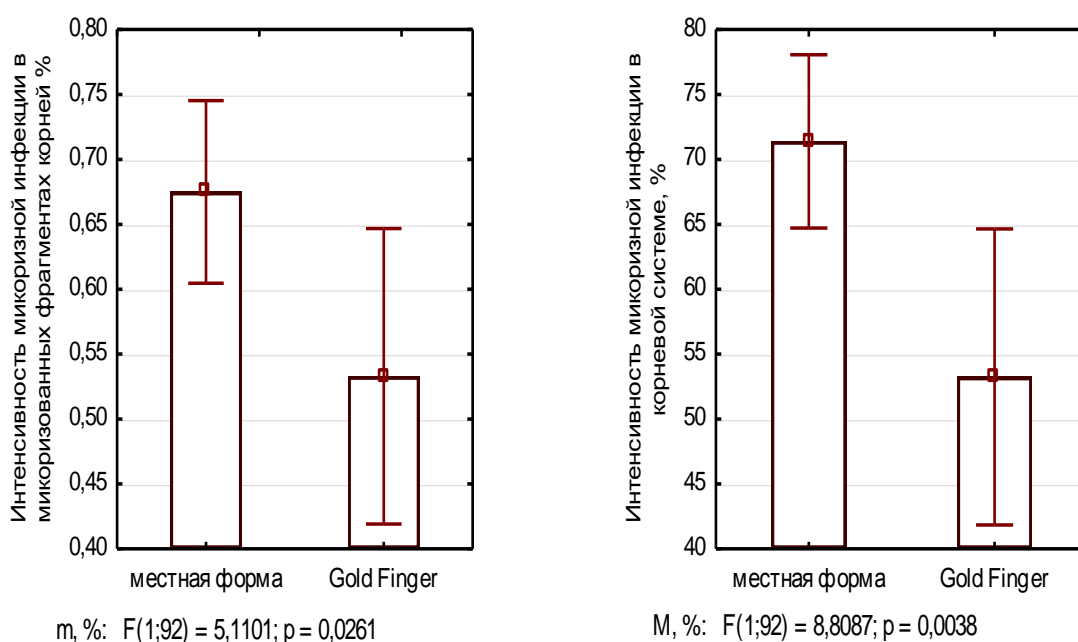


Рис.1 Интенсивность микоризной инфекции в *P. fruticosa* местной формы и сорта 'Gold finger'.

Из рис. 1 следует, что интенсивность развития микоризной инфекции в корневой системе аборигенных растений выше, чем у сорта 'Gold finger' ($p < 0,05$).

Согласно данным ряда авторов дикорастущие популяции растений генетически более вариабельны по активности симбиоза с микроорганизмами, чем сорта и соответственно обладают большим потенциалом к образованию микоризы, чем культурные растения [9, 10].

Влияние дренажа из активированного древесного угля на активность микоризообразования было изучено на местной популяции *P. fruticosa*.

При этом увеличивается обилие арбускул в микоризованных фрагментах корней. Отметим, что арбускулы, обеспечивающие максимальную площадь контакта между грибом и цитоплазмой клетки хозяина, играют ключевую роль в транспорте фосфатов током цитоплазмы по гифам из почвы в растение [2, 11, 12, 13, 14, 15]. Различий в обилии в корневой системе везикул, функционирующих как запасающие структуры и как выживающие пропагулы, не обнаружили.

Положительное влияние внесения активированного угля в почву, существенно улучшающего ее физические и биологические свойства в результате снижения удельной плотности и увеличения влагоёмкости отмечается в ряде работ и других авторов [16].

Улучшение воздушного режима почвы приводило к активизации симбиотических отношений в корневой системе растений [17].

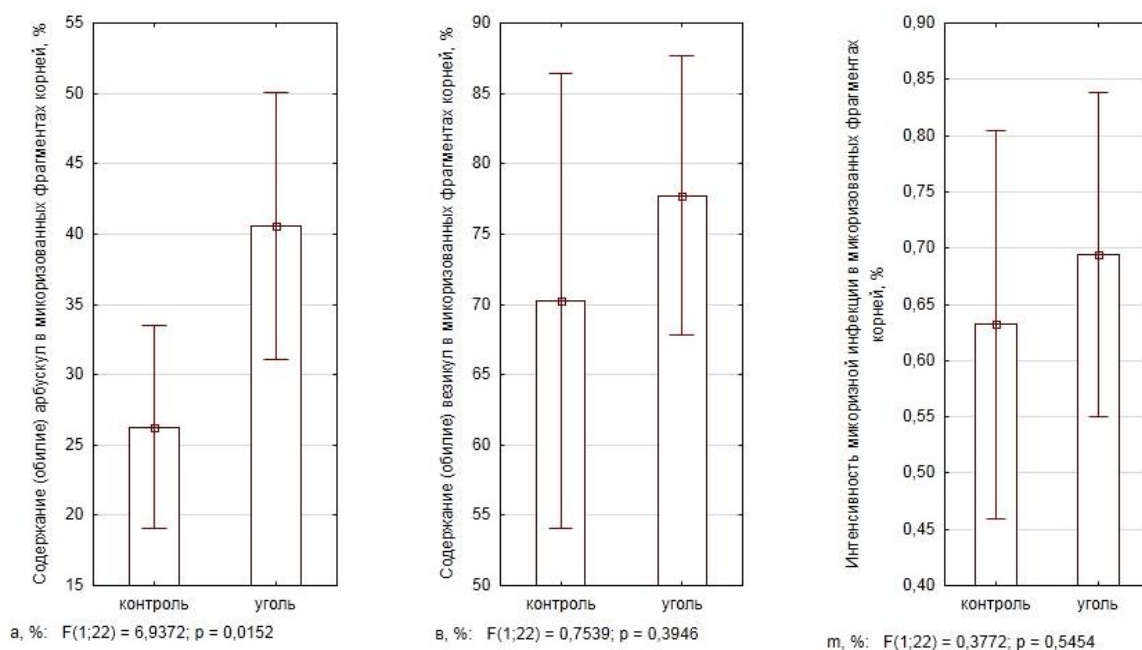


Рис. 2. Параметры микоризообразования *P. fruticosa* при воздействии дренажа из активированного угля.

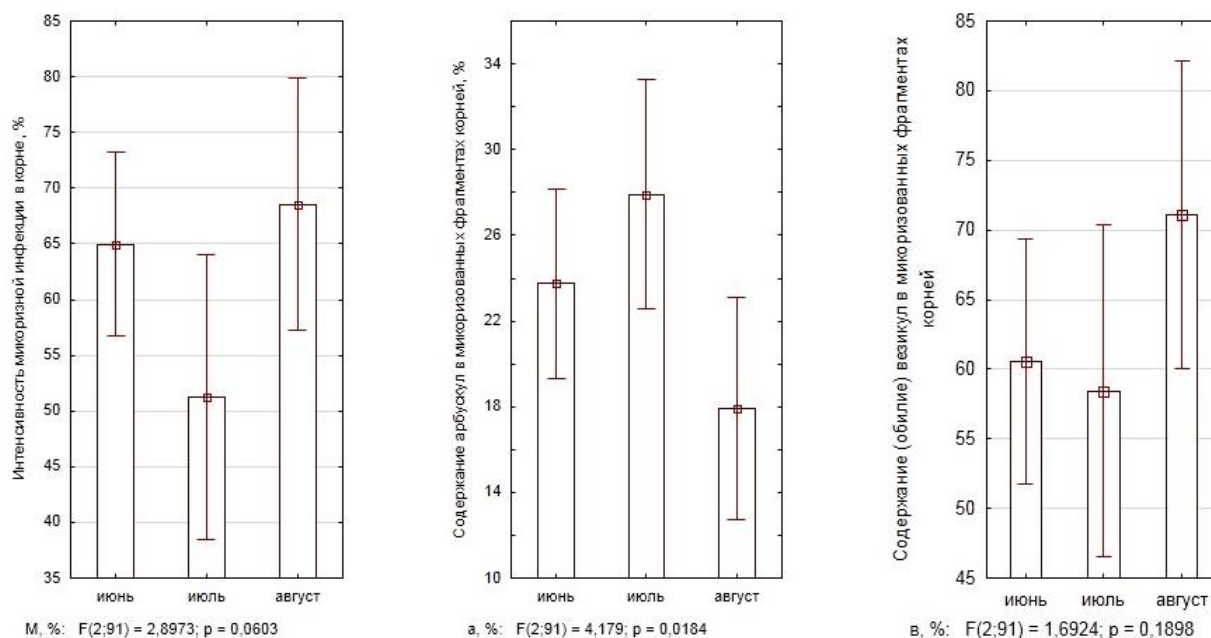


Рис. 3. Сезонная динамика микоризообразования *P. fruticosa*

Максимальное содержание арбускул в корнях *P. fruticosa* отмечается в период минимального количества осадков — в июле месяце. Содержание арбускул в микоризованных фрагментах корней в июле ($27,9 \pm 2,62$) выше, чем в августе ($17,9 \pm 2,54$).

Таким образом, наиболее адекватным показателем активности микосимбионтов является количество арбускул в корнях, обилие которых возрастает при дефиците влаги и фосфора. Данный показатель достоверно различался в 75 % случаев сравнения.

Аналогичные результаты были получены американскими исследователями при выращивании *Dasiphora fruticosa* на почвах с различным уровнем содержания фосфора: при дефиците фосфора корневая система более активно колонизировалась микосимбионтами и в дальнейшем саженцы легче переносили пересадку [18]. Эксперименты на культуре декоративной формы ‘Gold Drop’ по внесению в контейнер коммерческого препарата «Endorize-Mix» (Agrauxine, Франция), представляющего смесь спор *Glomus mosseae*, *G. intraradices* и ряда других *G. spp.* также показали рост концентрации фосфора в растении *P. fruticosa* [19].

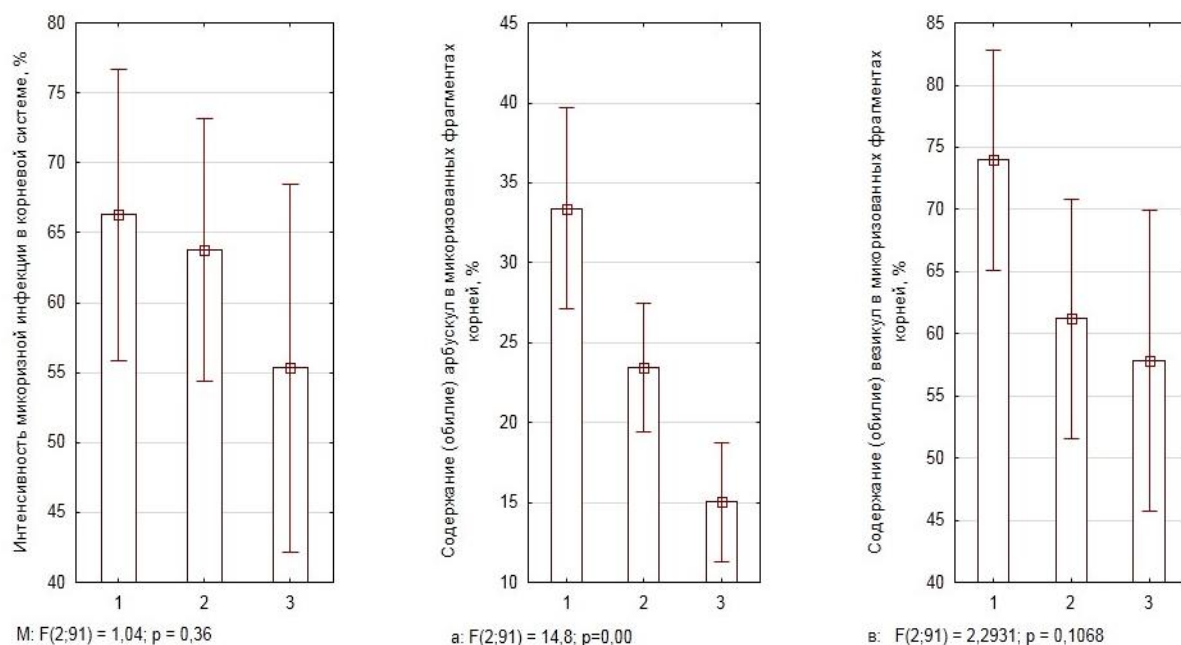


Рис. 4. Показатели микоризообразования растений опытных участков

Учитывая трудоемкость определения обилия микоризных структур в корневой системе считаем целесообразным в дальнейшем ориентироваться на анализ обилия арбускул в корнях микоризованных растений *P. fruticosa*, наиболее адекватно отражающих реакцию растения на стресс.

Исследования показали возможность направленной регуляции микоризообразования *P. fruticosa* путем проведения различных агротехнических мероприятий, в частности внесения активированного угля в почву.

Литература

1. Tinker P. B. // Plant and soil.—1984. — vol. 76. — P. 77-91.
2. Marsh J. F., Schultze M. //New Phytol. — 2001. —V. 150. — P. 525-532.
3. Richter J. Analytische Untersuchungen zum Einfluss der Mykorrhizierung auf Ertrag, Inhaltsstoffzusammensetzung und Pathogentoleranz von Heil- und Gewürzpflanzen,— Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Trophologie (Dr. troph.) — 2007. — s.170.
4. Abdel-Fattah G. M., Siabana Y. M. //Z. Pflanzenkrankheiten Pflanzen-schutz. —2002— 109. —S. 207-215.
5. Camprubi A., Estaun V., Calvet C. et al. //Symbiosis.- 1990.- 9- p. 305-308.
6. Gupta M. L.; Khaliq, A.; Pandey R. et al. // J. of Herbs, Spices and Medicinal Plants. -2000.- 7.- p. 57-63.
7. Gupta M. L.; Prasad, A.; Ram, M.; et al. // Bioresource Technology. -2002.-81. - p. 77-79.

8. Phillips J. M., Hayman D. S. //Transactions of the British Mycological Society. -1970.- 55.- p.157-160.
9. Provorov N.A., Simarov B.V. //Plant Breeding. – 1990. – V.105. – P. 300-310.
10. Martenson A., Rydberg I. // Swedish J. Agric. Res. – 1994. – V.24. – P. 13-19.
11. Jakobsen I. Transport of phosphorus and carbon in arbuscular mycorrhiza// Mycorrhiza: structure, function, molecular biology, and biotechnology. 2nd ed. – Berlin: Springer, 1999. – P. 305-332.
12. Rausch C., Bucher M. // Planta. – 2002. – V.216. – P. 23–37.
13. Rausch C., Daram P., Brunner S. et al. // Nature. —2001. —V.414, N22. – P. 462-466, www.nature.com.
14. Hahn M., Mendgen K. // Current Opinion in Plant Biology. – 2001. – V.4. – P. 322–327.
15. Harrison M.J., Dewbre G.R., Liu J. // The Plant Cell. – 2002. – V.14. – P. 2413-2429.
16. Bi Y.L., Li X.L., Christie P. et al.// Chemosphere.—2003—50. — с. 863–869.
17. Klimek A., Rolbiecki S., Rolbiecki R. et al.//Pol. J. Environ. Stud. — 2011—Vol. 20. — No. 5. — P.1211-1219.
18. Meikle Tim W., Amaranthus M. /Native Plants J.—2008—Vol. 9— N. 2.—p. 107-116
19. Matysiak B., Falkowski G.//J. of Fruit and Ornamental Plant Research. 2010. Vol. 18(2) p. 321-333

УДК 581.143.6

ОСОБЕННОСТИ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *ARNICA MONTANA* L.

Зарипова А.А., Манчу Я.В., ¹ Фархутдинов Р.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад-институт
Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия

¹ ФГБОУ ВПО «Башкирский ГУ», г. Уфа, Россия, e-mail: frg2@mail.ru

Вследствие интенсивного и нерегулируемого сбора сырья в больших масштабах запасы истощаются, поэтому так остро стоит проблема рационального использования и сохранения биоразнообразия растительного мира. На Южном Урале интродукционная работа с арникой горной не ведется, не разработан зональный ассортимент, поэтому арника горная практически не используется в озеленении. В этой связи актуально изучение биологических особенностей вида в условиях региона с целью отбора наиболее перспективных для широкой культуры.

Целью работы была отработка приемов культивирования *in vitro* арники горной для получения устойчивой профилирующей культуры и определения потенциальных возможностей для массового размножения.

Введению эксплантов в культуру *in vitro* предшествует стерилизация растительного материала. Эффективность стерилизующего агента оценивается по степени освобождения от инфекции и по токсичности для эксплантов. Применяемые стерилизаторы по-разному влияли на жизнеспособность и последующие развитие эксплантов. Стерилизация семян арники горной в смеси 3 % - ной перекиси водорода и 70 % - ного спирта снижает их жизнеспособность по сравнению с эксплантами, стерилизованными 0,1 % - ным диацидом и 0,02 % - ным нитратом серебра.

Семена, обработанные перекисью водорода и спиртом, вначале развивались более интенсивно, чем в варианте с использованием ртутисодержащего раствора (диацидом),

однако уже через 2 месяца выявилось преимущество действия диацида. При использовании нитрата серебра повысилась как жизнеспособность эксплантов, так и последующих побегов.

Использование следующей комбинации стерилизующих растворов для обработки семян арники горной введение в культуру *in vitro*: 70 % этилового спирта и 0,01 % диацида позволило достичь 67,8 % жизнеспособных эксплантов и высокого проявления морфогенеза.

Влияние минерального состава питательной среды на жизнеспособность эксплантов в культуре *in vitro*. На начальных этапах культивирования эксплантов арники нами были испытаны среды Мурасиге-Скуга, Уайта и Хеллера. Реакция эксплантов на изменение минерального состава питательной среды была слабо выраженной. Темпы роста и развития проростков при культивировании их на испытанных средах были практически одинаковыми. При дальнейшем культивировании наблюдалась тенденция более высокой выживаемости растений на средах с невысокой общей концентрацией солей по прописи Уайта и Хеллера, а также $\frac{1}{2}$ МС, по сравнению с выживаемостью эксплантов на среде МС.

Наиболее высокие показатели выживаемости и темпов развития эксплантов отмечены на среде Мурасиге-Скуга с половинной концентрацией минеральных солей.

С целью выявления морфогенетических потенций в культуре *in vitro* арники горной изучалась побегообразующая способность эксплантов.

Для проращивания семян использованы агаровая безгормональная питательная среда, содержащая минеральные соли по прописи Мурасиге и Скуга (МС), а также питательная среда дополнена витаминами и регуляторами роста БАП – 1 мг/л, ИУК – 0,5 мг/л [1]. Отмечено, что питательная среда содержащая гормоны приводит к утолщению гипокотилия, увеличению длины ассимиляционного побега, числа листьев и их размеров, интенсивному корнеобразованию. Для всех растений, которые культивировали на питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной регуляторами роста использовали в дальнейшем для размножения побегов, т.е. для процесса мультипликации.

Микроклонирование растений основано на особенности цитокининов снимать апикальное доминирование и вызывать адвентивное побегообразование. Использование данного подхода позволяет значительно увеличить коэффициент размножения, сохраняя при этом признаки исходного генотипа.

Через 3 недели после начала эксперимента проростки делили на верхушечную часть, семядольный узел, гипокотиль, корень, которые субкультивировали на модифицированной среде MS, содержащий 0,5 мг/л БАП в течении 30 дней. Лучшие результаты в процессе мультипликации показали гипокотиль и семядольный узел. Для изучения способности эксплантов к побегообразованию испытаны 12 вариантов питательной среды MS, содержащие различные комбинации и концентрации гормональных факторов, таких как БАП, кинетин, ИУК, НУК. Полученные данные свидетельствуют, что более активную пролиферацию побегов арники вызвано сочетанием гормонов БАП (0,5 мг/л) + ИУК (0,2 мг/л), БАП (0,2 мг/л) + ИУК (0,1 мг/л).

Одним из важнейших и неотъемлемых компонентов питательной среды являются регуляторы роста. Их тщательный подбор и выявление оптимальных концентраций позволяют повысить эффективность метода клонального микроразмножения арники уклоняющегося *in vitro*.

Добавление в питательную среду регуляторов роста выявило различные типы морфогенеза эксплантов. На контрольной безгормональной среде морфогенетических изменений у эксплантов не наблюдалось. Добавление в среду лишь БАП (0,1–0,5 мг/л) приводило к слабой индукции роста побегов. При высоких концентрациях БАП (1,0–5,0 мг/л) в среде развитие побегов происходило с аномалиями. При добавлении небольших количеств (0,01–0,05 мг/л) ИУК и НУК в питательную среду заметных изменений в развитии эксплантов не наблюдали. Увеличение концентрации ауксинов ИУК и НУК (2,0–4,0 мг/л) вызывало каллусообразование.

Для многих видов растений было установлено увеличение регенерационного потенциала при культивировании на средах, сочетающих ауксины и цитокинины. Поэтому на основе среды MS изучали влияние различных концентраций и стимуляторов роста на клональное микроразмножение арники. Испытывали 42 варианта питательных сред. Оптимальной для побегообразования оказалась среда, содержащая БАП в концентрации 2,5 мг/л и ИУК в концентрации 0,1 мг/л. Увеличение концентрации БАП и ИУК действует угнетающе на процесс индукции побегов.

При перенесении таких эксплантов в стандартные условия (световой день 16 ч, температура 26 °С) происходил активный рост дополнительных побегов из заложившихся почек. В результате культивирования получали конгломераты, состоящие из нескольких побегов и почек. Средний коэффициент размножения микропобегов равнялся 7.

Формирование дополнительных почек и образование побегов происходило путем развития пазушных меристем. *In vitro* боковые почки закладывались в пазухах листьев. Комплекс факторов при культивировании на искусственных питательных средах позволил индуцировать морфогенез, не характерный для арники горной в природных условиях. Формирующиеся в пазухах листьев почки развивались в побеги, которые способны были к дальнейшему пазушному ветвлению.

Наиболее трудным этапом работы в условиях культуры *in vitro* является укоренение размноженных побегов. Микропобеги переносили на питательную среду ½ MS, содержащую ауксины в различных концентрациях. В опытах культивирования побегов арники горной на средах, обогащенных НУК в концентрациях 0,01; 0,1; 0,5; 1,0 мг/л, ИМК в концентрации 1,0 мг/л, а также комплекса НУК и ИУК по 0,5 мг/л, индуцировало корнеобразование.

Образование корней наблюдали на 15 – 18-е сутки культивирования *in vitro*, они имели нормальное морфологическое строение, среднее число их составляло 3–4 шт. на одно растение. Через 1 месяц укорененные растения были готовы к переводу в условия *ex vitro*. Пересадка растений из стерильной питательной среды в условия теплицы сопровождалась переживанием ими стрессовых состояний, связанных с изменением влажности воздуха и средой культивирования, а также из-за слабого развития корневых волосков. Наиболее благоприятным для роста регенерантов арники оказался субстрат из дерновой почвы и вермикулита в соотношении 1 : 1 (92 %), а также из вермикулита (86 %).

Для доращивания растения помещали в емкости с субстратом и переносили в камеру с повышенной влажностью воздуха (85–90 %). Создание оптимального водно-воздушного режима растений является определяющим фактором благоприятного прохождения адаптации растений.

Адаптированные к почвенным условиям растения готовы к высадке в открытый грунт при температуре 6 – 8°С. Высаживали в открытый грунт растения, временно закрывая полиэтиленовой пленкой (первую неделю) и притеняли акриловой тканью, в начале мая, когда температура почвы достигла 8 °С.

Через месяц акриловую ткань убирали, и дальнейший рост растений продолжался в обычных условиях открытого грунта. При этом необходимо тщательно следить за влажностью почвы, особенно первые две недели. При такой технологии приживаемость растений в открытом грунте составляет 90 %. Успешную адаптацию растений мы объясняем созданием оптимальных условий водного и светового режимов, подбором благоприятного температурного режима.

Литература

1. Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей М. Наука, 1999. 884с.
2. Носов А. М. Культура клеток растений уникальная система, модель, инструмент Физиология растений. 2006. С. 330-337.

3. Бутенко, Р. Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений. Гормональная регуляция онтогенеза растений. М.: Наука. 2001. 42 с.
4. Проблемы морфогенеза *in vivo* и *in vitro*: эмбриоидогенез у покрытосеменных растений. Ботанический журнал. 1978. Т. 63, № 1. С. 87.

УДК 577.152.34: 576.315.4: 633.11

АКТИВНОСТЬ *ARG-X* ПРОТЕОЛИЗА В СУПРАСТРУКТУРАХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ПРИ ИНДУКЦИИ РОСТОВОГО МОРФОГЕНЕЗА ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

Иванов Р. С., Вафина Г. Х., Терещенко Л. М., Иванова Э. А.

Федеральное государственное учреждение Российской академии наук Институт биологии
Уфимского научного центра РАН

Как известно, растения имеют высокоразвитую эпигенетическую систему, которая зачастую более совершенна, чем у представителей других царств живого мира [1]. Некоторые из фундаментальных вопросов касающихся молекулярной механики эпигенетики остаются для нас загадочными до сих пор. Наши знания о том, как именно конкретные модификации белков устанавливаются на определенных позициях в геноме, и каким образом это является частью молекулярной памяти, очень фрагментарны. За последние годы ряд лабораторий мира сумел подтвердить, что в основе яровизации, на уровне модификации хроматина, лежат именно эпигенетические процессы [2]. В условиях окружающей среды, растения вынуждены адаптироваться или погибнуть [3]. После яровизации родительского растения на нём появляются семена, в которых произошла смена подпрограммы развития. То есть, растение приобрело некоторую форму молекулярной памяти, которая сохраняется даже после деления клеток [2]. Архитектоника хроматина, хромосом и их специфических участков как формы эпигенетического контроля онто- и филогенеза эукариот реализуется при прямом участии как гистонов, так и негистоновых белков. В аспекте влияния протеома клеточного ядра на пространственно-временную реорганизацию хроматина наше внимание было сфокусировано на участки белков, где находятся зоны *Arg-X* связей. Аргининбогатые гистоны по аминокислотной последовательности эволюционно стабильные белки, что свидетельствует об их важной роли в сохранении и реализации генетической информации у эукариот [4]. Известно, что аргинин в составе белков активно участвует в процессах структурирующих упаковку ДНК, особенно при модификации гуанидиновой группы. Сжатие или растяжение нуклеопротеидных супраструктур клеточного ядра способно экранировать гидрофобные или гидрофильные поверхности белка для межмолекулярных взаимодействий и тем самым влиять на плотность упаковки ДНК и ее транскрипционную активность. Такое воззрение на проблему реализации молекулярных основ морфогенетических подпрограмм развития и связанных с ними эпигенетических механизмов сформировало представление рассмотрения этого сложного вопроса: с одной стороны – анализа процессов на электронном уровне; с другой – на биогетерополимерном или супраструктурном.

Целью данной работы был поиск динамики локализации активности *Arg-X* протеолиза влияющей на конформационные перестройки тотального интерфазного хроматина при перепрограммировании ярового сорта в озимый и последнего вновь в яровой.

Объектом исследования были элитные семена пшеницы (*Triticum aestivum L.*) сортов Артемовка (яровая), выведенный из нее сорт Мироновская 808 (озимая) и выведенный из последнего сорт Мироновская яровая (коллекция семян Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова). Подробное описание процесса выведения этих сортов представлено в работах [5-6]. В определенные интервалы времени, а именно: 0 ч (воздушно-сухое семя, находящееся в состоянии биологического покоя) и через 21 ч от начала замачивания у прорастиваемых семян отделяли от эндосперма зародыши, из которых были выделены клеточные ядра [7]. Надмолекулярные структуры: нуклеоплазму (Нп), хроматин непрочно (Хр-I) и прочно (Хр-II) связанный с ядерным матриксом (ЯМ), и собственно ЯМ выделяли из клеточных ядер при повышении ионной силы раствора (Нп – 0,14М NaCl; Хр-I – 0,35М NaCl; Хр-II – 2М NaCl; ЯМ – 6М гуанидингидрохлоридом с β-меркаптоэтанолом) способом, подробно описанным в работе [8]. Количество белка в ядрах и ядерных надмолекулярных структурах определяли методом Бредфорда в нашей модификации [8]. Активность *Arg-X* протеолиза оценивали по расщеплению *Arg-X* связей в аргининобогатом белке — протамине *Salmine-A-1* («Merk») — молекула которого состоит из 33 аминокислот (22 молекулы *Arg*, 4 — *Ser*, 3 — *Pro*, по 2 — *Gln* и *Val*) во всех фракциях ядер [8]. Активность протеолиза выражали в наномолях аргинина за 1 с на 1 мкг белка (нмоль / (с · мкг белка).

Один из элементов анализа молекулярно-генетических основ озимости и яровости на примере сортов пшениц Мироновская 808 (озимая) и выведенной из нее Мироновской яровой был представлен в наших предыдущих работах [9-10]. Было показано, что молекулярные механизмы при инициации ростовых процессов находятся на уровне слабых химических взаимодействий компартментов клеточного ядра и ядерного матрикса, ответственного за сборку мультиферментативных комплексов репликации и транскрипции.

Учитывая, что в интерфазе клеточного цикла происходят закономерные надмолекулярные преобразования хроматина при участии белковых компонентов; то мы вначале определили динамику протеома клеточных ядер при индукции дифференцированного роста зрелых зародышей озимой и яровой пшеницы. Проведенный анализ показал заметное увеличение содержания белка во всех фракциях (наиболее ярко в хроматине) клеточных ядер зародышей яровой пшеницы сорта Артемовка, тогда как во фракциях клеточных ядер зародышей пшеницы сорта Мироновская 808 (озимая) и Мироновская яровая отмечалась относительно одинаковая динамика снижения содержания белка. Исследование *Arg-X* ограниченного протеолиза, способного модулировать структуру хроматина, и тем самым, оставлять в нем определенные эпигенетические метки показало, что из всех трех исследуемых сортов, наибольшее проявление *Arg-X* протеазоактивности наблюдалось у исходного сорта - Артемовка. У этого сорта была обнаружена активность *Arg-X* протеолиза на уровне хроматина непрочносвязанного с ядерным матриксом в воздушно-сухом зародыше и при его проклевывании, с последующим появлением *Arg-X* протеазоактивности в хроматине прочносвязанном с ядерным матриксом. Что касается озимого сорта пшеницы Мироновская 808, то ни в одной из фракций мы не обнаружили проявления *Arg-X* протеазоактивности. Анализ надмолекулярных структур Мироновской яровой вновь выявил *Arg-X* протеолитическую активность на уровне хроматина прочносвязанного с ядерным матриксом – Хр- II. Эта фаза клеточного цикла у пшеницы интересна тем, что в этот временной период наблюдается переход к репликации и синтезу ДНК. Таким образом, в представленной работе показано, что *Arg-X* протеолитическая активность ярко выражена и сохранена в пространственно-временной реорганизации яровых пшениц на уровне хроматина прочносвязанного с ядерным матриксом.

Литература

1. Эллис С.Д., Дженювейн Т., Рейнберг Д. Эпигенетика. М.: Техносфера, 2010. С.33-70. 495с. Пер. с англ. (Allis D., Jenuwein T., Reinberg D. Epigenetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007).
2. Кэрри Н. Эпигенетика. Ростов н/Д: Феникс, 2012. 349с. Пер. с англ. (Nessa Carey. The Epigenetic Revolution. London: Icon Books Ltd., 2011).
3. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. С. 286.
4. Smith E.L., De Lange R.J., Bonner J. Chemistry and biology of histones // *Physiological Reviews* 1970. V.50. № 2. P. 159–170.
5. Ремесло В.Н. Озимая пшеница Мироновская 264 и Мироновская 808. М.: «Колос», 1964. 72с.
6. Наука и человечество: Доступно и точно о главном в мировой науке: Международный ежегодник / Всесоюз. о-во «Знание», АН СССР. Отв. ред. Е.Б. Этингоф. М.: Знание, 1980. С. 105-117.
7. Способ выделения растительных клеточных ядер: 1701747 / Иванова Э.А., Вафина Г.Х. СССР № 9/50. Оpubл. 01.09.91. Бюл. № 48. С.12.
8. Способ получения ядерных фракций, обладающих протеиназной и ингибирующей активностью: 1733471 / Иванова Э.А., Вафина Г.Х. СССР №9/50. Оpubл. 15.01.92. Бюл. № 18. С.12.
9. Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С. Особенности динамики содержания белков и *Arg-X* протеолиза в пространственной реорганизации хроматина при индукции ростовых процессов в зародышах озимой и яровой пшеницы // *Физиология и биохимия культурных растений*. 2008. Т. 40. № 2. С. 135-141.
10. Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С. Анализ *Arg-X* протеолиза в пространственной реорганизации хроматина под влиянием ингибитора деацетилирования белков при индукции ростовых процессов зрелых зародышей озимой и яровой пшеницы // *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009. Т. 41. № 1. С. 38-35.

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* НА ПОКАЗАТЕЛИ РОСТА ПШЕНИЦЫ ПРИ ЗАСОЛЕНИИ СРЕДЫ

Ласточкина О.В., Ильясова Е.Ю., Широков А.В., Пусенкова Л.И.

ГНУ Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Российской академии сельскохозяйственных наук, Уфа

Бактерии-эндофиты рода *Bacillus Cohn* являются одними из наиболее привлекательных объектов для использования в качестве основы при создании биологических препаратов [Berg, 2009; Perez-Garsia et al., 2011; Beneduzi et al., 2013]. Особый интерес к ним был вызван благодаря выявлению их способности к синтезу широкого спектра биологически активных веществ в окружающую среду, а также запуску индуцированной системной устойчивости (ИСУ) к патогенам и вредителям [Клоергер et al., 2004; Schallmey, 2004; Chourdary and Johri, 2009]. Вместе с тем, имеются сведения об их участии в регуляции

устойчивости растений и к абиотическим стрессам [Sayed et al., 2011]. Однако, несмотря на возрастающий интерес к данным микроорганизмам, механизмы их защитного действия на растения к неблагоприятным воздействиям окружающей среды, в частности абиогенной природы, пока недостаточно ясны. К тому же применение уже существующих биопрепаратов на основе бацилл ограничивается, вероятно, ввиду недостаточного сбора высокоэффективных штаммов и снижения с течением времени их защитных свойств, связанного с многократным культивированием штаммов на питательных средах [Абизгильдина, 2011]. Это предполагает весьма важным и своевременным поиск наиболее активных штаммов, выявление механизмов их действия на растения и разработка новых технологических форм биопрепаратов.

Ранее в нашей лаборатории была проведена работа по скринингу свободноживущих бактерий почвенных образцов различных почвенно-климатических зон Республики Башкортостан (РБ) и отобрано 2 наиболее активных в отношении аборигенных микромицетов-фитопатогенов в РБ эндофитных штамма, предварительно идентифицированных как *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) 10-4 и 12-2. Также выявлены наиболее оптимальные по ростстимулирующему эффекту и антифунгальной активности концентрации бактериальной суспензии штаммов 10-4 и 12-2, которые составили 10^5 КОЕ/мл и 10^4 КОЕ/мл соответственно [Lastochkina et al., 2012]. Далее представлялось весьма важным выяснить способность отобранных штаммов индуцировать устойчивость растений и к абиотическим стрессовым факторам среды, в частности к засолению, относящемуся к числу наиболее распространенных в мире стрессовых факторов среды, приводящих к снижению продуктивности растений.

Цель настоящей работы состояла в исследовании способности новых штаммов *B. subtilis* 10-4 и 12-2 оказывать протекторный эффект на растения пшеницы в условиях натрий - хлоридного (NaCl) засоления.

Для этой цели мы использовали тест на всхожесть семян, который широко применяется при анализе эффективности регуляторов роста для защиты растений от стрессовых воздействий, а также показатели интенсивности ростовых процессов растений, о которых судили по сырой и сухой массе проростков [Мокроносов, 1994].

Исследования проводили на мягкой яровой пшенице *Triticum aestivum* L. сорта Башкирская 26. Предпосевную обработку проводили путем замачивания семян в бактериальных суспензиях новых штаммов *B. subtilis* 10-4 (10^5 КОЕ/мл) и 12-2 (10^4 КОЕ/мл), *B. subtilis* 26D (10^9 КОЕ/мл) (являющейся основой биопрепарата Фитоспорин-М) или в воде в течение 3-х часов. Затем семена подсушивали и проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге смоченной дистиллированной водой (контроль) или растворами NaCl в концентрациях 1%, 1.5%, 2% в течение 3-х суток (16-часовой световой фотопериод, 15 кЛк, 22-24° С). После чего определяли процент всхожести семян. Далее 3-х суточные проростки вместе с фильтровальной бумагой переносили в стаканы с дистиллированной водой (контроль) или растворами NaCl (1%, 1.5%, 2%). О росте судили по показателям сырой и сухой массы 7-сут проростков пшеницы [Мокроносов, 1994].

На рисунках представлены данные средних арифметических двух - трех независимых опытов, каждый из которых проведен в трех биологических повторностях, и стандартные ошибки средних.

Из данных, приведенных на рисунке 1, видно, что засоление среды оказывало ингибирующий эффект на прорастание семян в сравнении с контрольным вариантом (замачивание и проращивание семян в дистиллированной воде), % прорастания в котором составил 88. Такой ответ вполне характерен для растений при нарушении водного режима, что сопровождается существенными изменениями в скорости протекания важнейших физиолого-биохимических процессов и отражается в снижении интенсивности ростовых процессов. В то же время, видно, что предпосевная обработка семян КЖ штаммов *B.*

subtilis 10-4, 12-2 и 26D хоть и не предотвращала степень негативного действия соли на прорастание семян, но заметно снижала его уровень. Причем наиболее эффективным оказалось применение нового штамма *B. subtilis* 12-2.

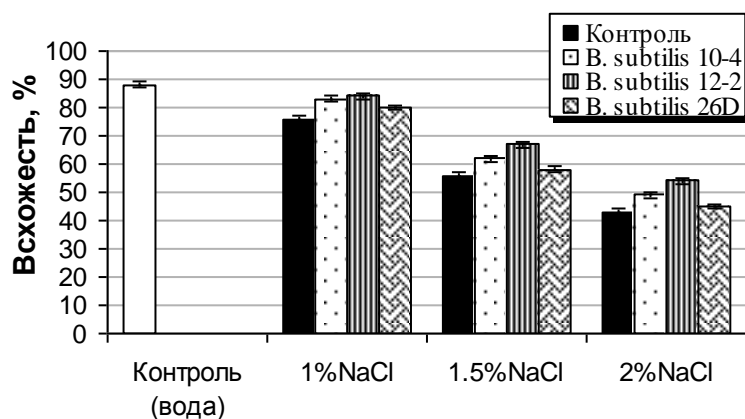


Рис.1. Влияние предпосевной обработки КЖ штаммов *B. subtilis* 10-4, 12-2 и 26D на прорастание семян пшеницы в условиях натрий хлоридного засоления.

Сходная картина наблюдалась и при оценке сырой и сухой массы проростков (Рис. 2). Предобработанные суспензионными культурами штаммов проростки, растущие на средах, содержащих NaCl в разных концентрациях, характеризовались большими размерами и массой в сравнении с необработанными проростками.

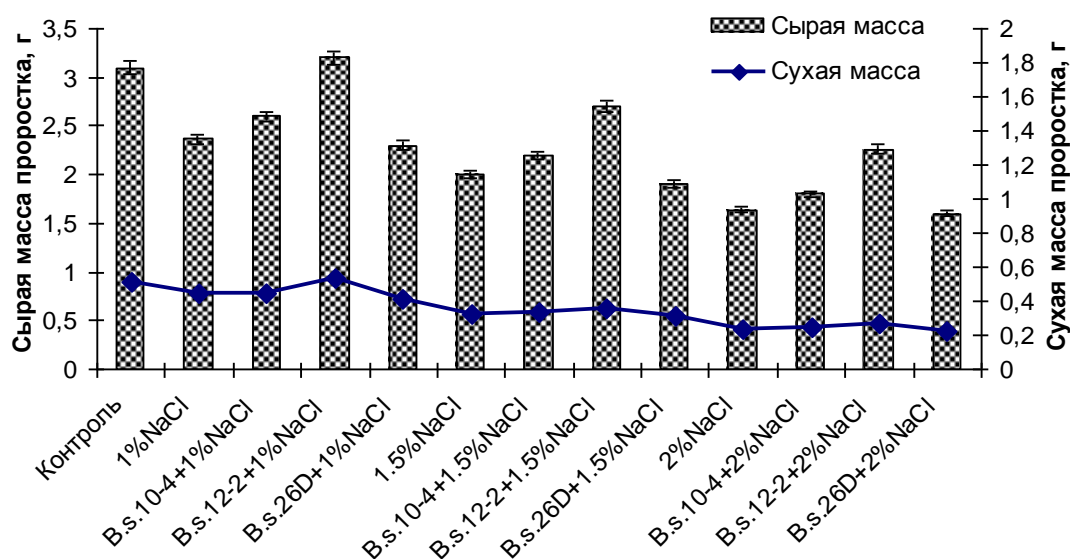


Рис.2. Влияние предобработки семян пшеницы КЖ штаммов *B. subtilis* 10-4, 12-2 и 26D на сырую и сухую массу 7-суточных проростков, подвергнутых засолению.

Полученные результаты демонстрируют способность новых штаммов *B. subtilis* 10-4 и 12-2 при предпосевном способе обработки оказывать протекторный эффект на ростовые процессы проростков пшеницы, подвергнутых воздействию хлорида натрия, что указывает на их участие в регуляции устойчивости растений к засолению.

Литература

1. Абизгильдина Р.Р. Индукция защитной системы пшеницы и картофеля эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* 26Д. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 2012. Уфа. 16 с.
2. Малый практикум по физиологии растений // Под ред. А.Т. Мокроносова. М.: МГУ. 1994. 184 с.
3. Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia L.M.P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents// *Genetics and Molecular Biology*. 2012, 35, 4 (suppl):1044-1051.
4. Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 84:11-18.
5. Chourdhary D., Johri B. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR) // *Microbiol Res.* 2009, 164:493-513.
6. Kloepper J.W, Ryu Ch.-M and Zhang S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp // *Symposium. The nature and application of biocontrol microbes: Bacillus* spp. 2004, V. 94, №11:1259-1266.
7. Lastochkina O.V., Il'yasova E. Yu., Shirokov A.V., Pusenkova L.I. Antifungal and growth stimulating activities of new *Bacillus subtilis* strains // «Scientific enquiry in the contemporary world: theoretical basics and innovative approach». L&L Publishing. Titusville, FL, USA. 2012. V. 1:96-98.
8. Perez-Garcia A., Romero D., Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture// *Cur. Opinion in Biotechnology*. 2011. 22:187-193.
9. Sayed S.A., Atef A.S., Soha E. Response of three sweet basil cultivars to inoculation with *Bacillus subtilis* and arbuscular mycorrhizal fungi under salt stress conditions // *Nature and Science*. 2011. 9(6).
10. Schallmeyer M., Singh A., Ward O. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production // *J. Microbiology*. 2004. 50:1-17.

УДК 634.8

ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ХОСТА В РЕЗУЛЬТАТЕ ОБРАБОТКИ РЕГУЛЯТОРАМИ РОСТА

Миронова Л.Н., Реут А.А., Юлбарисова Р.Р.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад-институт Уфимского научного центра РАН

По мнению ряда исследователей [1, 2, 3] применение регуляторов роста – один из самых перспективных путей повышения продуктивности растений. Их эффективность во многом определяется потенциальными возможностями самих растений, а также условиями выращивания.

В качестве экзогенных регуляторов роста могут применяться как природные, так и синтетические соединения. Их использование позволяет усиливать или ослаблять признаки и свойства растений в пределах нормы, заданной генотипом, повышать устойчивость растений к неблагоприятным условиям, компенсировать недостатки сортов и гибридов. Благодаря

высокой эффективности действия в малых дозах эти препараты обычно удовлетворяют современным все более жестким требованиям экологической безопасности [4, 5].

Цель настоящей работы – исследование влияния регулятора роста *Biodux* на биоморфологические показатели и продуктивность представителей рода хоста.

Подобные работы на цветочно-декоративных растениях до настоящего времени не проводились.

В качестве объектов исследования были использованы представители рода *Hosta* – 5 видов (*H. lancifolia*, *H. undulata*, *H. sieboldiana*, *H. fortunei*, *H. glauca* var. *aurea*).

Опыт проводили в 2012-2013 гг. на базе Ботанического сада-института УНЦ РАН. Объекты исследования – многолетние кусты хосты в фазе отрастания. Обработку проводили однократно в III декаде апреля водными растворами препарата *Biodux* (д.в. - арахидоновая кислота) в концентрации, рекомендованной производителем. В среднем для обработки 1 сотки вегетирующих растений 2 мл препарата растворяли в 10 литрах воды и полученным раствором опрыскивали растения. Кроме того, для сравнения были дополнительно испытаны препараты Энерген (д.в. – натриевые соли гуминовых кислот) и Иммуноцитифит (д.в. - этиларахидонат) в концентрациях, рекомендованных производителями. В каждом варианте обрабатывали по 20 растений. Основные биоморфологические параметры растений определяли в фазе массового цветения, семенную продуктивность – в фазе полной спелости семян.

Семенную продуктивность видов подсчитывали по общепринятым методическим разработкам: учитывали потенциальную, реальную семенную продуктивность, коэффициент продуктивности и процент плодообразования. За потенциальную продуктивность (ПСП) принимали среднее количество семян, образующихся на особь; за реальную (фактическую) семенную продуктивность (РСП) – среднее число зрелых, полноценных семян на одну особь [6]. Коэффициент продуктивности ($K_{ПР}$) вычисляли по отношению показателей РСП к ПСП, выраженное в процентах; процент плодообразования – по проценту цветков, завязавших плоды.

В качестве контроля использовали необработанные растения.

Анализ изменений биоморфологических параметров хосты позволил выявить, что под действием регулятора роста *Biodux* у всех изученных образцов увеличиваются такие показатели, как высота куста (максимальное увеличение параметра – на 31%), диаметр куста (33%), высота цветоноса (36%), число цветоносов (44%), толщина цветоноса (50%), длина листа (25%), ширина листа (39%), толщина листа (100%), длина цветка (15%), диаметр цветка (52%), длина цветоножки (67%), ширина лепестка (50%), длина лепестка (21%), длина пестика (33%).

Результаты изучения изменений элементов семенной продуктивности хосты под действием регулятора роста *Biodux* показали, что у всех образцов увеличиваются такие параметры, как длина и ширина коробочки (максимальное увеличение параметра - на 29% и 20% соответственно), масса 1000 семян (15%), потенциальная и реальная семенная продуктивность 1 коробочки (74% и 420% соответственно), потенциальная и реальная семенная продуктивность растения (52% и 472% соответственно), коэффициент семенной продуктивности (59%).

Также выявлена положительная отзывчивость хосты на препараты Энерген и Иммуноцитифит. Однако *Biodux* давал более стабильные результаты для большинства образцов по максимальному числу параметров. Отмечено, что у растений *Hosta lancifolia* и *Hosta sieboldiana*, обработанных *Biodux*, фаза начала цветения наблюдалась соответственно на 15 и 6 сут раньше, а у обработанных Энергеном и Иммуноцитифитом – на 11 и 2 сут, чем в контрольном варианте. У особей *Hosta undulata*, обработанных препаратами Энерген и Иммуноцитифит, отмечалась задержка наступления фазы цветения на 16 сут. У *Hosta fortunei*

и *Hosta glauca var. aurea* обработка всеми препаратами не привела к смещению даты наступления фазы начала цветения.

В результате опытов установлено положительное влияние регулятора роста *Biodux* на рост и развитие растений хосты, что позволяет рекомендовать его к использованию в цветоводческой практике. В целях повышения эффективности возделывания данной культуры рекомендуется однократное опрыскивание растений в фазе отрастания препаратом *Biodux* в концентрации, рекомендованной производителем.

Выявлено, что биопрепарат *Biodux* способствует изменению габитуса растений, увеличивая их высоту, количество и мощность вегетативных и генеративных побегов, а также облиственность и количество цветков.

Установлено, что данный препарат также увеличивает семенную продуктивность хосты, стимулируя процессы плодообразования, закладки семян и завязывания семян.

Доказано, что препарат *Biodux* сокращает сроки наступления фазы начала цветения у большинства изученных образцов хосты на 6-15 сут.

Таким образом, полученные результаты по изучению влияния препарата *Biodux* на биоморфологические показатели и продуктивность хост неоднозначны для разных видов. Тем не менее, можно считать, что применение регулятора роста *Biodux* является достаточно перспективным направлением для практики растениеводства. Однако его использование должно осуществляться с учетом видовой реакции растений, что обеспечит наибольшую целесообразность и эффективность применения.

Работа выполнена в рамках Программы Отделения биологических наук РАН: «Биологические ресурсы России: Динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий».

Литература

1. Пономаренко С.П. Регуляторы роста растений на основе N-оксидов производных пиридина (физ.-хим. свойства и биологическая активность). Киев: Техника, 1999. 272 с.
2. Реут А.А., Миронова Л.Н. Семенная продуктивность пионов при культивировании в Башкирском Предуралье и способы ее повышения // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: География. Геоэкология. 2011. № 2. С. 79-81.
3. Реут А.А. Семенная продуктивность дикорастущих пионов и способы ее повышения // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Естественные науки. 2011. № 3 (98). Вып. 14/1. С. 134-140.
4. Регуляторы роста растений / Под ред. акад. В.С. Шевелухи. М.: Агропромиздат, 1990. 185 с.
5. Реут А.А., Миронова Л.Н. Влияние регуляторов роста растений на семенную продуктивность пионов, культивируемых в Башкирском Предуралье // Агрехимия. 2012. № 2. С. 53-58.
6. Вайнагий И.В. О методике изучения семенной продуктивности растений // Бот. журн. 1974. Т. 59, № 6. С. 826-831.

УДК 577.3

УЧАСТИЕ ЦИКЛИЧЕСКОГО ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА В РЕАЛИЗАЦИИ ДЕЙСТВИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В РАСТЕНИЯХ

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

Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
ул. Академическая 27, 220072, Минск, kolesneva_kate@mail.ru

Введение. Циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) как вторичный медиатор участвует во многих процессах роста и развития растений, таких как прорастание семян, клеточное деление, развитие хлоропластов, цветение, регуляция устьичных движений и др. Однако до настоящего времени наблюдается недостаток сведений об участии цГМФ и системы его метаболизма в реализации стрессовых ответов растений.

Известно, что общей чертой ответов растительных клеток на действие многочисленных стрессовых факторов, является избыточное образование активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса. АФК, вследствие высокой реакционной способности, приводят к окислительным повреждениям практически всех компонентов клетки.

Поэтому целью данной работы было исследовать роль цГМФ и его взаимодействие с другими сигнальными молекулами в трансдукции окислительного сигнала в растениях арабидопсиса.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служили 10-дневные проростки трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* (экотип Columbia-0), экспрессирующих Ca^{2+} -чувствительный фотобелок апоэкворин в цитозоле клеток. Проростки выращивали в стерильных условиях на чашках Петри с питательной средой Murashige и Skoog при 10-часовом световом дне при температуре 22 °С и освещении полихроматичным белым светом (150 мкЕ/м²·с). Семена трансгенных растений были любезно предоставлены проф. Mark R. Knight (Оксфордский Университет, Великобритания).

Измерение количества цГМФ проводили методом иммуноферментного анализа с помощью набора реактивов «cGMP Enzyme Immunoassay kit» (фирмы «Sigma», США) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Образование монооксида азота (NO) оценивали по концентрации нитритов (NO_2^-), которые являются первичными и стабильными продуктами превращения NO. Измерение концентрации NO_2^- проводили с использованием набора реагентов Грисса (фирмы «Promega», США).

Концентрацию свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле клеток ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$) определяли хемилюминесцентным методом. Проростки трансгенных растений *A. thaliana*, проинкубированные в 5 мкМ растворе целентеразина в течение 6 ч в темноте, помещали в кювету, содержащую 100 мкл воды, или в раствор эффектора. В случае обработки эффектором, после предварительной инкубации в течение 30 мин проростки переносили в кювету с водой. Для оценки уровня восстановленного экворина каждое измерение заканчивали внесением 200 мкл раствора 1,8 М CaCl_2 в 40%-ном этаноле (объем/объем). Изменение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ рассчитывали по методу Р.Н. Cobbold и Т.Д. Rink [1].

Полученные результаты представлены в виде средних арифметических значений и стандартных отклонений, полученных в результате 5–7 независимых экспериментов, каждый из которых проведен в 5-кратной аналитической повторности.

Результаты и их обсуждение. H_2O_2 является одной из форм АФК, генерируемой в клетке. Показано, что добавление экзогенного H_2O_2 имитировало ответы, наблюдаемые при окислительном стрессе, например, H_2O_2 вызывал закрывание устьиц и экспрессию защитных генов [2].

Было изучено влияние 40 мМ H_2O_2 на содержание цГМФ в проростках арабидопсиса. Показано, что окислительный стресс, индуцированный H_2O_2 , приводил к увеличению эндогенного содержания цГМФ в проростках (рисунок 1). Причем эффект наблюдался уже через 30 с после обработки в растворе H_2O_2 , достигая максимума 2,3 пмоль/г ткани (трехкратное увеличение по сравнению с контролем) через 1 мин инкубации. Через 5 мин инкубации уровень содержания цГМФ снижался до контрольного значения и не изменялся, по крайней мере, в течение 10 мин.

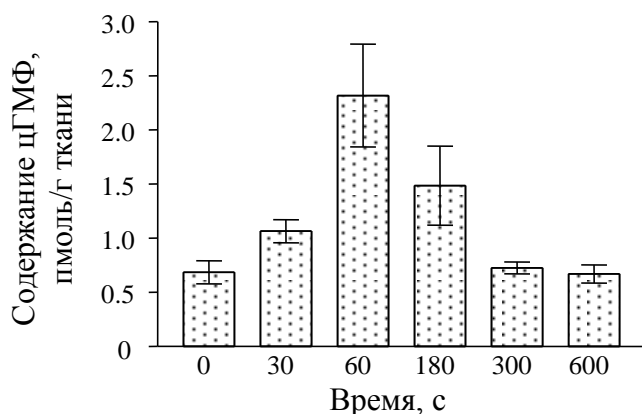


Рисунок 1. Влияние H_2O_2 (40 мМ) на содержание цГМФ в проростках *A.thaliana* в зависимости от времени обработки.

Для установления причины увеличения содержания цГМФ в клетках проростков арабидопсиса под влиянием H_2O_2 -индуцированного окислительного стресса было изучено действие 40 мМ H_2O_2 на активность ферментов метаболизма цГМФ – гуанилатциклазу (ГЦ) и фосфодиэстеразу (ФДЭ). Обнаружено, что обработка проростков арабидопсиса H_2O_2 приводила к трехкратному увеличению активности ГЦ по сравнению с контролем и не влияла на удельную активность ФДЭ (рисунок 2). Следовательно, H_2O_2 -индуцированный окислительный стресс приводит к увеличению содержания цГМФ в клетке за счет активации ГЦ.

Известно, что в клетках млекопитающих образование цГМФ может активироваться NO [3]. NO взаимодействует с растворимой формой ГЦ, индуцируя конформационные изменения, что, в свою очередь, и приводят к активации фермента.

Чтобы установить участие NO в изменении содержания цГМФ в клетках проростков арабидопсиса при окислительном стрессе, было исследовано влияние модуляторов активности ферментов синтеза NO на увеличение содержания цГМФ при действии H_2O_2 . Как видно из рисунка 3, обработка проростков ингибитором нитратредуктазы вольфрамом натрия полностью обращала H_2O_2 -индуцированное увеличение концентрации цГМФ (рисунок 3), тогда как ингибитор NO-синтазы N ω -нитро-L-аргинин-метил-эфир (L-NAME) не оказывал существенного влияния. Таким образом, образование цГМФ в клетках арабидопсиса при окислительном стрессе происходит вследствие NO-зависимой активации ГЦ.

Известно, что изменение $[Ca^{2+}]_{цит}$ в растительной клетке является промежуточным событием в цепи трансдукции многих внешних стимулов химической и физической природы, где Ca^{2+} выступает в роли универсального медиатора. Так, Ca^{2+} может

опосредовать ответы растений как на биотические стимулы, например, фитогормоны и фитопатогены, так и абиотические – осмотический и механический стрессы, холодовой шок и др. В частности продемонстрировано, что обработка растений H_2O_2 приводила к увеличению $[Ca^{2+}]_{цит}$ [4, 5]. Чтобы убедиться в том, что H_2O_2 опосредует свое действие на $[Ca^{2+}]_{цит}$ через цГМФ, было изучено влияние ингибитора ГЦ на H_2O_2 -индуцированный Ca^{2+} -ответ. Обнаружено, что предварительная инкубация проростков арабидопсиса в растворе ингибитора ГЦ 6-анилинохинолин-5,8-хинона (LY83583) обращала эффект H_2O_2 на $[Ca^{2+}]_{цит}$. Следовательно, H_2O_2 опосредует свое действие на $[Ca^{2+}]_{цит}$ с участием цГМФ. При этом увеличение внутриклеточного содержания цГМФ предшествует увеличению $[Ca^{2+}]_{цит}$.

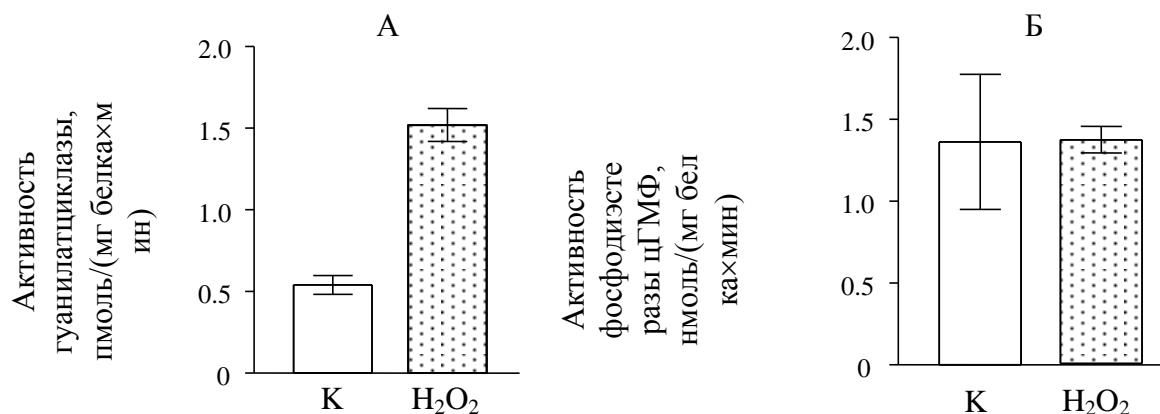


Рисунок 2. Влияние H_2O_2 (40 мМ) на активность ГЦ (А) и ФДЭ (Б) в проростках *A. thaliana*. К – контроль.

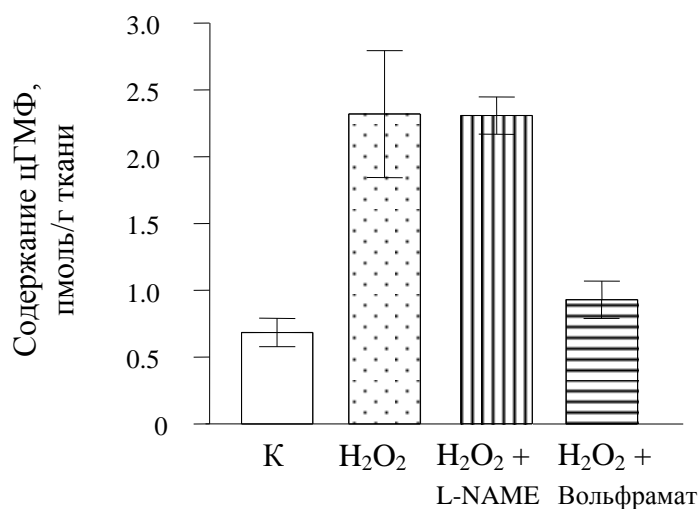


Рисунок 3. Влияние ингибиторов NO-синтазы L-NAME (5 мМ) и нитратредуктазы вольфрамата натрия (1 мМ) на индуцированное пероксидом водорода (40 мМ) увеличение содержания цГМФ в проростках *A. thaliana*. К – контроль.

Таким образом, можно заключить, что цГМФ-зависимая сигнальная система принимает участие в трансдукции окислительного сигнала в растениях. H_2O_2 -индуцированный окислительный стресс в клетке вызывает активацию ГЦ и, как следствие, увеличение содержания цГМФ. Ингибиторный анализ показал, что активация ГЦ опосредуется NO, образование которого катализируется нитратредуктазой, чувствительной

к окислительному стрессу. При этом одной из возможных мишеней действия цГМФ при окислительном стрессе являются Ca^{2+} -каналы, что и приводит к увеличению $[Ca^{2+}]_{цит.}$

Литература

1. Cobbold, P.H. Fluorescence and bioluminescence measurements of cytoplasmic free calcium / P.H. Cobbold, T.J. Rink // *Biochem. J.* – 1987. – Vol. 248. – P. 313-328.
2. Neill, S.J. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants / R. Desikan, A. Clarke, R.D. Hurst, J.T. Hancock // *J. Exp. Bot.* – 2002. – Vol. 53. – P. 1237–1242.
3. Bogdan, C. Nitric oxide and the regulation of gene expression / C. Bogdan // *Trends Cell Biol.* – 2001 – Vol. 11. – P. 66–75.
4. Rentel, M.C. Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis* / M.C. Rentel, M.R. Knight // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 135. – P. 1471–1479.
5. Dubovskaya, L.V. cGMP-dependent ABA-induced stomatal closure in the ABA-insensitive *Arabidopsis* mutant *abi1-1* / Y.S. Bakakina, E.V. Kolesneva, D.L. Sodel, M.R. McAinsh, A.M. Hetherington, I.D. Volotovskii // *New Phytol.* – 2011. – Vol. 191. – P. 57–69.

УДК 581.1

ПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* ШТ. 26Д ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ КАДМИЯ НА РАСТЕНИЯ *SINAPIS ALBA*

Курамшина З. М. ^{1*}, Смирнова Ю. В. ¹, Хайруллин Р. М. ²

¹Стерлитамакский филиал Башкирского государственного университета
Россия, Республика Башкортостан, г. Стерлитамак, 453109, пр. Ленина, 49. Тел./факс: +7
(347) 343 38 69.

*E-mail: kuramshina_zilya@mail.ru

²Институт биохимии и генетики УНЦ РАН,
Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, 450054, пр. Октября, 71
Тел./факс: +7 (347) 235 60 88
E-mail: krm62@mail.ru

Введение

Кадмий является одним из наиболее токсичных среди тяжелых металлов (ТМ). В почвах сельскохозяйственных угодий кадмий может достигать высоких концентраций и легко ассимилироваться растениями, приводя к остановке их роста и развития, негативно влияя на фотосинтез, дыхание, водный обмен и минеральное питание [1].

Фитотоксичность кадмия может быть связана с его способностью индуцировать в клетках повышенное образование активных форм кислорода (АФК), ведущих к развитию окислительного стресса [2]. Увеличение АФК приводит к усилению перекисного окисления липидов (ПОЛ), что является одной из причин дестабилизации мембран [3].

Одной из важнейших систем, способствующих устойчивости растений в условиях воздействия ТМ является антиоксидантная защита, особая роль в которой принадлежит антиоксидантным ферментам, активность которых значительно возрастает в условиях воздействия стрессовых факторов [4].

В настоящее время, одним из перспективных направлений по повышению устойчивости растений к действию ТМ является использование экологически чистых технологий, основанных на применении эндофитных штаммов *B. subtilis*, обладающих фунгицидной и ростстимулирующей активностями [5]. Бациллы, как известно, продуцируют большое количество биологически активных веществ, таких как ферменты, антибиотики, различные аминокислоты [6]. Известен антистрессовый эффект *B. subtilis* (например, штаммы 26Д и 11ВМ) при воздействии на растения различных абиотических факторов (засоление, водный дефицит, действие ТМ) [7, 8, 9]. В литературе, однако, отсутствуют сведения о механизмах антистрессового эффекта этих бактерий, в том числе и при воздействии на растения ТМ. В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение влияния инокуляции семян горчицы белой эндофитными штаммами бактерий *B. subtilis* на рост побегов и активность антиоксидантных ферментов растений горчицы при Cd-стрессе.

Методика

Растительный материал. Объектом исследования служили проростки горчицы белой (*Sinapis alba* L.). Эксперименты проводили в лабораторных условиях. Семена перед посадкой промывали в мыльной воде, стерилизовали 96%-ым этанолом (1 мин), трижды ополаскивали в дистиллированной воде, подсушивали. В экспериментах использовали бактерии *B. subtilis* штамм 26Д (получен из коллекции ВНИИСХМ С.-Пб.- Пушкин, №128). Обработку семян бактериями проводили в ламинар-боксе. В опытах использовали 20-часовую культуру бактерий, растущую на мясо-пептонном агаре при +37°C. Клетки бактерий отмывали раствором 0.001М КСl. Суспензию клеток доводили до необходимой концентрации по оптической плотности. 1 г семян обрабатывался 20 мкл суспензии бактерий в концентрации 10⁶ кл/мл. Обработанные семена выдерживали в течение часа, затем использовали в экспериментах. Контрольные семена обрабатывали дистиллированной водой.

Инокулированные и контрольные семена проращивали в вегетационных сосудах, заполненных почвой – черноземом выщелоченным. В почву ионы металла вносили в виде раствора соли Cd(NO₃)₂·4H₂O, однократно после посева семян. Растворы готовили в пересчете на ионы металла в концентрации 10 и 200 мг/кг почвы. Контрольные растения поливали дистиллированной водой. Растения выращивали при температуре 18-20°C. Размещение вегетационных сосудов меняли каждый день по единой схеме, чтобы обеспечить равномерную освещенность.

Измерение сырой массы побегов и отбор проб проводили на 3, 6, 9, 14, 30 сутки от начала эксперимента.

Экстракция. Проростки растений, выращенные в почве с различной концентрацией ионов кадмия, промывали в дистиллированной воде, удаляли избыток воды фильтровальной бумагой, взвешивали. Растительный материал гомогенизировали в 0,1М К-фосфатном буфере рН 6.0 (при определении пероксидазы) или в Трис буфере рН 7.8 (при определении каталазы и малонового диальдегида (МДА)) в соотношении навеска: экстрагент – 1:10 (г:мл), центрифугировали 10 минут при 8 тыс. об./мин. Надосадочную жидкость центрифугировали еще 10 минут при 16-18 тыс. об./мин. Для определения активности ферментов и уровня МДА использовали надосадочную жидкость.

Определение активности ферментов и концентрации МДА. Активность пероксидазы оценивали согласно методике Хайруллина с соавторами (2001), исходя из количества окисленного ортофенилендиамина [7]. Концентрацию белка определяли согласно методу Bradford [10]. Активность каталазы определяли согласно методике Королюк с соавторами. Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс [11]. Содержание МДА измеряли, используя метод Costa с соавторами [12]. Метод основан на образовании окрашенного комплекса между МДА и тиобарбитуровой кислотой при нагревании.

Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. В таблицах и на рисунках приведены средние значения трех повторностей и их стандартные отклонения.

Результаты и их обсуждение

Влияние ионов кадмия на сырую массу побегов. Обработка семян бактериями *B. subtilis* положительно влияла на рост растений. Растения, инокулированные клетками *B. subtilis*, имели более высокие показатели биомассы побегов, чем необработанные, и по мере роста эти различия становились заметнее (табл. 1). Ростстимулирующий эффект бактерий, вероятно, связан с тем, что бациллы могут продуцировать фитогормоно-подобные вещества [13, 14], а также повышать содержание питательных веществ в доступной для растений форме [9] и подавлять развитие фитопатогенных микроорганизмов [14].

Таблица 1.

Влияние кадмия на сырую массу побегов горчицы, мг

Концентрация (мг/кг)	Вариант	Время, сутки				
		3	6	9	14	30
0	Не обр.	30.6±4.9	60.1±5.6	71.8±5.7	86.6±7.1	110.0±2.5
	Обр. <i>B.s.</i> 26Д	32.2±5.3	59.7±4.6	72.3±3.3	88.5±2.5	123.8±2.2
10	Не обр.	37.8±8.9	54.6±6.2	76.6±6.2	81.4±1.2	106.2±5.7
	Обр. <i>B.s.</i> 26Д	27.8±4.7	57.1±3.9	82.1±8.8	85.0±2.8	123.8±8.6
200	Не обр.	36.6±6.5	63.4±6.6	78.9±9.1	92.0±9.0	101.4±7.8
	Обр. <i>B.s.</i> 26Д	27.5±3.1	60.4±3.7	83.7±3.0	93.3±9.2	121.4±5.4

Содержание тяжелого металла в почве в концентрации 10 и 200 мг/кг на начальных этапах роста растений (до четырнадцати суток) оказывало слабое стимулирующее действие, однако на тридцатые сутки роста начинался проявляться ингибирующий эффект металла. Подобные эффекты ТМ описаны в литературе. Так, известно, что кадмий в очень низких концентрациях не вызывает заметных изменений и даже способен оказывать положительное влияние на состояние растений: стимулировать рост, повышать содержание пигментов, уменьшать интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) [15]. При действии высоких концентраций кадмия происходит торможение роста, уменьшение сырой и сухой массы растений, прогрессирующие с увеличением концентрации металла в среде выращивания [16, 17].

Растения, обработанные бактериями, в присутствии кадмия росли лучше необработанных. Так, при концентрации 200 мг/кг масса побегов у обработанных бактериями *B. subtilis* 26Д растений была больше на 8%.

Влияние ионов кадмия на активность антиоксидантных ферментов. У контрольных растений активность каталазы повышалась по мере роста растений, достигая максимума на девятые сутки, и снижалась к тридцатым суткам (табл. 2). У растений, обработанных *B. subtilis*, активность фермента увеличивалась и была максимальной на шестые сутки роста проростков, затем начинала снижаться. При наличии ионов кадмия в почве в концентрации 10 мг/кг и 200 мг/кг активность каталазы у необработанных растений увеличивалась на начальных этапах роста, на тридцатые сутки снижалась в 1.6 и 1.8 раза, соответственно. У инокулированных бациллами растений активность каталазы была высокой во все точки фиксации (при концентрации кадмия 10 мг/кг и 200 мг/кг почвы показатели активности каталазы на тридцатые сутки были в 1.5 и 2.1 раза, соответственно выше, чем необработанных).

Таблица 2.

Активность каталазы и пероксидазы в побегах горчицы, при загрязнении почвы тяжелым металлом

Концентрация (мг/кг)	Вариант	Время, сутки				
		3	6	9	14	30
0	<i>Активность каталазы, мкат/л</i>					
	Не обр.	0.6±0.1	0.7±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1	0.7±0.1
	Обр. V.s. 26Д	0.4±0.1	0.8±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1
10	Не обр.	0.6±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	0.4±0.1
	Обр. V.s. 26Д	0.6±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1
200	Не обр.	0.7±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	0.4±0.1
	Обр. V.s. 26Д	0.7±0.1	0.8±0.1	0.7±0.1	0.8±0.1	0.9±0.1
<i>Активность пероксидазы, ед. мг⁻¹·с⁻¹</i>						
0	Не обр.	2.3±0.1	5.4±0.5	5.0±0.1	3.1±0.4	3.3±0.2
	Обр. V.s. 26Д	3.7±0.1	7.3±0.2	5.6±0.3	2.6±0.1	2.7±0.1
10	Не обр.	3.8±0.2	7.8±0.5	5.6±0.3	2.0±0.1	2.6±0.2
	Обр. V.s. 26Д	5.2±0.3	6.7±0.8	4.7±0.1	3.5±0.3	3.5±0.2
200	Не обр.	3.2±0.1	7.4±0.2	3.1±0.1	2.3±0.1	2.1±0.1
	Обр. V.s. 26Д	2.8±0.1	7.1±0.3	3.6±0.1	4.2±0.1	3.9±0.1

Активность пероксидазы в побегах растений была максимальной на шестые сутки роста в почве без металла (табл. 2), у обработанных растений клетками *B. subtilis* активность фермента была выше, чем у необработанных на в среднем на 35%. При внесении ионов кадмия в почву в концентрации 10 мг/кг и 200 мг/кг активность пероксидазы у инокулированных бактериями растений на шестые сутки роста повышалась на 44% и 37%, а к 30-м суткам роста активность снижалась на 22% при обработке клетками шт. 26Д. У обработанных бактериями растений резкого изменения активности пероксидазы под действием кадмия не наблюдали, на тридцатые сутки опыта активности фермента у растений оставалась высокой и была сопоставима с показателями активности у контрольных растений.

На начальных этапах роста растений (3 сутки) содержание МДА в побегах было наиболее высоким, по мере взросления отмечена тенденция уменьшения продуктов ПОЛ (табл. 3). У инокулированных бактериями *B. subtilis* 26Д растений показатели ПОЛ на тридцатые сутки опыта были ниже на 42%, чем у необработанных. Наличие кадмия в почве приводило к снижению уровня МДА у молодых растений почти в два раза, затем по мере роста растений концентрация МДА увеличивалась и к тридцатым суткам содержание МДА в побегах инокулированных бактериями растений было на 23% (Cd 10 мг/кг) и 57% (Cd 200 мг/кг) выше, чем в варианте без металла. В тканях побегов растений, обработанных бактериями, показатели МДА колебались на уровне контрольных растений, не подвергшихся воздействию металла.

Известно, что в токсичных концентрациях ионы ТМ индуцируют образование АФК и могут вызывать значительные отклонения метаболизма [2, 3]. В растениях горчицы вызванный кадмием окислительный стресс выражался в повышении активности антиокислительных ферментов. Активация каталазы и пероксидазы направлена на разрушение H₂O₂ и АФК и защиту клетки от вызываемых ими повреждений [17].

Таблица 3.

Концентрация малонового диальдегида в побегах горчицы, выросшей на почве, содержащей кадмий, моль/г сырого веса $\times 10^{-5}$

Концентрация (мг/кг)	Вариант	Время, сутки				
		3	6	9	14	30
0	Не обр.	6.5±0.6	1.9±0.3	2.9±0.2	3.3±0.2	3.5±0.4
	Обр. V.s. 26Д	6.1±0.6	1.3±0.3	3.0±0.1	2.1±0.2	2.0±0.2
10	Не обр.	3.1±0.3	2.9±0.1	3.2±0.5	3.6±0.2	4.3±0.6
	Обр. V.s. 26Д	4.8±0.9	2.8±0.1	2.4±0.2	2.9±0.2	2.8±0.1
200	Не обр.	2.9±0.4	2.5±0.4	2.4±0.4	3.5±0.6	5.5±0.1
	Обр. V.s. 26Д	4.4±0.2	1.1±0.1	1.7±0.2	2.3±0.6	3.6±0.2

Об эффективной работе ферментов свидетельствует низкий уровень продуктов ПОЛ в побегах горчицы. Более высокий уровень МДА у необработанных бактериями растений по сравнению с контрольными позволяет предположить нарушение растительной ферментной системы антиоксидантной защиты. Повреждающий эффект ионов кадмия был хорошо заметен только на тридцатые сутки эксперимента. Вероятно, это связано с меньшей чувствительностью к воздействию стрессора надземной части, по сравнению с корнями [1]. Кроме того, можно предположить, что в течение определенного времени растение активно борется с действием фактора, и только затем наступают повреждения.

Инокуляция клетками *B. subtilis* снижала токсический эффект кадмия, что проявлялось не только в показателях лучшего роста при высоких концентрациях металла, но и в сохранении активности каталазы и пероксидазы, уменьшении интенсивности ПОЛ. Таким образом, повышение устойчивости растений, обработанных бактериями *B. subtilis*, при воздействии ионов кадмия можно объяснить повышением активности антиокислительных ферментов и менее интенсивным развитием окислительного стресса.

Литература

1. Серегин И. В., Иванов В. Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т.48. № 4. С. 606 – 630.
2. Cho U. H., Seo N. H. Oxidative Stress in Arabidopsis thaliana Exposed to Cadmium Is due to Hydrogen Peroxide Accumulation // Plant Sci. 2005. V. 168. P. 113 – 120.
3. Курганова Л. Н., Балалаева И. В., Веселов А. П., Сеницына Ю. В., Васильева Е. А., Цыганова М. И. Прооксидантно-антиоксидантный статус хлоропластов гороха при действии стрессирующих абиотических факторов среды: 1. Продукция активных форм кислорода и липопероксидация // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2010. № 2 (2). С. 544 – 549.
4. Шевякова Н. И., Нетронина И. А., Аронова Е. Е., Кузнецов Вл. В. Распределение Cd и Fe в растениях *Mesembryanthemum crystallinum* при адаптации к Cd-стрессу // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 5. С. 756 – 763.
5. Мубинов И. Г. Реакции пшеницы на действие клеток эндофитного штамма 26D *Bacillus subtilis* – основы биофунгицида фитоспорин: Автореф. дисс... канд. биол. наук. Уфа. 2007. – 22 с.
6. Недорезков В. Д. Биологическое обоснование применения эндофитных бактерий в защите пшеницы от болезней на Южном Урале: Автореф. дисс. д-ра с.-х. наук. С-Пб, 2003. – 41 с.
7. Хайруллин Р. М., Недорезков В. Д., Мубинов И. Г., Захарова Р. Ш. Повышение устойчивости пшеницы к абиотическим стрессам эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* // Вестник ОГУ. 2007. № 2. С. 129 – 134.

8. Курамшина З. М., Смирнова Ю. В., Хайруллин Р. М. Повышение толерантности проростков подсолнечника *Helianthus annuus*, инокулированных эндофитным штаммом *Bacillus subtilis*, к действию тяжелых металлов. Сообщение 2. Антистрессовая активность эндофита *Bacillus subtilis* 26D при действии тяжелых металлов на растения подсолнечника *Helianthus annuus* // IV Всероссийская научно-практическая конференция «Проблемы экологии Южного Урала»: приложение к 10 номеру (2009 г.) журнала «Вестник ОГУ», 20-21 октября 2009 г. – Оренбург: Оренбургский государственный университет, 2009. С. 461 – 463.
9. Егоршина А. А., Р. М. Хайруллин, Лукьянцев М. А., Курамшина З. М., Смирнова Ю. В. Фосфат-мобилизующая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их влияние на степень микоризации корней пшеницы / Научный журнал Сибирского федерального университета. Красноярск. 2011. № 1. С.172 – 182.
10. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding//Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. N 2. P. 248 – 254.
11. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16 – 18.
12. Costa H., Gallego S. M., Tomaro M. L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons // Plant Sci. 2002. V. 162. P. 939 – 945.
13. Архипова Т. Н., Веселов С. Ю., Мелентьев А. И., Мартыненко Е. В., Кудоярова Г. Р. Сравнение действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины, на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 4. С. 567 – 574.
14. Мелентьев А. И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohc в агроэкосистемах. М.: Наука. 2007. – 147 с.
15. Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. – 172 с.
16. Ghorbanli M., Kavaeh S.H., Serehr M.F. Effects of Cadmium and Gibberellin on Growth and Photosynthesis of *Glycine max* // Photosynthetica. 1999. V. 37. P. 627 – 631.
17. Zhang F., Shi W., Jin Z., Shen Z. Response of Antioxidative Enzymes in Cucumber Chloroplasts to Cadmium Toxicity // J. Plant Nutr. 2003. V. 26. P. 1779 – 1788.

УДК 638.15

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНГИЦИДНЫХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ И ПРИМЕНЕНИЕ ФИТОСБОРА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АСКОСФЕРОЗА У ПЧЕЛ

Фархутдинов Р.Г., Шафикова В.М.

ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа, Россия, e-mail:
frg2@mail.ru

Аскосфероз пчел (известковый, меловой расплод, сухой гнилец) – инфекционное заболевание трутневых, пчелиных и маточных личинок, вызванное грибом *Ascosphaera apis*. Аскосфероз встречается во влажных местностях, вызывая гибель пчелосемей. Заражаются

пчелы с кормом, от других пчел, при переселении маток, возбудитель заносится человеком из неблагополучных пасек. Заболевание регистрируется весной, летом и осенью.

Многие ученые к причинам, способствующим возникновению аскофероза, относят необоснованное и бесконтрольное применение в пчеловодстве малоэффективных антибиотиков, а также акарицидов для борьбы с варроатозом пчел. Во время противоварроатозных обработок происходит почти полная дезакаризация пчелиных гнезд, погибают не только патогенные клещи, но и полезные — микофаги. Микофаги, выедая мицелий грибов на различных субстратах, вызывают их разрушение, выступая одновременно в роли санитаров, вредителей, переносчиков заболеваний. Лишившись естественной защиты, пчелы какое-то время не могут противостоять действию патогенных грибов, в том числе *Ascosphaera apis*. Известно, что патогенная микрофлора постоянно имеется в природе — в почве, воде и ульях, но заболевание у пчел возникает только в тех случаях, когда нарушаются физиологическое равновесие в семьях, биоценоз пчелиного гнезда и исчезают естественные антагонисты возбудителей заболеваний [5]. Обычно заболевают слабые семьи после длительных похолоданий при повышенной влажности воздуха [4].

На пасеках Башкирии аскофероз впервые был официально зарегистрирован в 1985-87 годах [7]. Степень поражения пчел в Башкирии аскоферозом составляет в среднем 14% от общего количества пчелосемей [3]. Разработано большое количество препаратов, состоящих в основном из полиеновых антибиотиков и имидазолсодержащих соединений, объединенных в группу азолов. Из антибиотиков заслуживают внимания препараты, в которые он входит: нистатин, аскопол, аскостат (комплексный препарат) и полисот. Для лечения пчел, больных аскоферозом, применяют нистатин. Хорошие результаты получают при использовании 10 г смеси, состоящей из 100 г сахарной пудры и 0,5 – 1 г нистатина. Ею опыляют рамки с пораженным расплодом трехкратно через 5 дней. Однако использование данных препаратов для лечения пчелиных семей ведет к накоплению их в меде и других продуктах пчеловодства. Применение препаратов на растительной основе не приводит к загрязнению продуктов пчеловодства, а биологически активные вещества растений повышают неспецифическую резистентность пчелосемей к различным заболеваниям.

Помимо лечебных действий, необходимо проведение зоотехнических мероприятий. Перед лечением пчелиных семей рамки с сильно пораженным расплодом удаляют, больные семьи перегоняют в чистые, продезинфицированные ульи. Гнезда сокращают, утепляют; заменяют маток на здоровых молодых плодных. Одновременно дезинфицируют освободившиеся ульи, рамки и пчеловодный инвентарь дезинфектантом, разрешенным к применению. Подмор и ульевый мусор сжигают.

Целью наших исследований были поиск и разработка растительного препарата, ускоряющего выздоровление пчелиных семей от аскофероза. Первый этап исследований был посвящен анализу литературы – поиску лекарственных растений, обладающих фунгицидной активностью.

Для проведения микроскопических исследований и выделения чистой культуры гриба в стерильные пробирки были отобраны по 10-15 мумифицированных личинок. В лабораторных условиях личинок помещали в стерильные ступки, заливали стерильным физиологическим раствором и тщательно растирали до получения гомогената. Каплю гомогената наносили на чистое, обезжиренное предметное стекло, накрывали покровным и просматривали в световом микроскопе при увеличении $\times 400$. При наличии в поле зрения характерных для *A.apis* шаров, заполненных спорами, делали посев гомогената на картофельно-декстрозный агар с дрожжевым экстрактом (4%). Инкубировали в термостате в течение 5- 10 дней при 25°C [1]. Идентификацию выросших колоний гриба проводили по общепринятым методикам.

Нами были определены противоаскоферозные свойства спиртовых и водных вытяжек из герани кроваво-красной (*Geranium sanguineum*), хвоща полевого (*Equisetum arvense*),

чистотела большого (*Cheidonium majus*), эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus globulus*), полыни горькой (*Artemisia absinthium*), цетрарии исландской (*Cetraria islandica*), чабреца ползучего (*Thymus serpyllum*), вероники дубравной (*Veronica chamaedrys*), а также составленного нами из этих растений сбора с коммерческим названием «Фитоаск». Микостатические и микоцидные свойства растительных препаратов определяли методом постановки реакции в лунках на агаре Сабуро, предварительно засеянном культурой *Ascosphaera apis*. Наблюдения проводили в течение 10 суток, а контролем служили рабочие дозы нистатина и стерильный физиологический раствор. В ходе исследований измеряли зоны задержки роста возбудителя аскофероза и по результатам сравнения опытных и контрольных показателей устанавливали противоаскосферозную эффективность различных концентраций препаратов. Из полученных данных следует заключить, что экстракты вероники, хвоща, цетрарии и сбора «Фитоаск» обладают выраженными фунгицидными свойствами. Спиртовые композиции веществ растительного происхождения более активны, нежели водные формы.

Затем после проведения весенней ревизии нами были сформированы подопытные и контрольные группы пчелиных семей. В начале мая были подобраны семьи по принципу пар-аналогов, которые разделили на 3 группы: контрольная, лечение с помощью нистатина (ЛН) и лечение с помощью сиропа, приготовленного на отваре лекарственных растений (ЛР). В качестве показателей состояния пчелосемей рассматривались сила семей, количество печатного расплода и количество кормов. Для контроля за динамикой лечения аскофероза в каждом улье были помечены рамки с расплодом и определено количество инфицированных личинок на квадрате 10 X 10 см. Для облегчения подсчёта квадраты фотографировали и затем производились подсчёты. Перед исследованиями все пчелосемьи были пересажены в чистые продезинфицированные ульи.

Контрольной группе давался сироп в соотношении 1:1 по 1 л каждые 5 дней 3 раза, лечение группы ЛН проводилось по вышеописанной схеме. Сбор «Фитоаск» состоял из травы вероники, чабреца, герани кроваво-красной, чистотела, цветков календулы, хвои сосны, пихты, коры осины, листа эвкалипта. Сбор в соотношении 1:5 заливали холодной водой, доводили до кипения, варили в течение 3-5 мин, настаивали в течение 1 ч и процеживали. На отваре готовился сироп с соотношением сахара и отвара 1:1. Группе ЛР давали сироп по 1 л каждые 5 дней 3 раза.

Инфицированных личинок перед лечением было в среднем в контрольной группе 16 ± 4 шт., ЛН – 18 ± 2 и ЛР – 19 ± 3 на квадрат. Для подтверждения эпизоотологического диагноза нами были взяты пробы мумий личинок и на них были обнаружены плодовые тела гриба *Ascosphaera apis*. В поле зрения микроскопа эти тела хорошо видны при исследовании свежего патологического материала. Лабораторное исследование на аскофероз у пчел включало микроскопию патологического материала и выделение гриба *Ascosphaera apis* в чистую культуру на специальных средах.

Количество инфицированных личинок в последующем подсчитывали через каждые 10 дней в течение 2 месяцев. Через первые 10 дней достоверное снижение количества наблюдалось в группе ЛН 12 ± 2 , контрольной и в группе ЛР, инфицированных мумий было соответственно 17 ± 3 и 16 ± 2 . В дальнейшем в контрольной группе количество инфицированных личинок сохранялось на прежнем уровне 16 ± 4 , а также происходило снижение в группе ЛН – 8 ± 1 и группе ЛР до 9 ± 2 . В начале июня подсчитать число инфицированных мумий мы смогли только в контрольной группе – 9 ± 3 . В группах ЛН и ЛР мы наблюдали единичные выносы погибших личинок на прилётной доске в течение 1-й декады июня, а к концу июня данная картина наблюдалась в контрольной группе.

Таким образом, в течение месяца в пчелосемьях, в которых проводили терапию аскофероза, практически исчезли внешние признаки заболевания. Важной, на наш взгляд, была дальнейшая оценка продуктивности пчелосемей. В среднем от одной пчелосемьи контрольной группы было получено в 2012 г. – $12 \pm 0,5$, в группе ЛН – 24 ± 2 и в группе ЛР –

26±3 кг товарного меда. К сожалению, мы не обладали возможностью установить следы нистатина в меде группы ЛН. Согласно инструкции, препарат малотоксичен и не кумулируется в организме пчел, что предполагает его относительную безвредность. Однако миграция нистатина в данной системе совершенно не изучена. Анализы на содержание остаточных количеств ветеринарных препаратов, в том числе антибиотиков, в меде, реализуемом в России, не делают. Более того, мед, полученный в группе ЛН, никаким образом не может быть отнесен к экологически чистому продукту.

Оценка экономической эффективности показала, что мед, полученный в группе ЛР, имеет большую себестоимость, нежели мёд из «химической» группы. Хотя в нашей стране отсутствует понятие «экологически чистый мед», более того, ГОСТ Р 51074-2003 запрещает использовать в маркировке «экологически чистый», мы сплошь и рядом видим это обозначение. В международных требованиях к экологически чистому пчеловодству обозначено следующее: территория медосбора – экологически чистая территория, запрет на применение синтетических препаратов и др. Следовательно, мед, полученный от пчелосемей группы ЛР, несмотря на большую свою себестоимость, более соответствует требованиям Organic Honey (экологически чистый мед), во всяком случае, это шаг в данном направлении.

Литература

1. Жуков А.А. Биологические свойства гриба *Ascosphaera apis* и меры борьбы с аскоферозом пчёл: дис. ... канд. биол. наук. М., 1995, 110 с.
2. Методические рекомендации по изучению и разработке способов профилактики и борьбы с аскоферозом пчел / сост. А.М.Смирнов и др. М.: ВАСХНИЛ, 1987. 24 с.
3. Мукминов М.Л. Интегрированная система профилактики борьбы с основными микозами пчел: автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2006. 36 с.
4. Смирнов А.М., Григорян А.Г. Диагностика аскофероза // Пчеловодство. 1985. № 7. С 16-17.
5. Смирнов А.М., Туктаров В.Р. Болезни и вредители медоносных пчел. М.: Пенаты, 2004. 136 с.
6. Таранов Г.Ф. Корма и кормление пчел. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Россельхозиздат, 1986. 160 с.
7. Юмагужин Ф.Г. История и современное состояние бурзянской бортовой пчелы. Уфа: АН РБ, Гилем, 2010. 112 с.

УДК: 581.143:577.175.1.05

ПОЛУЧЕНИЕ ОКСИЛИПИНОВЫХ ФРАКЦИЙ ИЗ СЕМЯН ЛЬНА, СТИМУЛИРУЮЩИХ ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАСТЕНИЙ

Умаров И.А.², Халиков Р.М.², Исаев Р.Ф.², Ибрагимов Р.И.¹

¹Башкирский государственный университет

²ООО Малое инновационное предприятие «БИОТЕХНОРМ»

В последние годы выявлена важная роль оксилипинов – оксигенированных производных непредельных жирных кислот в механизмах защиты растений к патогенам и адаптации к неблагоприятным факторам среды. Так, в работах О.Л.Озерецковской и др. [1]

было обнаружено, что арахидоновая кислота представлена в липидной фракции патогенного гриба фитофторы и является высокоэффективным элиситором механизмов защиты картофеля и ряда других культур к различным болезням. Препараты арахидоновой кислоты в настоящее время получают из тканей млекопитающих, морских организмов и ряда микробиологических источников [2]. У высших покрытосеменных растений арахидоновая кислота отсутствует, хотя C_{20} -полиеновая кислота обнаружена у более эволюционно древних хвойных растений и папоротников [3]. Предполагается, что у высших растений защитные функции аналогичные функциям арахидоновой кислоты, реализуются при участии C_{18} -полиеновых кислот, представленных в основном фитостероидными оксипиринами [4, 5]. Однако для защиты растений от патогенов в сельскохозяйственном производстве такие препараты пока не используются.

С учетом вышесказанного, целью настоящей работы была оптимизация методов выделения фитостероидных оксипиринов из семян льна и оценка защитностимулирующих свойств этих биопрепаратов.

Методы исследования

Извлечение оксипиринов из семян льна проводилось двумя способами: прессованием (холодным отжимом) и экстракцией органическими растворителями [6].

Идентификацию оксипириновых компонентов в липидных экстрактах семян льна проводили с использованием ИК-спектроскопии и ЯМР 1H – спектроскопии. Для оценки эффективности полученных фракций оксипиринов, семена ячменя перед посевом обрабатывали путем опрыскивания рабочими растворами биопрепаратов. Для выращивания растений использовали рулонный метод, в соответствии с ГОСТ 12036-85. Измеряли следующие параметры растений: всхожесть семян и энергию прорастания семян (в соответствии с ГОСТ 12038-84), пораженность проростков возбудителями корневых гнилей (грибы родов *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Fusarium* в соответствии с ГОСТ 12045-97).

Результаты и их обсуждение

Экстракт масел растительного происхождения представляет собой смесь триацилглицеринов высших жирных кислот и сопутствующих им веществ, извлекаемых из масличного сырья различными способами. Растительные масла в основном (на 95-97%) состоят из триглицеридов, а оставшаяся часть приходится на воски и фосфолипиды, а также свободные жирные кислоты, токоферолы, витамины и другие вещества, придающие маслам из различных источников окраску, вкус и запах. Это фракция содержит физиологически активные вещества, удаляемые при промышленном производстве растительных масел.

В основе процесса экстракции лежит способность липидов растворяться в органических растворителях: авторы испытали бензин (петролейный эфир), гексан и ацетон. Обычно применяют бензин с низкой температурой кипения ($63-75^{\circ}C$), содержащий значительно меньшее количество ароматических углеводородов, что улучшает качество готового масла, снижает в нем содержание сопутствующих примесей. К недостаткам метода относится вероятность попадания нежелательных химических соединений (ароматические углеводороды керосиновой фракции) в конечный продукт.

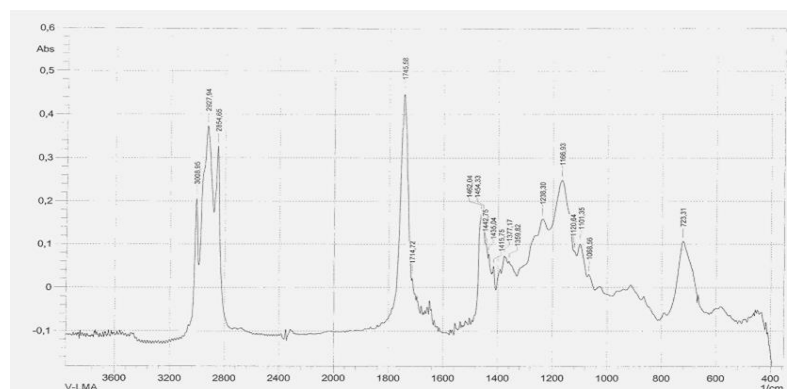
Предварительные эксперименты показали, что оптимальным способом экстракции оксипиринов из семян льна оказался гексан и холодное прессование (отжим): при экстракции ацетоном получался обводненный экстракт, петролейный эфир загрязнял липидные фракции.

Для последующего удаления растворителя из экстракта и сохранения биологически активных компонентов необходимо достигнуть быстрого и полного испарения экстрагента при возможно более низких температурах. Технологически этим требованиям удовлетворяет гексан: его температура кипения равна $69^{\circ}C$, а при дистилляции в ротормном испарителе возгонка начинается при $30^{\circ}C$. Кроме того гексан по экологическим нормам относится к малотоксичным веществам.

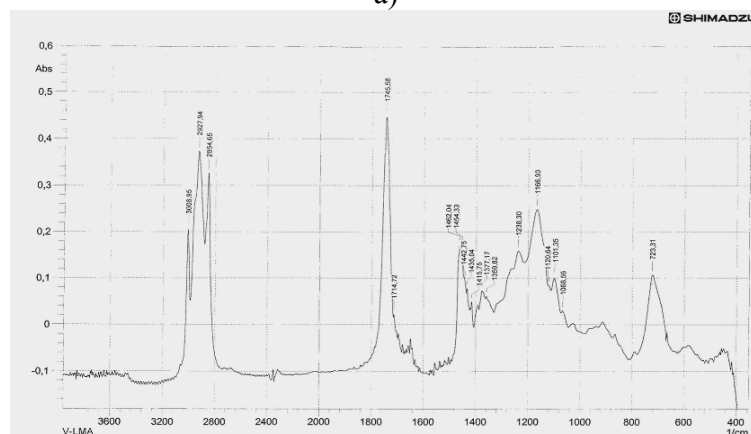
На рис. 1а, б представлены результаты ИК–спектроскопии липидных компонентов холодного отжима и гексанового экстракта из семян льна. Как видно, сигналы полосы поглощения карбонильных групп ($C=O$) характеризующие сложноэфирную связь, находятся в области 1745 см^{-1} . Интервал валентных колебаний двойных связей находится в районе 1653 см^{-1} . Это свидетельствует о том, что липидные экстракты из семян льна, полученные методом холодного отжима более многокомпонентные.

Как известно, что ряд продуктов липидного обмена у растений выполняют функции гормонов, участвующих в реализации программ роста, морфогенеза, устойчивости к неблагоприятным факторам среды, в т.ч. и к микробным фитопатогенам [Тарчевский, 2002]. Предполагается, что окисленные метаболиты полиненасыщенных жирных кислот растений – *фитопростаноидные оксипилены* (в частности жасмоновая кислота) участвуют в защитных реакциях при поражении насекомыми, микроорганизмами. Ключевой частью взаимоотношений фитопатогена с растительной клеткой на супрамолекулярном уровне является «запуск» биосинтеза элиситоров – фитопростаноидных оксипиленов: интермедиатов линоленовой кислоты, в частности жасмоновой кислоты.

При сравнении эффективности концентраций обогащенного препарата фитопростаноидов в составе масел семян льна, для обоих способов выделения, оптимальная концентрация оказалась одинаковой. Однако при холодном отжиме льняного масла энергия прорастания семян была выше относительно контроля на 6%, а при экстракции льняного масла гексаном эти величины оказались на одном уровне (Рисунок 2, 3).



а)



б)

Рис. 1. ИК–спектр липидов семян льна:
 а) оксипиленовые компоненты холодного отжима;
 б) оксипилены гексанового экстракта

При оценке общей зараженности побегов корневыми гнилями также установлено положительное влияние биопрепарата после холодного «отжима». Так, у контрольных растений общая зараженность составила 13%, а в опытных вариантах этот показатель снижался в 1,5 - 2,8 раза (Таблица 1, 2).

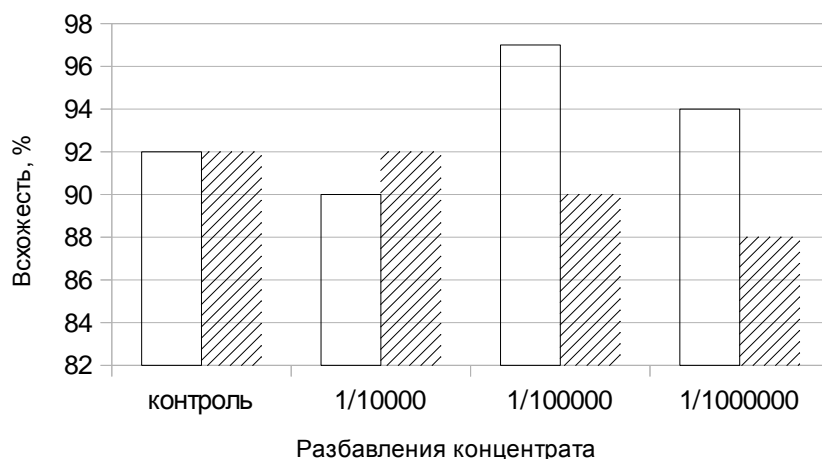


Рис. 2. Влияние липидных экстрактов на всхожесть семян ярового ячменя

Примечание: Заштрихованный столбец - Препаративная форма №1 из семян льна (холодного отжима); Без штриховки - Препаративная форма №2 из семян льна (гексановой экстракции)

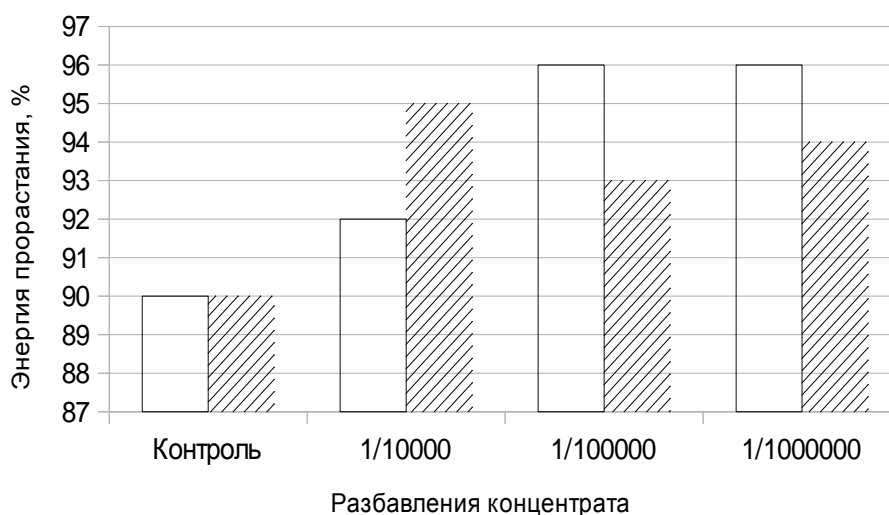


Рис. 3. Влияние липидных экстрактов на энергию прорастания семян ярового ячменя

Примечание: Заштрихованный столбец - Препаративная форма №1 из семян льна (холодного отжима); Без штриховки - Препаративная форма №2 из семян льна (гексановой экстракции)

Таблица 1

Влияние обработки семян рабочими растворами оксилипинового биопрепарата на пораженность растений ярового ячменя возбудителями болезней

Препаративная форма №1 из семян льна (холодного отжима)

Кратность разбавления концентрата	Зараженность болезнями, %			Общая зараженность %
	<i>Alternaria</i>	<i>Helminthosporium</i>	<i>Fusarium</i>	
Контроль (вода)	3,2±0,08	9,0±0,08	1,3±0,05	13,5
1/10000	3,1±0,09	1,8±0,08	1,1±0,07	6,0
1/100000	1,0±0,08	2,4±0,06	0,9±0,09	4,8
1/1000000	2,2±0,07	7,1±0,09	1,2±0,06	10,5

Как видно из параметров повышения устойчивости проростков к корневым гнилям (Таблица 1, 2) более высокий эффект выявлен в модельных опытах при холодном отжиме масла из семян льна. Гексановая экстракция проявляет иммуностимулирующий эффект к болезням при более высоких концентрациях препаративной формы. Это означает, что многокомпонентность биологически активных соединений элиситоров, активность которых превалирует при холодном отжиме. Однако, несмотря на эти отличия, гексановая экстракция позволяет получать липидные концентраты с высокой иммунизирующей активностью.

Таблица 2

Влияние обработки семян рабочими растворами оксилипинового биопрепарата на пораженность растений ярового ячменя возбудителями болезней

Препаративная форма №2 из семян льна (гексановой экстракции)

Кратность разбавления концентрата	Зараженность болезнями, %			Общая зараженность %
	<i>Alternaria</i>	<i>Helminthosporium</i>	<i>Fusarium</i>	
Контроль (вода)	3,3±0,08	6,4±0,08	2,3±0,05	13
1/10000	0	2,2±0,08	0	3,0
1/100000	2,0±0,08	3,1±0,06	0	7,1
1/1000000	2,2±0,07	3,6±0,09	1,1±0,06	7,8

Наилучшие варианты оксилипиновых биопрепаратов из семян льна, выделенных методом холодного отжима, ускорили рост корневой системы клубней картофеля. В варианте с гексановой экстракцией такого положительного эффекта не проявилось.

В результате проведенных работ можно сделать следующие выводы.

Наиболее эффективным экстрагентом для получения фитопростаноидных препаратов из семян льна является гексан. Установлено, что метод холодного отжима масла из семян льна по сравнению с традиционным экстракционным методом является более эффективным для сохранения биологической активности.

Установлено, что предпосевная обработка семян модельной культуры ярового ячменя препаратами из семян масличного льна существенно ускоряет рост корневой системы. Достаточно высокая биологическая активность, низкая себестоимость и экологическая безопасность оксипиринов из семян льна позволяют отнести их к весьма перспективным активаторам защитных реакций сельскохозяйственных культур.

Литература

1. Озерцовская О.Л., Ильинская Л.И., Васюкова Н.И. Механизмы индуцирования элиситорами устойчивости растений к болезням // Физиология растений. 1994. Т.41. №4. С.626-633.
2. Давлетбаев И.М., Петухова Н.И., Зорин В.В. Скрининг грибов — продуцентов арахидоновой кислоты // Биотехнология в ФЦП «Интеграция»: Тез. докл. Всерос. конф.: - СПб: Изд-во СПбГТИ, 1999. - С.144.
3. Алаудинова Е.В., Миронов П.В. Липиды меристем лесобразующих пород центральной Сибири в условиях низкотемпературной адаптации. 1. Характеристика состава жирных кислот фосфолипидов зимующих меристем *Larix sibirica* Ledeb., *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. // Химия растительного сырья. 2009. №2. С.65-70.
4. Капустин М.А., Гавриленко Н.В., Курченко В.П. и др. Влияние обработки семян тритикале сорта «Микола» синтетическими простагландинами на биохимические процессы в проростках // Труды Белорус. госуниверситета. 2011. Т.6. Ч.1. С.231-247.
5. Durand T., Bultel-Ponce V., Guy A. et al. Isoprostanes and phytoprostanes: bioactive lipids. // Biochimie. 2011. V.93. N.1. P.52-60.
6. Умаров И.А., Гилязетдинов Ш.Я., Халиков Р.М., Ибрагимов Р.И. Оксипириновые биопрепараты для использования в защите картофеля // Третья Всероссийская школа-конференция «БИОМИКА – НАУКА XXI». – Уфа: ИБГ УНЦ РАН, 2012. С.107-108.
7. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. // Основы биотехнологии — Москва: Изд. Центр Академии, 2005. 208с.

УДК 632.6; 579.841.11

ИНДУКЦИЯ УСТОЙЧИВОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР СЕМЕЙСТВА *BRASSICACEAE* К АЛЬТЕРНАРИОЗУ 1-ОКСИФЕНАЗИНОМ

Феклистова И.Н.

Белорусский государственный университет, Беларусь

Введение

Самым распространенным способом борьбы с возбудителями заболеваний растений и вредителями сельскохозяйственных культур является использование химических средств защиты. Основное преимущество данного метода – получение «быстрого ответа».

Широкое применение пестицидов имеет негативные последствия для окружающей среды, поскольку химические препараты, как правило, не разлагаются без остатка, что

приводит к накоплению их в почве и донных отложениях, и, как следствие – во фруктах, овощах, в тканях рыб и животных. Кроме того, регулярное использование пестицидов приводит к возникновению устойчивых форм сорняков и фитопатогенных микроорганизмов, что способствует ухудшению фитосанитарной обстановки.

Использование химических препаратов в защищенном грунте нежелательно по санитарно-гигиеническим соображениям, а в отдельных странах ограничено законодательством. Например, в Республике Беларусь применение пестицидов и агрохимикатов в условиях защищенного грунта разрешается только в исключительных случаях при массовом размножении вредителей [1].

Альтернативой применению пестицидов являются биологические методы защиты растений с использованием ризосферных бактерий, синтезирующих различные антибиотики, фитогормоны, например индоллил-3-уксусную кислоту (ИУК) и гиббереллины, а также низкомолекулярные соединения и ферменты, в частности, АСС-дезаминазу, предотвращающую синтез стрессового растительного гормона этилена, что также приводит к улучшению роста растений [2, 3] и уменьшает стрессовое воздействие на растение неблагоприятных условий среды. Немаловажную роль в обеспечении ризосферными бактериями защитных функций играет индукция ими системной устойчивости у растений [3 – 5]. Индуцируемая ризосферными бактериями системная устойчивость растений относится к ISR-типу (от английского induced systemic resistance) и вклад ее в обеспечении уровня защиты растений от патогенов и стимуляции их роста достаточно велик. Индукторами системной устойчивости могут выступать сидерофоры, связывающие ионы железа, липополисахариды, бактериальные природные антибиотики – т.е. соединения, относящиеся к биогенным элиситорам. Они не токсичны, не оказывают губительного влияния на экологическую систему и безопасны для человека. Целенаправленная разработка индукторов устойчивости растений и методов их применения требует знаний ключевых биохимических реакций, воздействуя на которые можно активизировать весь генетический потенциал защитных средств растений. Таким образом, разработка подходов создания нового поколения биогенных элиситоров, обеспечивающих пролонгированную защиту растений от заболеваний бактериальной и грибной этиологии и повышение их урожайности является актуальным направлением.

У растений, обработанных индуцирующими агентами на ранних стадиях развития, активируются множественные защитные ответы, которые выражаются в формировании химических и физических барьеров на пути проникновения и развития патогена. Таким образом, у растений возникает индуцированная системная устойчивость к биотическим и абиотическим факторам. Вместе с тем, детерминанты, синтезируемые бактериями и обуславливающие запуск каскада защитных реакций, исследованы недостаточно. Данные, описанные в современной литературе, касаются, в основном, липополисахаридов и некоторых сидерофоров. Механизмы индукции системной устойчивости, запускаемые непатогенными бактериями, относятся к отдельному типу ISR взаимодействий и являются наиболее перспективными с практической точки зрения.

В настоящей работе описана индукция устойчивости у сельскохозяйственных культур семейства Капустные (*Brassicaceae*) к возбудителям альтернариоза с помощью антибиотика феназинового ряда – 1-оксифеназина, синтезируемого ризосферными бактериями *Pseudomonas aureofaciens* КМБУ phz 127/11.

Материалы (объекты) и методы исследования

Культуру *P. aureofaciens* КМБУ phz 127/11 выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл в среде, содержащей Difco пептон (2%), NaCl (0,5%), KNO₃ (0,1%), фруктозу (2%). Бактерии культивировали при 28 °С в темноте с

азрацией в течение 48 ч. Выделение антибиотиков феназинового ряда осуществляли по схеме, предложенной М. Levitch и Е. Stadtman [6].

Идентификацию феназиновых соединений осуществляли с помощью жидкостного хроматографа с масс-спектрометрическим детектором LCMS-QP8000α (Shimadzu, Япония) согласно методу [6].

В работе использованы семена капусты белокочанной «Июньская», индау посевного «Рококо» и рапса.

Элиситорную активность бактериальных метаболитов (феназиновых антибиотиков) исследовали в модельной системе искусственного заражения проростков растений спорами фитопатогенных грибов: *Alternaria brassicicola* в случае рапса, *Alternaria brassicae* – в случае индау и капусты. Эксперименты проводили по методике [7]. Эффективность действия элиситора оценивали на 21-е сут культивирования растений, исходя из соотношения пораженных растений к их общему количеству в пробе.

Результаты и их обсуждение

Известно, что бактерии рода *Pseudomonas*, а также метаболиты, ими синтезируемые, индуцируют возникновение системной устойчивости у растений к фитопатогенам, в том числе – к возбудителю альтернариоза [8]. Ранее нами было показано, что антибиотики феназинового ряда, синтезируемые бактериями *P. aurantiaca*, способны индуцировать системную устойчивость у сельскохозяйственных растений к возбудителям альтернариоза [7, 9], в связи с чем интересным представлялось исследование элиситорных свойств феназинов, синтезируемых *P. aureofaciens*.

В работе использован штамм *P. aureofaciens* КМБУ phz 127/11, полученный в результате химического мутагенеза штамма *P. aureofaciens* КМБУ phz 127, выделенного из донных отложений бухты Халонг (Южно-Китайское море, Вьетнам), с последующим отбором на устойчивость к токсическому аналогу метаболитов ароматического пути – 6-диазо-5-оксо-L-норлейцину.

Антибиотики феназинового ряда выделяли путем экстрагирования трихлорметаном, после чего анализ чистоты проводили спектрофотометрическим методом и определяли концентрацию действующего вещества. Масс-спектрофотометрический анализ вещества, выделенного из культуральной жидкости бактерий *P. aureofaciens* КМБУ phz 127/11, показал наличие 1-оксифеназина – $C_{12}H_7N_2OH$ (молекулярная масса 196 Да, максимумы поглощения соответствуют 260 и 387 нм). Уровень синтеза 1-оксифеназина исследуемым штаммом – 180 мг/л.

Элиситорную активность 1-оксифеназина, синтезируемого *P. aureofaciens* КМБУ phz 127/11, исследовали на растениях трех различных видов сельскохозяйственных культур семейства Капустные (*Brassicaceae*), широко возделываемых на территории Республики Беларусь (капусты белокочанной, рапса и индау).

Для детального исследования способности 1-оксифеназина индуцировать системную устойчивость растений была выбрана система искусственного заражения проростков растений спорами фитопатогенных грибов *A. brassicicola* либо *A. brassicae*, поскольку альтернариоз – одна из основных болезней семенников и семян капустных культур, главная причина их низкой всхожести.

Заражение растений в контрольном варианте регистрировали микроскопией, сопровождаемой характеристикой прорастаемых спор, а также регистрацией симптомов развития болезни, характерных для каждого вида растений. На инфицированной рассаде появляются черные некротические полосы и пятна на семядолях и подсемядольных коленах, что приводит к увяданию растения. В процессе заражения споры *A. brassicicola* и *A. brassicae* прорастали с последующим внедрением гиф в ткани растения и образованием характерных некротических пятен на листьях.

Установлено, что растения всех исследованных нами видов сельскохозяйственных культур способны формировать системную устойчивость в ответ на обработку почвы тестируемым элиситором. Внесение 1-оксифеназина в концентрации 30 мкг/мл в прикорневую зону растений, зараженных впоследствии спорами *Alternaria* sp. – возбудителя альтернариоза, приводит к снижению количества пораженных растений до 57% (таблица). Эффективность применения препарата антибиотика феназинового ряда на растениях капусты и рапса составляла 52,0% и 57,3% соответственно, тогда как на растениях индау была несколько ниже и достигала 46,3 %.

Таблица.

Влияние 1-оксифеназина, синтезируемого *P. aureofaciens* КМБУ phz 127/11, на поражаемость растений семейства капустные альтернариозом

Культура	Поражаемость растений, %	
	Контроль	опыт
Капуста белокочанная	87,6	35,6
Рапс	90,1	32,8
Индау посевной	70,9	24,6

Следует отметить тот факт, что в вегетационных сосудах с контрольными вариантами семян наблюдалось заражение растений грибной инфекцией и загнивание проростков, тогда как у растений, обработанных препаратом 1-оксифеназина, загнивание проростков не отмечалось, а поражение грибной инфекцией носило единичный характер.

Известно, что каскад защитных реакций, запускаемый при индукции системной устойчивости включает в себя генерацию активных форм кислорода, накопление фитоалексинов и накопление или повышение активности специфических белков, обладающих гидролитической активностью (например, хитиназы и глюканы). Поскольку феназиновые антибиотики при взаимодействии с клеткой способны влиять на свободно-радикальные процессы, нами было выдвинуто предположение, что, описанная в работе устойчивость к возбудителю альтернариозу является следствием индукции системной устойчивости у сельскохозяйственных культур.

Поскольку использованная нами система проведения исследования позволила пространственно разделить элиситоры бактериального происхождения (1-оксифеназин) и фитопатогенные агенты, то приведенные результаты позволяют сделать вывод об индукции системной устойчивости у сельскохозяйственных культур семейства Капустные бактериальными метаболитами.

Литература

1. Постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 29.12.2005 N 280 "Об утверждении санитарных правил и норм 2.2.3.13-58-2005 "Гигиенические требования к устройству и эксплуатации теплиц и тепличных комбинатов".
2. Knoester, M. Systemic resistance in Arabidopsis induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application / M. Knoester, C.M. Pieterse, J.F. Bol, L.C. Van Loon // Mol. Plant Microbe. Interact. – 1999. – Vol. 8. – P. 720-727.
3. Meziane, H. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants / H. Meziane, I. Van der Sluis, L.C. Van Loon, M. Höfte, P.A. Bakker // Mol. plant pathol. – 2005 – Vol. 6. – P. 177–185.
4. Whipps, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere / J.M. Whipps // J. of Experimental Botany. – 2001 – Vol. 52, Roots Special Issue. – P. 487–511.

5. Park, M.R. Identification of an ISR-related metabolite produced by *Pseudomonas chlororaphis* Ob against the wildfire pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco / M.R. Park, Y.C. Kim, J.Y. Park, S.H. Han, K.Y. Kim, S.W. Lee, I.S. Kim // J Microbiol Biotechnol. – 2008. – Vol. 18, № 10. – P. 1659–1662.
6. Feklistova, I.N. Obtaining *Pseudomonas aurantiaca* strains capable of overproduction of phenazine antibiotics / I.N. Feklistova, N.P. Maksimova // Microbiology. – 2008. – Vol. 77. – No. 2. – P. 176–180.
7. Кулешова, Ю.М. Индукция системной устойчивости растений рапса к фитопатогенам метаболитами бактерий *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas aurantiaca* / Ю.М.Кулешова, М.Н.Федорович, И.Н. Феклистова // Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем: Труды Белорусского государственного университета. Т. 6., ч. 1 / под ред. В.М. Юрина. – Минск: 2011. – С. 168–173.
8. Karthikeyan, M. Induction of resistance in host against the infection of leaf blight pathogen (*Alternaria palandui*) in onion (*Allium cepa* var *aggregatum*) / M. Karthikeyan, V. Jayakumar, K. Radhika, R. Bhaskaran, R. Velazhahan, D. Alice // Indian Journal of Biochemistry & Biophysics. – 2005. – Vol. 42. – P. 371–377.
9. Sadovskaya, L.E. Antibiotic phenazine induces systemic resistance in plant to phytopathogenic fungi *Alternaria* / L.E.Sadovskaya, I.N. Feklistova // Biologically active substances and materials: Fundamental and Applied Problems: Proceedings of the International Interdisciplinary Scientific Conference, Novy Svet. – 2013. – Vol. 1. – P. 240.
10. Van Loon, L.C. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria / L.C. Van Loon, P.A.H.M. Bakker, C.M.J. Pieterse // Annu. Rev. Phytopathol. – 1998. – Vol. 36. – P. 453-483.

УДК 577.1

ТОЛЕРАНТНОСТЬ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ И РЖИ К ДЕЙСТВИЮ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Юмагужина З.М., Шпирная И.А., Цветков В.О., Ибрагимов Р.И.

Башкирский государственный университет
tsvetkov@bashedu.ru

Одна из острейших проблем современности - глобальное, прогрессирующее антропогенное загрязнение атмосферы. Среди химических загрязнителей особо стоит отметить тяжелые металлы, многие из которых обладают высокой биологической активностью и способны аккумулироваться в различных тканях, не подвергаясь биодеградации. Тяжелые металлы, как и другие химические загрязнители, попадают в среду обитания человека в результате не только природных процессов (извержение вулканов, геохимические аномалии), но и, главным образом, вследствие интенсивного развития промышленности, нерационального использования природных ресурсов и урбанизации жизни общества.

Прежде всего, представляют интерес те металлы, которые в наибольшей степени загрязняют атмосферу ввиду использования их в значительных объемах в производственной деятельности и в результате накопления во внешней среде представляют серьезную опасность с точки зрения их биологической активности и токсических свойств. К ним

относят свинец, ртуть, кадмий, цинк, висмут, кобальт, никель, медь, олово, сурьму, кобальт, марганец, цинк, молибден и мышьяк.

Опасность загрязнений, вызванных тяжелыми металлами, обусловливается токсическим действием их на живые объекты и способностью включаться в пищевые цепи, на которых основан круговорот химических элементов в природе. При этом основными биологическими аккумуляторами тяжелых металлов являются растения.

Эффект воздействия тяжелых металлов проявляется в виде комплекса негативных изменений на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях, что в итоге приводит к ингибированию роста и накоплению биомассы растений, снижению фотосинтетической активности и продуктивности [3,5,7]. Опасность металлов усугубляется еще и тем, что они обладают кумулятивным действием и сохраняют токсические свойства в течение длительного времени [8,10].

Тяжелые металлы поступают в растение главным образом через корневую систему. Поэтому в корне происходит первичная реакция растения на их воздействие, которую можно четко проследить по ингибированию роста корней. Это связано с тем, что корни являются первым барьером на пути транспорта металлов из почвы в растение, и именно корень берет на себя основную функцию по их аккумуляции и детоксикации. Под влиянием тяжелых металлов уменьшаются длина главного корня и количество боковых корней, отмирают корневые волоски, снижается биомасса корней. Например, уменьшение длины и биомассы корня в присутствии кадмия отмечено у растений гороха, подсолнечника [1]. Эти изменения в корневой системе приводят к снижению поглощения питательных веществ и воды, что негативно отражается на росте и развитии всего растения, а при высоких концентрациях тяжелых металлов может вызвать и его гибель.

Исследованию воздействия тяжелых металлов на процессы роста растений посвящено довольно большое число публикаций. Анализ этих работ показывает, что торможение роста является общим проявлением токсичности тяжелых металлов для растений, что связано в первую очередь с их прямым действием на деление и растяжение клеток [9]. По этой причине корень часто используется в качестве тест-объекта при изучении токсического действия различных тяжелых металлов.

Из литературы известно, что о степени воздействия ионов тяжелых металлов на растения можно судить по коэффициенту толерантности [6]. Толерантность характеризует способность растения переносить действие неблагоприятных факторов и сохранять в таких условиях способность к размножению [2], что способствует поддержанию постоянства внутренней среды (гомеостаза) и осуществлению жизненного цикла в условиях действия стрессоров.

Для расчета индекса толерантности растений к ионам тяжелых металлов выбрали элементы, являющиеся токсичными для растений - Pb^{2+} , Cd^{2+} , и элементы, необходимые для метаболизма растительной клетки - Co^{2+} , Zn^{2+} .

Проращивали семена ржи и пшеницы при концентрации ионов ТМ 100 мкМ и 1мМ в течение 3 и 5 суток. После этого определяли длину корней проростков и рассчитывали индекс толерантности растений к действию тяжелых металлов[4].

Полученные результаты показывают, что во всех вариантах эксперимента происходило ингибирование роста корней проростков. Наибольший отрицательный эффект оказывали ионы кадмия и свинца, так, у 3-суточных проростков пшеницы присутствие ионов кадмия приводило к заметному снижению ИТ у 3- и 5-суточных проростков как пшеницы, так и ржи. При концентрации 100 мкМ и 1мМ значение ИТ у 3-суточных проростков пшеницы составило 0,95 и 0,73, соответственно; у 5-суточных - 0,92 и 0,70, соответственно.

Аналогичный эффект имеет место и у проростков ржи – с увеличением концентрации ионов ТМ и времени их воздействия ИТ снижается.

При внесении в среду прорастания семян солей кобальта и цинка – элементов

минерального питания, показатели роста корней выше по сравнению с действием ионов свинца и кадмия. В их присутствии ИТ снижается менее значительно и составляет у пшеницы при 100мкМ и 1мМ – 0,92 и 0,99, соответственно. В целом, анализ данных изменения ИТ при действии различных ионов тяжелых металлов на корневую систему проростков пшеницы и ржи показывает, что все используемые металлы оказывают негативное влияние на рост корней проростков злаков.

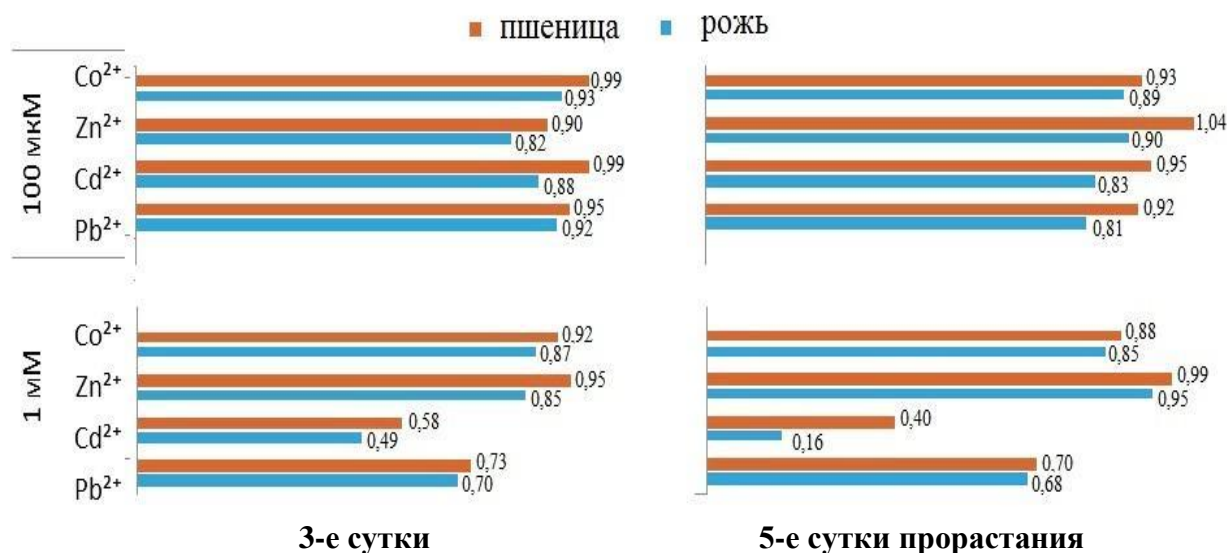


Рис.1. Индекс толерантности пшеницы и ржи к воздействию ионов тяжелых металлов.

Токсичные металлы, свинец и кадмий, оказывают большее негативное действие, нежели цинк и кобальт, участвующие в метаболизме. При повышении концентрации металлов в среде прорастания семян происходило увеличение времени воздействия, также отмечалось негативное воздействие на рост корневой части проростков.

В целом, проростки ржи более чувствительны к воздействию ионов ТМ по сравнению с проростками пшеницы, что выражается в более низком ИТ.

Литература

1. Azevedo H., Pinto C.G.G., Fernandes J., Loureiro S., Santos C. Cadmium effects on sunflower growth and photosynthesis // J. Plant. Nutr. 2005a. V. 28.P. 2211–2220.
2. Clemens S. Toxic Metal Accumulation, Responses to Exposure and Mechanisms of Tolerance in Plants //Biochimie. 2006. V. 88. P. 1707–1719.
3. Башкин В.Н., Касимов Н.С. Биогеохимия М.: Научный мир, 2004. 648 с.
4. Головщиц, В.А. Информационно-справочные материалы по экологии (для участников общественного экологического движения). – Минск, 2002. – С.72.
5. Демидчик В.В., Соколик А.Н., Юрин В.М. Токсичность избытка меди и толерантность к нему растений // Успехи соврем. биологии. 2001. Т. 121. С. 511-525.
6. Домаш В.И., Шарпио Т.П., Забрейко С.В., Сосновская Т.Ф. // Биоорган. химия. 2008. Т. 34.№3. С. 353–357.
7. Зарипова Н.Р., Холодова В.П. Регуляция тяжелыми металлами экспрессии хлоропластных генов ячменя на транскрипционном и про транскрипционном уровнях// Физиология растений. 2011. Т. 58.С. 898–906.
8. Минеев В.Т., Макарова А.И., Гришина Т.А. Тяжелые металлы и окружающая среда в условиях современной интенсивной химизации. Кадмий // Агрохимия. 1981. № 5. С. 146–155.

9. Серегин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 4. С. 606–630.
10. Ягодин Б.А., Виноградова С.Б., Говорина В.В. Кадмий в системе почва – удобрения – растения – животные организмы и человек // Агрехимия. 1989. № 5. С. 118–130.

УДК 577.127:547.973

ПЛАСТИЧНОСТЬ СОСТАВА ФЛАВОНОИДОВ, НАКАПЛИВАЕМЫХ РАСТЕНИЯМИ ПОЛЫНИ СОЛЯНКОВИДНОЙ НА СОЛОНЧАКАХ БАШКИРСКОГО ЗАУРАЛЬЯ.

Щербаков А. В.¹, Черепенко Н.Д.¹, Усманов И.Ю.²

¹Башкирский государственный университет, г. Уфа Россия,
Республика Башкортостан, г. Уфа, 450074, ул. Заки Валиди, 32. Тел./факс: +7 (347) 229 96 30
E-mail: Humanist314@rambler.ru

²Уфимский государственный университет экономики и сервиса,
Республика Башкортостан г.Уфа, 450078, ,Чернышевского, 145
Тел (347) 252-77-05
E-mail: iskander.usmanov@mail.ru

Введение

Народная медицина, как в глубокой древности, так и в наше время, широко использует различные виды рода «полынь». Порошок цитварного семени, настоек травы и дарминов употребляют для изгнания круглых червей - аскарид и остриц, а также наружно в виде компрессов при ревматизме, подагре, при невралгиях, для обмывания и примочек при повреждении тканей, аллергии, не заживляющих ранах и язвах, ожогах, экземе.

Биологически активное действие этих растений в той или иной степени связано с содержащимися в них флавоноидами, являющихся эффективными антиоксидантами [1]. При этом качественный и количественный состав накапливаемых этими растениями флавоноидов изучен крайне не достаточно. Поэтому большой практический интерес представлял предварительный анализ образцов этих растений методом ВЭЖХ.

Целью данных исследований было изучение качественного и количественного состава флавоноидов в различных органах растений, собранных на территории Баймакского и Хайбулинского районов РБ и дальнейшая отработка схемы последовательного применения растворителей различной полярности для экстракции этих соединений.

Экспериментальная часть

Объектами служили образцы растений полыни солянковидной, собранные на солончаках Баймакского и Хайбулинского районов РБ.

Сырье сушили до воздушно-сухого состояния, измельчали до размера частиц 1 – 2 мм, затем фракционировали с использованием растворителей различной полярности следующим способом:

Последовательность экстрагентов : (гексан → диэтиловый эфир → метил-трет-бутиловый эфир → этилацетат → бутанол → 70%-этанол).

Количество извлеченных экстрактивных веществ определяли весовым методом после удаления растворителя.

Качественное и количественное определение флавоноидов растений проводили методом ВЭЖХ. Хроматографический анализ проводили на системе WatersBreeze со спектрофотометрическим детектором при длине волны 275 нм. Определение проводили при градиентном элюировании на колонке Nova-PakC18 4 мкм, 3,9x300 мм [2].

В таблице 3 приведены параметры градиента.

Таблица 1

Параметры градиента

Время, мин	Вода, %	Ацетонитрил, %
0	90	10
5	90	10
10	80	20
25	50	50
35	90	10
40	90	10

Для оценки общей потенциальной антиоксидантной активности выявленных флавоноидов был использован показатель суммарной неспецифической антиоксидантной активности накопленных флавоноидов - антиоксидантный статус (АС), который был рассчитан как сумма произведений содержания отдельных флавоноидов, обнаруженных в сырье (мг/г сухой массы) на стандартные показатели оценки их антиоксидантной активности [3].

Все измерения проводились в 4-5 аналитических и 3-4 биологических повторностях.

Результаты и обсуждение

Всего в образцах полыни солянковидной было выявлено 13 соединений, из которых было идентифицировано 10- нарингин, рутин, таксифолин, физетин, морин, дигидрокверцетин, кверцетин, нарингенин, гесперетин, байкалеин. В некоторых образцах отдельные флавоноиды отсутствовали, либо были обнаружены в следовых количествах. Стабильно встречались во всех образцах нарингин, рутин, таксифолин, физетин и морин.

Суммарный антиоксидантный статус флавоноидов, выявленных в образцах полыни солянковидной, варьировал в диапазоне от 33,93 до 50,57 мМ ТЕАС, в зависимости от места сбора образцов. При этом было обнаружено, что максимум накопления полынью суммы выявленных флавоноидов не совпадал с максимумом их потенциальной антиоксидантной активности.

Наблюдаемая картина может быть объяснена тем, что у растений полыни солянковидной, очевидно, высокий антиоксидантный эффект достигается за счет преимущественного накопления очень ограниченного списка флавоноидов с высокой антиоксидантной активностью, в первую очередь- в негликозилированной форме, а не за счет повышения содержания всех соединений.12-04-97023

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ р_положье_а № 12-04-97023.

Литература

1. Меньщикова Е.Б. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков, И.А. Бондарь, Н.Ф. Круговых, В.А. Труфакин. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.

2. Косман В.М., Зенкевич И.Г. Информационное обеспечение для идентификации фенольных соединений растительного происхождения в обращен-но-фазовой ВЭЖХ. Флавоны, флавонолы, флаваноны и их гликозиды // Растительные ресурсы. - 1997, Т. 33 - №2 - С. 14-26.
3. Тюкавкина Н.А. и др. Органическая химия. Спец курс в 2 кн. Кн.2. М.:Дрофа, 2008.-592 с.: илл.

УДК 577.127:547.973

ПЛАСТИЧНОСТЬ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ОСНОВНОГО И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО МЕТАБОЛИЗМА РАСТЕНИЙ

Щербаков А. В.¹, Федорова Т.П.¹, Усманов И.Ю.².

¹Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, 450074, ул. Заки Валиди, 32. Тел./факс: +7 (347) 229 96 30
E-mail: Humanist314@rambler.ru

²Уфимский государственный университет экономики и сервиса, Республика Башкортостан г.Уфа, 450078, Чернышевского, 145
Тел (347) 252-77-05
E-mail: iskander.usmanov@mail.ru

Введение

Проблема адаптации остается одной из центральных в биологии. Исследование отдельных приспособительных реакций ведется на протяжении десятилетий, и перечень частных адаптаций охватывает все уровни организации от молекулярно-генетического до популяционного и все основные факторы среды. Выяснилось, что практически любой физиологический и биохимический процесс, или анатомо-морфологический признак, в тех или иных условиях может стать адаптивным. Значительно меньше до последнего времени уделялось внимания анализу взаимодействия частных приспособительных реакций. Более того, почти не обсуждались сами принципы анализа взаимодействия различных физиологических систем в обеспечении общей выживаемости растений. Так, часто сравнительный анализ частных адаптаций сводился к поиску “главной” реакции, которая обеспечивала бы приспособление организма в целом. В других случаях подчеркивалась какая-либо отдельная черта взаимодействия частных адаптаций (например, их обязательная сопряженность при формировании обобщенной адаптивной реакции [“general adaptive sindrom”: Leshem, 1994] или конкуренция за энергоресурсы между частными адаптивными реакциями). Вопрос о “законах композиции” [Keddy, 1992] в настоящее время более четко сформулирован полевыми экологами в концепциях типов жизненных стратегий растений [Grime, 1978, Grime e.a., 1989] и поливариантности онтогенеза [Жукова, 1986]. Обе концепции констатируют возможность существования самых разных комбинаций признаков растений. Однако обе концепции носят по отношению к физиологии растений феноменологический характер [Усманов, 1989]. Поэтому открытым остается вопрос об адаптивном значении форм взаимодействия различных морфофизиологических механизмов и о степени их взаимосвязанности у видов с различающимися эколого-ценотическими стратегиями.

Целью работы был анализ картины корреляций между параметрами, являющимися маркерами действия компенсаторных механизмов, обеспечивающих существование и выживание растений разных видов в норме и при стрессе.

Объекты и методы.

Исследования проводились в 1992-2011 гг. Объектами служили выращиваемые на разных концентрациях элементов минерального питания (среда Хогланда- Арнона, далее Х-А) проростки культурных растений: кукуруза (*Zea mays L.*) сорт Буковинская 14, каланхоэ перистое (*Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers.*), пшеница (*Triticum aestivum L.*) сорт Саратовская-55 и соя (*Glycine max L.*) сорт Наталка. Кроме того, были изучены дикорастущие виды, собранные в разные годы на территории Башкирского Зауралья в местообитаниях, различающихся уровнем стрессовой нагрузки: Можжевельник казацкий (*Juniperus sabina L.*), Солодка Коржинского (*Glycyrrhiza korshinskyi*) и 2 вида тысячелистника — обыкновенный (*Achillea millefolium L.*) благородный (*Achillea nobilis L.*).

Таблица 1. Соотношение потенциально возможных и реализованных корреляций у культурных растений.

Культура	Фон Х-А	Возм. число корреляций	% реализованных корреляций:			
			всего	(+) корр.	(-) корр.	(+) : (-)
Zea mays	0.5	432	41.7	30.8	10.9	2.8 : 1
	0.01	216	20.4	14.8	5.6	2.6 : 1
Kalanchoe pinnatai *	0.5	576	79.3	69.4	9.9	7.0 : 1
	0.01	252	69.0	57.9	11.1	5.2 : 1
Triticum aestivum	0.1	84	26.2	26.2	-	1,0: 0
	0.01	168	28.6	22.0	6.6	3.3 : 1
Glycine max **	0.5	143	25.4	23.8	1.6	14,9: 1
	0.01	90	31.1	27.7	3.4	8.1 : 1

Примечание: * усредненные данные по двум сериям экспериментов;

** - усредненные данные по трем сериям экспериментов.

Результаты и обсуждение

Результаты корреляционного анализа показателей культурных растений в норме и при дефиците элементов минерального питания представлены в таблице 1.

Как следует из представленных данных, возникновение стресса, связанного с дефицитом элементов минерального питания существенно меняет общую корреляционную картину — изменяются доля реализованных корреляционных связей и соотношение между корреляциями разных знаков

Результаты корреляционного анализа показателей специализированного метаболизма - флавонолов группы кверцетина- у дикорастущих растений представлены в таблице 2. Приведенный показатель числа возможных корреляций в обоих случаях (таб. 1 и 2) определялся на основе общего перечня регистрируемых параметров .

Как следует из представленных данных, картина корреляционных связей, выявленных между физиологическими показателями, у дикорастущих видов также нестабильна. В большинстве случаев варьирует как доля реализованных корреляций от потенциально возможных, так и соотношение между положительными и отрицательными корреляциями.

Анализ всего массива корреляций (см. Табл.1, 2) показал, что между различными морфофизиологическими параметрами возможно существование трех типов связи:

Таблица 2. Соотношение потенциально возможных и реализованных корреляций у дикорастущих растений.

вид	Вариант	Возм. число корреляций	% реализованных корреляций:			
			всего	(+) корр.	(-) корр.	(+) : (-)
<i>Juniperus sabina L</i>	2007г					
	мужские раст.	240	1,66	1,66	0	-
	женские раст	552	2,35	0,72	1,63	0,44
	2008 г					
	мужские раст.	90	5,55	5,55	0	-
	женские раст	210	2,85	2,85	0	-
<i>Glycyrrhiza korshinskyi</i>	2009 г	42	7,14	4,76	2,38	2
	2010 г	56	19,6	8,9	10,7	0,83
<i>Achillea millefolium L.</i>	2009 г	270	2,22	1,9	0,32	6
	2010 г	110	12,7	7,3	5,42	1,33
<i>Achillea nobilis L.</i>	2007г	210	11,9	11,9	0	-

сильные корреляции - часто встречающиеся корреляционные связи с постоянным знаком. Примеры параметров с сильной корреляцией для разных видов:

кукуруза- масса растения - рН;

каланхоэ- масса растения - общее потребление ионов;

пшеница- относительный прирост биомассы (далее -RGR)- прирост подземной части;

соя- масса растения - общее потребление ионов.

тысячелистник обыкновенный- содержание флавоноидов в органах и морфологические показатели листового аппарата

можжевельник казацкий- содержание рутина и изокверцетина

солодка Коржинского — содержание рутина и нарингенина, содержание нарингина и изокверцетина

2) умеренные корреляции - часто встречающиеся корреляционные связи с меняющимся знаком; Примеры параметров: с умеренной корреляцией:

кукуруза- масса растения - прирост длины надземной части;

каланхоэ RGR - рН;

пшеница- RGR - рН;

соя- масса растения — транспирация;

тысячелистник обыкновенный- содержание рутина и кверцетина

можжевельник казацкий- содержание рутина и нарингенина

солодка Коржинского — содержание нарингина и нарингенина

слабые корреляции- редко встречающиеся корреляции с меняющимся знаком.

Примеры слабых корреляций у исследованных культур:

кукуруза- потребление азота - рН;

каланхоэ- транспирация - рН;

пшеница-потребление калия - рН;

соя- прирост длины надземной части - прирост длины подземной части.

тысячелистник обыкновенный-содержание нарингина и нарингенина

можжевельник казацкий- содержание кверцетина и изокверцетина

солодка Коржинского — содержание изокверцетина и рутина

Таким образом, по нашему мнению, получены достаточно веские доказательства в пользу предположения о том, что в растениях преобладающим типом связи между отдельными признаками, процессами и механизмами являются “низкоинформационные”

связи, где на каждый из физиологических процессов оказывает влияние большое число различных событий, и каждый из этих механизмов обладает достаточной автономностью (тотипатентностью). Это имеет место у событий как основного, так и специализированного метаболизма. В силу этого в любой из моментов проведения эксперимента могут быть обнаружены любые варианты связей, в том числе рассчитываемые как статистически значимые корреляции.

Литература

- 1 Leshem T. et al. Plant membranes. London Kluwer Acad. Publ, 1992. - 265 p
2. Keddy P.R., Twollan-srutt L., Wisheu I.C. Competitive effect and response rankings in 20 wetland plants: are they consistent across three environments? J. of Ecology, 1994. 82. P. 635-643
3. Grime G.P. Plant strategies and vegetation processes. Chichester etc., J. Wiley & sons, 1979. - 222 p.
4. Grime J.P., Hodgson J.G., Hunt R. Comparative plant ecology: a functional approach to communities of British species. L.: Unwin Hyman publ., 1988. - 892 p.
5. Жукова, Л.А. Поливариантность онтогенеза луговых растений/ В кн.: Жизненные формы в экологии и систематике растений. М.: МГПИ, 1986. С.104—114.
6. Усманов, Функциональный анализ типов адаптивных стратегий растений. Автореф. дисс. на соиск. докт. биол. наук. Киев: Ин-т ботаники АН УССР им. Н.Г. Холодного, 1989. - 253 с.
7. Тюкавкина Н.А. и др. Органическая химия. Спец курс в 2 кн. Кн.2. М.: Дрофа, 2008. 592с

УДК 632.913:633.1

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ТОЛЕРАНТНОСТИ РАСТЕНИЙ К ФИТОМИКОПАТОГЕНАМ И ПЕСТИЦИДАМ

Ямалеева А.А., Набеева Р.А., Усачев С.А., Гималетдинова Г.С., Газизова Г.Ч., Гайсина Р.А., Ямалеев О.А.* , Ишмухаметов С.С.

Башкирский государственный университет (Уфа)
*Российский центр защиты леса (Санкт-Петербург)

Современная система защиты растений зерновых культур от абиотических стрессоров, болезней, вредителей и сорняков преимущественно основана на комплексном применении биорегуляторов и химических средств защиты растений. Это связано с тем, что в последнее время уделяется большое внимание разработке новых средств защиты растений, отвечающих экологическим, токсикологическим и экономическим требованиям. Применение иммуностимуляторов с антистрессовым эффектом обязательно должно быть адаптировано к существующей системе применения средств защиты растений [1].

Нами проведены исследования по совершенствованию принципов защиты посевов зерновых культур, предусматривающих комплексное использование препаратов иммуностимулирующего действия и химических пестицидов на разных этапах развития растений.

Полевые исследования проведены на базе ИП «Казангуловское» БНИИСХ, расположенного в Предуральской степной зоне РБ. В полевых условиях исследовали следующие варианты: протравливание семян, обработка вегетирующих растений в разные

фазы их развития комплексами пестицидов. Исследования леса и лесных культур проводились в Предуральской степной зоне РБ и Ленинградской области.

Опыты показали, что предпосевная обработка семян протравителями и микроэлементами (солями меди, марганца, молибдена и никеля) оказывает положительное влияние не только на урожай пшеницы, но и на качество зерна. Содержание белка в зерне пшеницы возросло на 1,2% и повышалась гемагглютинирующая активность лектинов. Лектины участвуют в упаковке запасных белков в алейроновых зернах, а также регулируют последовательность вовлечения запасных белков при прорастании семени[2]. Анализ электрофореграмм лектинов контрольных и опытных образцов показал, что между ними не наблюдается различия по компонентному составу, но отличаются по интенсивности полос.

Интенсивность синтеза лектинов зависит от активности иРНК в ядрах, кодирующих синтез этих белков. Количественный анализ ДНК, РНК и лектинов в проростках пшеницы, выращенных из обработанных семян Биостат-2 и микроэлементами показал, что ГА лектинов, а также содержание в ядрах проростков РНК в процессе онтогенеза повышается. Активацией генетических функций ядер можно объяснить повышенные морфологические и биохимические показатели, а также устойчивость растений в вариантах с микроэлементами к возбудителю твердой головни. Как известно гифы твердой головни локализируются в конусе нарастания. Как видно из данных табл.1, микроэлементы повышают гемагглютинирующую активность лектинов в тканях конуса нарастания и вполне, вероятно принимают участие в лизисе, гиф триба[1]. Были обнаружены эффекты ингибирования гиф грибов при обработке растений микроэлементами (солями бора, меди, цинка, кобальта и никеля), в настоящее время намечился прорыв в генетике минерального питания микроэлементами, где лектины найдут должное место.

Таблица 1.

Влияние микроэлементов на ГА лектинов проростков и зрелых семян пшеницы (ЕА/мг сухого веса)

Варианты обработки семян	Корни	Лектины хлоропластов		Конус нарастания	Семена
		растворимые	мембрано-связанные		
Контроль	32,2 + 1,5	21,4 + 1,3	28,8 + 1,9	18,4 + 0,4	40,1 + 1,8
CuSO ₄	41,3 + 1,7	24,8 + 1,1	36,7 + 2,0	28,6 + 1,3	46,2 + 2,0
MnSO ₄	46,4 + 1,3	26,1 + 1,8	43,0 + 2,1	20,8 + 0,8	48,1 + 1,9
ZnSO ₄	43,6 + 1,2	22,8 + 1,3	37,3 + 1,7	23,4 + 1,4	42,0 + 1,2
CoCl ₂	48,2 + 1,6	23,9 + 1,7	39,2 + 1,6	31,6 + 1,5	50,0 + 1,2
Биостат-2	45,4 + 1,4	25,6 + 1,4	38,1 + 1,5	26,4 + 1,6	26,4 + 1,6

Для выявления возможного участия лектинов хлоропластов в процессе фотосинтеза представлялось целесообразным провести сравнительное изучение лектиновой активности в хлорофилл-белковых комплексах ХБК. Гемагглютинирующую активность обнаружили во фракциях мембран и в строме хлоропластов, что указывает на присутствие лектинов в тканях этого органоида клетки. Из таблицы видно, что активность лектинов мембран выше, чем активность растворимых. Обработка семян микроэлементами и Биостат-2 приводит к ее значительному изменению, как растворимых, так и мембраносвязанных лектинов. В опытных вариантах наблюдается повышение абсорбции света ХБК на протяжении всего периода развития растений, особенно при обработке солями марганца, что коррелирует с уровнем гемагглютинирующей активности мембраносвязанных лектинов ХБК. Как известно марганец участвует в активизации кислородвыделяющей системы и в процессе восстановления углекислоты ХБК листьев, усиливая тем самым гемагглютинирующую активность лектинов, что в конечном итоге положительно отражается на фотосинтетическом

процессе растений.

Таким образом, нами установлено, что повышение гемагглютинирующей активности лектинов в различных органах растений не только при патогенезе, но и при действии микроэлементов и биорегуляторов.

Принципиально новым и эффективным приемом борьбы с болезнями и сорняками посевов зерновых культур является стимуляция иммунных свойств растений с помощью физиологически активных соединений. В последнее время мы стали применять фунгицидно-гербицидные смеси и композиции разнофункциональных пестицидов с регуляторами роста, которые активизируют обменные процессы у растений и способствуют улучшению биохимического состава зерна и содержания белков. Нами исследована биологическая эффективность на посевах пшеницы (Башкирская 26) и ячменя (Первенец) баковых смесей биопрепаратов азотовита, бактофосфина и гербицида, а также их композиций с природным регулятором роста и развития растений гуми 90. Опыты закладывались в НИ «Казангуловское» БНИИСХ на двух фонах минерального питания: фон 1 — без удобрений, фон 2 — $N_{60}P_{60}K_{30}$

Как свидетельствуют данные табл.2, полученные при испытании на яровой пшенице биопрепаратов азотовита и бактофосфина, созданных на основе неассоциативных почвенных азотфиксирующих и силикатных бактерий, их биологическая и хозяйственная эффективность при обработке семян и посевов в фазе кущения не вызывает сомнений. Многочисленными модельными опытами нами было установлено, что дистанционные действия биофунгицидов азотовита и бактофосфина и биорегулятора гуми 90 на фоне минерального питания сильнее оказывают стимулирующее действие на рост и органогенез, проявляя синергизм, значительно усиливая тем самым стимулирующий эффект элементов питания. За счет коррелятивных взаимоотношений между биорегуляторами и минерального питания происходит активация формирования корней.

Таблица 2.

Действие биопрепаратов бактофосфина и азотовита на структурный анализ урожая яровой пшеницы Башкирская 26

Варианты	Масса 1000 зерен, г	Вес зерна с 1 колоса, г	Число зерен в колосе	Урожайность, ц/га	Корневые гнили, %
Фон 1 - без удобрений					
Контроль	27,0	0,79	21,6	25,6	21,0
Бактофосфин +азотовит	35,6	0,96	29,2	32,9	11,0
Фон 2 - $N_{60}P_{60}K_{30}$					
Контроль	28,7	0,81	22,8	30,7	26,0
Бактофосфин +азотовит	35,1	0,94	28,8	33,8	12,0

Были проведены исследования по выявлению действия химических протравителей и их композиций с препаратом гуми 90 на степень поражения корневыми гнилями и некоторые биохимические показатели растений пшеницы и ячменя. Установлено, что обработка семян фунгицидом Винцит в рекомендуемой (2 кг/т) и половинной дозах, но в комплексе с гуми 90 (300 г/т) показала примерно одинаковую биологическую эффективность. Однако по биохимическим показателям эти варианты различались между собой. Так, в листьях,

обработанных Винцитом в комплексе с гуми 90, что значительно выше по сравнению с обработкой полной дозой препарата, но без гуми 90. Присутствие гуми 90 положительно отразилось также и на величине абсорбции света хлорофилл-белковыми комплексами (ХБК), что указывает, в свою очередь, на интенсивность процесса биосинтеза хлорофилла. Использование ТМТД 0,5 дозы в смеси с гуми 90 улучшило абсорбционные свойства ХБК на 1,7 % и гемагглютинирующую активность лектинов (ГАЛ) на 5,2 единиц по сравнению с ТМТД (4 кг/т) полной дозой. Аналогичные результаты получены также при обработке семян фунгицидами Максим, Карботирам, Дивиденд, Витавакс при совместном использовании половинной дозы этих препаратов с гуми 90 (табл. 3).

Значительное увеличение величины биохимических показателей происходит при совместном использовании природного биорегулятора роста гуми 90 в комплексе с синтетическим регулятором роста и развития. Выяснено, что в данной композиции важную роль играет соотношение гуми и Биостат-2. При использовании композиции в соотношении гуми 90, 300 г/т + Биостат-2 (5 мл/т) семян, изученные биохимические показатели, а также биологическая эффективность против корневой гнили были значительно выше, чем при других соотношениях. Синергический эффект совместного применения гуми и Биостат-2 обусловлен разнонаправленностью механизмов действия этих биорегуляторов.

Таблица 3.

Влияние протравителей и их композиции с гуми 90 на физиолого-биохимические параметры растений пшеницы и ячменя

Варианты, дозы	Пшеница		Ячмень	
	Ав, % ХБК	ГАЛ	Ав, % ХБК	ГАЛ
Контроль	76,7	18,3	75,6	17,5
Винцит 2 кг/т	79,4	25,5	78,4	20,4
ТМТД 4 кг/т	77,9	20,1	76,9	18,1
Винцит 1 кг/т + Гуми 90	79,6	27,5	78,5	24,4
ТМТД 2 кг/т + Гуми 90	78,9	25,3	77,2	23
Биостат-2ТГФ + Гуми 90	78,8	26,3	77,4	2,24
	79,7	30,1	78,8	2,28,3

Обработка посевов пшеницы и ячменя гербицидом в смеси с гуми 90 способствовала не только уничтожению сорняков, но и улучшению оптических свойств хлорофилл-белковых комплексов, о чем свидетельствует повышение коэффициента абсорбции света и содержания хлорофиллов «а» и «в» в листьях. Эта смесь обладает достаточно высокой селективностью по отношению к растениям яровой пшеницы и ячменя, снижая отрицательное воздействие гербицидов. Так, под влиянием гербицида в листьях растений увеличивалось диффузное отражение света, после обработки растений гербицидом совместно с гуми 90 в фазах кущения и выхода в трубку коэффициенты диффузного отражения света листьями уменьшались, приближаясь к таковым в контроле.

После обработки гербицидом, особенно в смеси с гуми 90, в листьях резко увеличивалась активность лектинов. Это связано с тем, что лектины выполняют роль связывающих белков, различающихся по константе связывания с гербицидом, сопровождающегося выведением из растения гербицида или переходом последнего в неактивную форму.

Таким образом, баковые смеси средств защиты растений с биорегулятором гуми 90 обладают достаточно высокой селективностью по отношению к культуре, ослабляют

отрицательное влияние пестицидов на рост и развитие растения. Присутствие гуми 90 в этих смесях положительно отразилось на содержании легкорастворимых белков в листьях, и оказывало заметное влияние на соотношение белковых фракций в зерне. А именно, увеличивается содержание водо-солерастворимых и спирторастворимых белков и снижается количество глютенинов как в семенах пшеницы, так и в семенах ячменя. Установлено, что изменение в компонентном составе электрофореграмм спирторастворимых запасных белков под влиянием экзогенного регулятора роста гуми 90 не связано с появлением новых белков, а является следствием молекулярных модификаций некоторых компонентов.

Таким образом, применение гербицидов и фунгицидов в комплексе с природным регулятором роста растений приводит к усиленному синтезу белков и увеличению активности лектинов, хлорофилл-белковых комплексов и улучшению оптических свойств листьев, что способствует адаптации растений к стрессам, вызываемым пестицидами, положительно влияя на формирование урожая. Тем самым создается возможность через регулирование обмена влиять на физиологию растения в нужном нам направлении, а именно в сторону устойчивости к стрессам. Подобная тенденция наблюдалась и в результатах, полученных на экспериментах по лесным культурам.

Литература

1. Ямалеев А.М. Механизмы устойчивости пшеницы к грибным заболеваниям. Докторская дис. Ленинград, 420 с., 1990
2. Ямалеева А.А., Сахибгареев А.А., Ямалеев А.М. Геномный анализ иммунитета и фитозащита. ISBN 978-5-9613-0256-1. Уфа, КП РБ изд. «Мир печати» 256 с., 2013

УДК 577.15

АНАЛИЗ АГРЕССИВНЫХ СВОЙСТВ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* ИЗ РАЗЛИЧНЫХ АГРОБИОЦЕНОЗОВ ЮЖНОГО УРАЛА

Умаров И.А., Яруллина Л.М., Ибрагимов Р.И.

Башкирский государственный университет, г. Уфа

Введение

Грибы из рода *Fusarium* широко распространены в природе и являются возбудителями заболеваний многих видов культурных растений. Повсеместное широкое распространение в настоящее время получили корневые гнили зерновых культур, вызываемые грибами *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*. Потери от них иногда достигают 50% [1].

На урожайность картофеля по вредоносности второе место после фитофтороза занимает сухая фузариозная гниль. Больные посадочные клубни являются причиной изреживания всходов, замедленного роста и развития растений [2]. Заболевание вызывают почвенные грибы *F. vasinfectum* или *F. oxysporum*, которые присутствуют в почвах разных типов и могут сохраняться в виде спор в течение многих лет. Видовой состав фузариумов, вызывающих данные заболевания, достаточно разнообразен и не одинаков по географическим зонам [3]. Фузариозная гниль распространена повсеместно и является причиной повреждения картофеля в течение зимне-весеннего сезона. Некоторая часть

клубней заражается еще в поле и может нести в себе скрытую инфекцию. Отход клубней при хранении достигает 20 %. Кроме того, посадочные клубни, пораженные фузариозом в небольшой степени, становятся причиной значительного выпада растений и, в итоге, потерь 7 - 15 % урожая [4].

Как известно, стратегия защитного ответа растительного организма во многом определяется типом пищевой специализации грибов [5]. Некротрофы, прежде чем оккупировать участок какой-либо ткани растения, убивают клетки своими токсичными выделениями. Грибы рода *Fusarium* являются типичными некротрофами [6]. Интенсивное заражение происходит через поврежденные или обезвоженные клетки корней, однако, инфекционные гифы могут проникать и через неповрежденные ткани. Наиболее чувствительны к возбудителям корневых гнилей молодые растения, патоген поражает в основном корни и основание стебля.

Одним из факторов агрессивности и патогенности возбудителей болезней сельскохозяйственных растений являются гидролитические ферменты. Известно, что важной составляющей защитного ответа растений является образование соединений, подавляющих ферментативную активность патогенов [7]. Вероятно, уровень активности гидролаз, секретлируемых патогеном, является важной частью преодоления защитных систем растительного организма.

Цель настоящего исследования – анализ активности гидролитических ферментов у грибов р. *Fusarium* из различных агробиоценозов и оценка антиферментной активности в тканях растений, различающихся по устойчивости к патогену.

Материалы и методы

Культуры грибов р. *Fusarium* были выделены из растительных остатков, собранные с полей различных агроценозов Южного Урала: Степь (образец №1) и Лесостепь (образец №2). Исследовали активность секретлируемых гидролаз *Fusarium oxysporum*. Подросшие на агаризованной среде Чапека колонии, были пересажены в жидкую питательную среду Чапека. Через 7 суток, очищенный от мицелия культуральный фильтрат был использован для определения гидролитической активности.

Клубни картофеля различных сортов инфицировали патогенным грибом *F. oxysporum* из расчета 10^6 спор/мл. Активность гидролаз и их ингибиторов определяли спектрофотометрически по гидролизу хромогенного синтетического субстрата БАПНА [8] и по скорости гидролиза субстрата (желатина, крахмал), иммобилизованного в геле агарозы [9].

Повторность экспериментов была не менее трех раз. Для статистической обработки использовали компьютерных программ фирмы StatSoft (Statistica 6.0). В таблицах и на рисунках приведены средние значения \pm стандартное отклонение.

Результаты исследований

Как видно из табл.1, в культуральной жидкости *F. oxysporum* из различных агроценозов была обнаружена протеолитическая, целлюлолитическая и пектинолитическая активности. Интересно, что активность ферментов, расщепляющих крахмал, в культуральных фильтратах выявлено не было.

Таблица 1

Активность гидролитических ферментов в культуральном фильтрате *Fusarium oxysporum*

Образец	Протеиназа (БАПНА-аза) мЕ/мл	Активность гидролаз, Е/мл		
		Протеиназа	Целлюлаза	Пектиназа
№1	$4,8 \pm 0,35$	$2,11 \pm 0,13$	$4,09 \pm 0,31$	$1,31 \pm 0,11$
№2	$3,7 \pm 0,21$	$2,97 \pm 0,11$	$2,32 \pm 0,21$	$0,96 \pm 0,07$

Как видно, образец №1 обладает более высокой целлюлолитической и пектинолитической активностью. Это свидетельствует о том, что штаммы гриба из различных агробиоценозов значительно отличаются по способности к секреции гидролаз.

Результаты исследований показывают, что клубни картофеля различных сортов содержат ингибиторы, подавляющие действие гидролаз *F. oxisporum* (табл. 2). Так видно, в клубнях картофеля различных сортов, выявляется высокая антицеллюлолитическая активность, активность водорастворимых соединений, ингибирующих пектиназы и протеиназы гриба значительно ниже. Нужно отметить, что клубни картофеля различных сортов существенно отличаются по уровню активности ингибиторов ферментов патогена. Причем, белки клубней проявляют и специфичность по отношению к ферментам штаммов гриба, выделенных из Степной и Лесостепной зоны Южного Урала. Так, в клубнях сорта Невский активность ингибиторов целлюлаз при инфицировании образцом №1 составляет 8,67 ИЕ/мг, в то же время, активность ингибиторов этих ферментов при инфицировании образцом №2 не выявляется.

Таблица 2

Активность ингибиторов гидролаз *Fusarium oxysporum* в клубнях картофеля различных сортов

Сорт	Активность ингибиторов гидролаз, мИЕ/мг белка					
	протеиназ		целлюлаз		пектиназ	
	Образец №1	Образец №2	Образец №1	Образец №2	Образец №1	Образец №2
Луговской	3,1 ± 0,03	4,49 ± 0,38	5,79 ± 0,07	0	0	2,75 ± 0,06
Удача	3,3 ± 0,04	2,92 ± 0,16	8,41 ± 0,09	0	0	0
Невский	4,1 ± 0,02	7,41 ± 0,15	8,67 ± 0,08	0	2,01 ± 0,06	3,41 ± 0,23

Заключение

Наши эксперименты показывают, что в тканях картофеля различных сортов содержатся ингибиторы, которые подавляют активность гидролаз гриба *Fusarium oxisporum*. Белки клубней проявляют специфичность к гидролазам патогена, выделенного из Степной и Лесостепной зоны Южного Урала. Заражение клубней картофеля грибами рода *Fusarium* сопровождается изменением активности протеиназ, пектиназ и целлюлаз. Предполагается, что часть гидролитической активности в тканях растений может быть представлена ферментами патогена.

Список литературы

1. Кваснюк Н.Я., Гуревич Б.И., Жеребцова Л.Н., Филиппова Е.И. Некоторые особенности защиты картофеля от фитофтороза // Защита и карантин растений. №6. 2006. С. 28.
2. Голиков, Н.Н. Клещевина, устойчивая к фузариозу // Защита и карантин растений. 2003. № 3. С. 44.
3. Малюга А.А. Видовой состав и патогенность грибов рода *Fusarium*, вызывающих сухую гниль клубней картофеля в Западной Сибири // Микология и фитопатология. 2003. Т.37, №4. С.84-91.
4. Платонова Ю.В., Сурин Н.А. География грибов рода *Fusarium* // Фундаментальные исследования. 2004. № 4. С.95-97.
5. Кобыльский, Г. И. Патогенность дейтеромицетов на примере возбудителя септориоза пшеницы - гриба *Septoria nodorum Berk.* / Г.И. Кобыльский – М.: Моск. с.-х. акад. им. К. А. Тимирязева, 2005.- 396 с.
6. Семенкова, И.Г., Соколова, Э.С. Фитопатология. 2-е изд. / И.Г. Семенкова, Э.С. Соколова Издательство - М: Академия, 2003.- 480 с.

7. Яруллина, Л.Г., Ибрагимов, Р.И. Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным патогенам / Л.Г. Яруллина, Р.И. Ибрагимов - Уфа: Гилем, 2006. - 232 с.
8. Erlanger V.F., Kokowski N., Cohen W. The preparation and properties of tw new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. Biophys, 1961. V. 95. N 2. P.271-278.
9. Шевченко Н.Д., Шпирная И.А., Саяхова А.Ф., Цветков В.О., Марданшин И.С., Ибрагимов Р.И. Активность ингибиторов целлюлаз, пектиназ в клубнях картофеля// Вестник ОГУ. №6. 2009. С. 430-433.

Работа проведена при финансовой поддержке гранта РФФИ_поволжье_а № 11-04-97037, ФЦП ГК № 01201353578.

Авторский указатель

Актуганов	100	Жученко	45
Алешкин	130, 131	Загидуллин	23, 35
Аньшакова	68, 97	Зарипова	167
Афанасьев	130, 131	Зинатуллина	79
Ахмадеева	59	Ибрагимов	9, 13, 50, 110, 189, 198
Баймиев	135, 143	Иванов	170
Байракова	131	Иванова	170
Байтимеров	59	Ивлева	20
Бакакина	178	Ильясов	29
Баширова	91, 154, 163	Ильясова	172
Башкатов	72	Исаев	189
Баязитова	72	Ишмухаметов	78, 206
Беньковская	18, 52	Калимуллина	115
Бережнев	110	Канюка	118
Бережнева	104, 110	Каримов	33
Бодягин	127	Карлов	26, 42, 56
Бойко	100	Карунас	35
Ван-Клей	50	Кацы	38
Васильев	68	Китаев	52
Вафина	170	Климентова	23
Вахитов	91	Климушина	26
Вершинина	135, 143	Колеснева	178
Веселов	79, 88, 156	Комахин	45
Виноградов	20	Комахина	45
Волотовский	178	Корсун	84, 130, 131
Габдрахманов	78	Кособокова	120
Газизова	206	Косоруков	120
Гайсина	206	Кочешкова	42
Галимзянова	100	Красоткина	94, 127
Галкин	154	Криницына	45
Гареева	160	Крупин	42
Гарипова	78, 79	Кудашкина	154
Гильманшина	113	Кузьмина	100
Гильмутдинова	75	Кулуев	123
Гилязетдинов	13	Курамшина	181
Гилязова	23, 59	Кустов	94, 127
Гималетдинова	206	Кутлыева	23
Гиматдинова	88	Ласточкина	172
Григориади	115, 160	Лахтин	84, 130, 131
Грицаенко	154	Левина	45
Данилова	154, 163	Лелей	29
Даутова	82	Лопатин	160
Дивашук	26, 42, 56	Лукманова	100
Долотовский	163	Лутфуллин	143
Дубовская	178	Магжанов	59

Манчу	167	Усманова	78, 79, 82
Маракаева	75	Фархутдинов	75, 147, 167, 186
Махмутъева	88	Федорова	35, 203
Мелентьев	100	Феклистова	194
Милехин	127	Хайруллин	181
Милюкова	45	Халиков	189
Мингазов	91	Халиуллин	23
Миронова	175	Хидиятова	59
Мустафина	33	Хуснутдинова	23, 35, 59
Мухтарова	35	Цветков	110, 198
Набеева	206	Чемерис	62
Налян	50	Черепенко	201
Насибуллин	33	Шамратова	82
Наумова	68	Шафикова	186
Нигматуллина	135, 143	Шигапова	79
Николенко	29	Широков	172
Никоноров	18	Шпирная	104, 110, 198
Новоселова	79	Щербаков	201, 203
Нургалеева	137	Эрдман	33
Оркодашвили	143	Эткина	35
Орлов	94	Юлбарисова	175
Павлов	23	Юмагужина	198
Пенкин	52	Юнусбаев	35
Петров	140	Ямалеев	150, 206
Петрова	38	Ямалеева	150, 206
Поскряков	29	Яруллина	210
Почтовый	56		
Прощалыкин	29		
Пусенкова	172		
Рамазанова	35		
Резайкин	20		
Реут	175		
Рыскова	82		
Сайтова	147		
Саяхова	91		
Сергеев	20		
Смирнова	181		
Сомова	33		
Степанова	68, 97		
Сурина	52		
Терещенко	170		
Тимофеев	97		
Умаров	13, 189, 210		
Усачев	150, 206		
Усманов	201, 203		