Национальный исследовательский
Томский государственный университет
Кафедра физиологии растений и биотехнологии
Общество физиологов растений России
МОО "Микробиологическое общество"

Всероссийская научная конференция

"ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ - ВЗГЛЯД В БУДУЩЕЕ"

посвященная памяти профессора Раисы Александровны Карначук и 90 - летию со дня основания кафедры

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

Томск
2-5 апреля 2013 г.

Дорогие коллеги и друзья, мы рады приветствовать вас на Кафедре физиологии растений и биотехнологии. В этом году кафедра отмечает 90-летие со дня основания. Ученик К.А. Тимирязева, Василий Васильевич Сапожников, создал кафедру анатомии и физиологии растений в 1923 году. Существование кафедры в ее современном виде обязано Раисе Александровне Карначук, которая в 1991 году сумела восстановить кафедру после двух десятков тяжелых лет для физиологии растений в Томском университете. Учебные дисциплины и научные направления в области физиологии и биохимии растений и микробиологии были расформированы и распределены на другие кафедры биолого-почвенного факультета в 1974 году. Раиса Александровна не только подняла на новый уровень научные исследования в области фотофизиологии растений, но и положила начала новым, современным биотехнологиям растений и микроорганизмов – культуре растительных тканей, созданию безвирусного семеноводства картофеля, внедрению молекулярных методов тестирования сельскохозяйственных культур, изучению базидиальных грибов медицинского назначения. Мы надеемся, что конференция «Физиология растений и микроорганизмов – взгляд в будущее» позволит в дружественной и творческой обстановке обсудить перспективы этих областей науки о жизни, как дань памяти Раисы Александровны. Мы отдельно обращаемся к молодым ученым с пожеланием быть нацеленными на открытия, проводить исследования, принимая за эталон работы ведущих международных специалистов, достигать новых вершин путем тщательной проверки и повторения экспериментов, публиковать свои результаты в ведущих международных журналах, хранить и поддерживать принципы научной и человеческой этики.

Коллектив кафедры и организаторы конференции

Национальный исследовательский Томский государственный университет
Кафедра физиологии растений и биотехнологии
Российский фонд фундаментальных исследований
Общество физиологов растений России
МОО "Микробиологическое общество"
Компания «Хеликон»

Всероссийская научная конференция

«ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ-ВЗГЛЯД В БУДУЩЕЕ»

посвященная памяти профессора Раисы Александровны Карначук и
90 - летию со дня основания кафедры

Томск, 2-5 апреля 2013 г.

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ
ПРОГРАММА

ТОМСК - 2013

Содержание

Полезная информация	6
Научная программа	9
Жизнь, отданная Университету	15
Устные доклады	27
Стендовые доклады	85
Алфавитный список устных докладов	171
Алфавитный список стендовых докладов	175
Участники	179

Полезная информация

Такси

Название	Телефоны
VIP	8(3822)442-222
Максим	8(3822) 900-000
Авторитет	8(3822) 331-133
Талисман	8(3822) 331-160
Желтое	8(3822) 212-100; 200-200

Общественный транспорт до остановки «Университет»
Троллейбус: 1, 3, 4, 8
Автобус: 2, 3, 4, 12, 17, 19, 22, 23, 26, 30, 32, 60, 119, 405
Автобус из аэропорта: 119
Автобус с железнодорожного вокзала: 4, 12, 119, 442
Троллейбус с железнодорожного вокзала: 4

Контактная информация
Контактный телефон: (3822) 52-97-65
E-mail: conf_2013@phys-biotech.net
Контактные лица:
Франк Юлия Александровна, моб.тел: 8-903-950-40-83
Ефимова Марина Васильевна, моб.тел: 8-903-913-62-10

Доступ к точкам Wi – Fi в Томском государственном университете: в Центре культуры ТГУ и в конференц-зале (2 этаж главного корпуса).

Для участников, представляющих устные доклады
Просьба предоставить доклад информационному оператору, Анне Герасимчук (gerasimchuk_ann@mail.ru) за день до выступления.

1. Главный корпус Томского государственного университета (пр. Ленина , 36)
2. Гостиница ТГУ (пр. Ленина , 49)
3. Отель «Bon Apart» (ул. Герцена , 1а)
4. Кафе «Библиотека» (ул. Советская , 45)

Программа

Всероссийской научной конференции
«Физиология растений и микроорганизмов – взгляд в будущее»,
2-5 апреля 2013 г., г. Томск

2 апреля, вторник	
12:00 – 18:00	**Регистрация участников конференции** (Главный корпус ТГУ, пр. Ленина, 36, ауд. 214)
15:00 – 17:30	Экскурсия по Томску
18:00	**Ужин** (кафе «Библиотека», ул. Советская, 45)
3 апреля, среда	
10:00 – 10:30	**Открытие конференции** Председатель Вл.В. Кузнецов (Главный корпус ТГУ, пр. Ленина, 36, конференц-зал) Приветственное слово ректора ТГУ, профессора, Г.В. Майера, директора Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, чл.-корр. РАН Вл.В. Кузнецова, зав. Кафедрой физиологии растений и биотехнологии ТГУ, профессора, О.В. Карначук
10:30 – 13:00	Доклады приглашенных специалистов Председатели Вл.В. Кузнецов, (Главный корпус ТГУ, пр. Ленина, 36, конференц-зал) О.В. Карначук
10:30 – 11:30	**Вл.В. Кузнецов** (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва) Мемориальная лекция в память о профессоре Р.А. Карначук «Физиология растений – фундаментальная основа современных биотехнологий»
11:30 – 12:00	**Перерыв на кофе**
12:00 – 13:00	**Е.А. Бонч-Осмоловская** (Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, г. Москва) «Гипертермофильные археи: новые свойства, новые группы»
13:00 – 14:30	**Перерыв на обед**
14:30 – 16:30	Сессия устных докладов Председатели Вл.В. Кузнецов, (Главный корпус ТГУ, пр. Ленина, 36, конференц-зал) О.В. Карначук
14:30 – 15:00	**И.Ф. Головацкая** (Томский государственный университет, г. Томск) «Научная деятельность Р.А. Карначук»
15:00 – 15:30	**А.Г. Дегерменджи** (Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск) «Проточные системы культивирования и принципы устойчивой организации микробных сообществ»
15:30 – 16:00	**А.А. Тихомиров** (Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск) «Роль высших растений в искусственных экосистемах»
16:00 – 16:30	**Е.В. Дейнеко** (Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск) «Трансгенные растения как модели для фундаментальных исследований в области физиологии растений»
16:30 – 17:30	**Сессия стендовых докладов**
16:30 – 17:30	**Кофе**

4 апреля, четверг	
10:00 – 11:30	Доклады приглашенных специалистов Председатели А.Г. Дегерменджи, (Главный корпус ТГУ, пр. Ленина, 36, конференц-зал) Е.А. Бонч-Осмоловская
10:00 – 10:45	**Н.В. Пименов** (Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, г. Москва) «Сообщество сульфатредуцирующих бактерий окисленных вод Черного и Балтийского морей»
10:45 – 11:30	**О.В. Карначук** (Томский государственный университет, г. Томск) «Микроорганизмы, медь и кислород»
11:30 – 12:00	**Перерыв на кофе**
12:00 – 13:00	Сессия устных докладов Председатели А.Г. Дегерменджи, (Главный корпус ТГУ, пр. Ленина, 36, конференц-зал) Е.А. Бонч-Осмоловская
12:00 – 12:30	**Н.А. Гаевский** (Сибирский государственный университет, г. Красноярск) «Флуоресцентный метод в оценке стрессоустойчивости яровой пшеницы»
12:30 – 13:00	**Г.А. Семенова** (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино) «Структурные и физиолого-биохимические перестройки стареющих листьев сахарной свеклы при нитратном и углеводном стрессах»
13:00 – 14:30	**Перерыв на обед**
14:30 – 16:00	Сессия устных докладов Председатели В.В. Кузнецов, (Главный корпус ТГУ, пр. Ленина, 36, конференц-зал) Е.В. Дейнеко
14:30 – 15:00	**В.Н. Хрянин** (Пензенский государственный университет) «Гормональная регуляция проявления пола у растений»
15:00 – 15:15	**О.Г. Бендер** (Институт мониторинга климатических и экологических систем СО РАН, г. Томск) «Сравнительная оценка состояния фотосинтетического аппарата *Pinus sibirica* и *Pinus pumila* в зимний период»
15:15 – 15:30	**Д.А. Филатов** (Институт химии нефти СО РАН, г. Томск) «Влияние криогеля на основе поливинилового спирта на рост и развитие почвенных микроорганизмов и растений»
15:30 – 15:45	**М.А. Шелякин** (Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар) «Фотосинтез, дыхание и соотношение дыхательных путей в процессе деэтиоляции проростков пшеницы»
15:45 – 16:00	**А.А. Ермошин** (Уральский федеральный университет, г. Екатеринбург) «Создание растений устойчивых к ионам меди»
16:00 – 17:00	**Сессия стендовых докладов**
16:00 – 17:00	**Кофе**

5 апреля, пятница	
10:00 – 11:30	Доклады приглашенных специалистов Председатели Н.В. Пименов, (Главный корпус ТГУ, пр. Ленина, 36, конференц-зал) А.А. Тихомиров
10:00 – 10:45	**Н.В. Обручева** (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва) «Различная регуляция выхода семян из физиологического покоя и начала прорастания»
10:45 – 11:30	**В.В. Кузнецов** (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва) «Молекулярные механизмы гормональной регуляции биогенеза хлоропластов»
11:30 – 12:00	**Перерыв на кофе**
12:00 – 13:00	Сессия устных докладов Председатели Н.В. Пименов, (Главный корпус ТГУ, пр. Ленина, 36, конференц-зал) А.А. Тихомиров
12:00 – 12:15	**М.В. Ефимова** (Томский государственный университет, г. Томск) «Брассиностероиды и световое развитие растений»
12:15 – 12:30	**А.Л. Герасимчук** (Томский государственный университет, г. Томск) «Ацидофильные сульфатредуцирующие бактерии в местах обитания, связанных с добычей и переработкой металлов»
12:30 – 12:45	**А.С. Минич** (Томский государственный педагогический университет, г. Томск) «Взаимосвязь продуктивности *Lactuca sativa* L., активности гетеротрофных бактерий почвы и спектрального состава света»
12:45 – 13:00	**Н.Н. Терещенко** (Сибирский НИИ сельского хозяйства и торфа Россельхозакадемии, г. Томск) «Оценка целесообразности и эффективности применения микробных препаратов для биоремедиации нефтезагрязненных почв на основе отечественного и зарубежного опыта»
13:00 – 14:30	**Перерыв на обед**
14:30 – 15:30	Сессия устных докладов Председатели Н.В. Пименов, (Главный корпус ТГУ, пр. Ленина, 36, конференц-зал) А.А. Тихомиров
14:30 – 14:45	**Г.Я. Степанюк** (Сибирский ботанический сад ТГУ, г.Томск) «Семенное размножение in vitro видов рода *Cattleya* Lindl., интродуцированных в Сибирском ботаническом саду ТГУ»
14:45 – 15:00	**Ю.А. Франк** (Томский государственный университет, г. Томск) «Грамположительные спорообразующие бактерии из глубинных подземных горизонтов Западно-Сибирского нефтегазоносного бассейна»
15:00 – 15:15	**Ю.А. Маркова** (Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск) «Образование индолилуксусной кислоты энтеробактериями, патогенными для человека»
15:15 – 15:30	**А.Л. Турская** (Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск) «Образование активных форм кислорода в корнях проростков редиса при воздействии *Escherichia coli*»
15:30 – 16:30	**Закрытие конференции** Председатель Вл.В. Кузнецов Подведение итогов конкурса стендовых докладов (Главный корпус ТГУ, пр. Ленина, 36, конференц-зал)
18:00	**Ужин** (кафе «Библиотека», ул. Советская, 45)

Распределение стендовых докладов по сессиям

3 апреля, среда	
16:30 – 17:30	1. Влияние продолжительности фотопериода на продуктивность и качество урожая линий сои, изогенных по Е-генам (Ю.В. Попова) 2. Влияние красного света на активность ауксинов, гиббереллинов и абсцизинов у изогенных по генам ее линий сои (В.Ф. Тимошенко) 3. Действие дефицита воды на физиологические процессы сортов пшеницы Росинка и Омская 23 (Н.П. Широкова) 4. Изучение особенностей механизмов устойчивости кормовых культур к недостатку кислорода (С.А. Войцековская) 5. Красный свет и его роль в криопротекции (Т.П. Якушенкова) 6. Микробиологическая характеристика водных ресурсов минерализованных озер степного Алтая (Т.М. Тронова) 7. О возможности совместного использования микроорганизмов и микроэлементов для регулирования роста и развития саженцев винограда (С.Г. Великсар) 8. Особенности аккумуляции наночастиц платины органами проростков пшеницы и гороха в зависимости от специфики субстрата (Т.П. Астафурова) 9. Особенности морфогенных процессов трансгенных растений табака под действием верапамила на ранних этапах онтогенеза (Е.С. Гвоздева) 10. Получение клеточной суспензионной культуры трансгенного табака *Nicotiana tabacum* L., содержащего ген uidA, для создания на ее основе биопродуцентов рекомбинантных белков (Е.С. Гвоздева) 11. Получение новых высокопродуктивных линий княжика сибирского *Atragene speciosa* Weinm. в культуре in vitro (Ю.В. Медведева) 12. Роль темнового дыхания в продукционном процессе (Т.И. Голованова) 13. Регулятор роста и развития растений мелафен предотвращает дисфункцию митохондрий проростков гороха в условиях недостаточного увлажнения (И.В. Жигачева) 14. Регуляция роста оздоровленных растений картофеля сортов, районированных в Сибири в условиях in vitro и гидропоники для усиления их продукционного процесса (В.Ю. Дорофеев) 15. Регуляция селеном биохимического состава растений *Lactuca sativa* L. при коррекции солнечного излучения (И.Ф. Головацкая) 16. Содержание пигментов в листьях разных видов клевера, произрастающих в различных условиях влажности (В.Н. Хрянин) 17. Физиологические показатели яровой пшеницы, структура урожая и урожайность при обработке семян препаратами из помета (А.В. Кравец)

4 апреля, четверг	
16:00 – 17:00	Конкурс стендовых докладов молодых ученых. Конкурсные доклады: 1. Влияние брассиностероидов на устойчивость растений рапса к засолению (А.В. Мануйлова) 2. Влияние условий культивирования незрелых зародышей гороха в культуре in vitro (М.Н. Сащенко) 3. Влияние зеленого света на вегетативную стадию роста медицинских грибов *Lentinula edodes* (Л.Б. Глухова, Л.О. Соколянская) 4. Влияние индолил-3-уксусной кислоты и мелатонина на ростовые процессы в растениях (Е.В. Соловьева) 5. Влияние полициклических ароматических углеводородов на фотосистему II растений гороха (А.В. Ланкин) 6. Влияние синтетических простагландинов на биохимические процессы в проростках тритикале (М.А. Капустин) 7. Динамика содержания фитоэкдистероидов в новом продуценте *Silene colpophylla* Wrigley (А.А. Селиверстова) 8. Зависимость морфогенеза арабидопсиса от уровня экзогенного мелатонина и фотопериода синего света (У.А. Комарова) 9. Изучение биоразнообразия накопительных культур из вольфрамово-молибденового месторождения Бурятии (П.А. Бухтиярова) 10. Изучение устойчивости к меди у ацидофильного штамма *Desulfosporosinus* sp.I2 (Е.В. Груздев) 11. Использование "вложенной" ПЦР для амплификации гена 16S рРНК архей из природных образцов термальной подземной воды (В.В. Широкова) 12. Использование силибининовой и силидианиновой хеморас расторопши пятнистой для создания сортов лекарственных растений (А.С. Чубарова) 13. Культивирование анаэробных ацидофильных микроорганизмов, восстанавливающих сульфаты, из экосистем кислых шахтных дренажей (М.А. Власова) 14. Культивирование сульфидогенных микроорганизмов из подземной термальной воды скважины 3Р (Парабельский район Томской области) (С.М. Сафарян) 15. Наследование гетерологичного гена *HMG1* у потомков трансгенного табака и реакции проростков на экзогенную обработку фитогормонами (А.А. Ермошин) 16. Особенности листового аппарата кедра сибирского в суходольных экотопах юга Западной Сибири (А.Г. Бендер) 17. Роль 24-гомобрассинолида и селена в регуляции морфогенеза *Arabidopsis thaliana* (Е.А. Борисова) 18. Мелатонин как возможный регулятор метаболизма у клеточной культуры *Saussurea orgaadayi* (Н.А. Володина) 19. Снижение вязкости нефти с применением уробактерий выделенных из природных источников (Ю.З. Гусева) 20. Солевое влияние на клеточный цикл корневой меристемы трансгенных (FeSOD) линий томата (Е.К. Серенко)

Жизнь, отданная Университету

Вся жизнь Раисы Александровны Карначук была связана с Томским университетом. Поступив на биолого-почвенный факультет в 1954, она защитила диплом на Кафедре физиологии и биохимии растений и микробиологии в 1959 году.

Дипломная работа была посвящена изучению микроорганизмов и, продолжая карьеру микробиолога, она ненадолго покинула стены ТГУ, поступив на должность старшего лаборанта лаборатории микробиологических методов борьбы с вредителями сельского и лесного хозяйства Биологического института СО АН СССР в Новосибирске. Однако, уже в 1961 г. Раиса Карначук, тогда еще Раиса Рябкова, вернулась в Томский университет и поступила работать старшим лаборантом в лабораторию фотосинтеза НИИ Биологии и Биофизики - единственное вакантное место по специальности. С этого момента ее научным призванием и любовью стала физиология растений.

Работы лаборатории фотосинтеза, возглавляемой в то время М.М. Окунцовым, были посвящены изучению влияния света различного спектрального состава на растения. Получив тему от научного руководителя, Раиса Александровна, как настоящий исследователь, продолжала работы в области фоторегуляции растений до последних дней жизни, шаг за шагом познавая, как растения реагируют на различные области спектра видимого света. Особое внимание она уделяла изучению регуляторной роли зеленого света. Раиса Александровна разделяла взгляды И.А. Шульгина и А.А. Ничипоровича, связывая биологическое значение феномена зеленого света с существованием плотных фитоценозов и показывая, что эта область спектра не безразлична для фотосинтеза, несмотря на отсутствие поглощения хлорофиллом. По мнению Р.А. Карначук, зеленый свет при высокой интенсивности не лимитирует процессы фотосинтеза, но активно регулирует ростовые процессы.

Более низкую интенсивность фотосинтеза листьев растений, выросших на зеленом свету с интенсивностью менее 60 Вт/м^2, Раиса Александровна объясняла снижением

плотности распределения пластид в единице поверхности листа, вызванное уменьшением количества клеток на зеленом свету по сравнению с красным и синим светом. Она показала в эксперименте, что ассимиляционный процесс связан с числом хлоропластов в единице площади листа, а не с содержанием пигментов (Карначук, 1987; Карначук и др., 1987; Карначук, Головацкая, 1998).

Раису Александровну интересовал вопрос о рецепторе зеленого света. Прежде всего, было сделано предположение об участии антоцианов в рецепции этого участка спектра и включение их в реакции, осуществляемые хлоропластами на свету. Под ее руководством проведены многочисленные эксперименты с изолированными хлоропластами при добавлении антоцианидина на селективном свету, показавшие действие этих пигментов на величину светозависимых реакций. Было показано, что экзогенно введенный антоцианиновый флавоноид увеличивал перенос электронов по нециклическому пути (реакция Хилла) в изолированных хлоропластах овса (Карначук, Головацкая, Новикова, 1985). Позднее эти эффекты были установлены для амарантина в исследованиях В.К. Гинс с соавторами (Птушенко и др., 2002). Идею Раисы Александровны поддержала доктор биологических наук, профессор Мария Тихоновна Чайка, заведующая лабораторией физиологии фотосинтетического аппарата Института фотобиологии АН СССР (г. Минск), проведя совместные исследования, показавшие низкотемпературный переход между антоцианами и хлорофиллом.

В ранних опытах Р.А. Карначук (1972, 1978, 1989) дальний красный свет снимал действие зеленого света на превращения ^{14}С-глюкозы, введенной в этиолированные проростки овса. Этот факт привел к предположению, что одним из рецепторов зеленого света является фитохром, находящийся в фотостационарном состоянии. Пороговая величина интенсивности зеленого света для возбуждения фитохрома была в 2.5 раза выше, чем для красного света. Позднее Раисой Александровной была показана роль фитохромов и криптохромов в регуляции морфогенеза на зеленом свету (Карначук и др., 2002; Головацкая и др., 2007).

При выполнении своей докторской диссертации на тему «Регуляторная роль света разного спектрального состава в процессах роста и фотосинтетической активности листа растений», Раиса Александровна развивала идеи трансдукции светового сигнала, выделив гормоны как элементы этой системы (1990, 1998, 2001). Р.А. Карначук (1989) показала важную регуляторную роль света в формировании фотосинтетического аппарата, выделив при этом в фоторегуляции два порядка регуляторных реакций, рассматривая регуляцию

ростовых реакций как систему первого порядка, а регуляцию собственно фотосинтетических реакций – второго порядка.

С 2000 г. Р.А. Карначук с учениками, проф. И.Ф. Головацкой и доц. М.В. Ефимовой, начала исследования по выяснению роли брассиностероидов и жасмоновой кислоты в фотоморфогенезе модельного растения арабидопсиса (2001, 2002, 2008). Благодаря активной позиции и авторитету Раисы Александровны кафедре удалось получить различные мутанты *Arabidopsis thaliana* из американских коллекций, которые были использованы в экспериментах.

Стремясь развивать новые, современные, исследования и находить практическое применение научным исследованиям, Раиса Александровна инициировала большой комплекс работ в области биотехнологии растений. Существенную помощь в становлении первоначальной коллекции культур растительных тканей оказала профессор Томского медицинского института Л.Н. Березнеговская. В 1987 году впервые была получена клеточная культура серпухи венценосной *(Serratula coronata L.)* – перспективного продуцента фитоэкдистероидов. Дальнейшие исследования позволили ввести в культуру клеток лекарственные растения Сибири, такие как копеечник чайный *(Hedysarum theinum),* княжик сибирский *(Atragene sibirica),* горькуша *(Sausurea Frolovii)* и др. Развитие получили и работы по фотоморфогенезу зародышевой ткани пшеницы (Е.С. Гвоздева, 1997), выделению физиологически активных веществ в культуре клеток княжика сибирского (В.Ю. Дорофеев, 2000), введению в культуру *in vitro* и клонирование юкки слоновой (А.Л. Немойкина, 2002) и другие. С момента восстановления кафедры на стеллажах световых установок появились колбы с клеточными культурами лекарственных растений. Много усилий было приложено Раисой Александровной, чтобы собрать коллекцию культур, оптимизировать питательные среды для клеточных каллусных и суспензионных культур.

По инициативе Раисы Александровны в 2005 г. была открыта учебно-научная лаборатория биотехнологии и биоинженерии при ТГУ, а в 2007 г. – новая специализация «биотехнология растений и микроорганизмов». Это позволило укрепить и расширить традиционные для кафедры исследования в области микробиологии и практического применения микроорганизмов.

Много сил и энергии Раиса Александровна отдала оптимизации размножения безвирусного картофеля. На кафедре и в основанной позднее учебно-производственной лаборатории получения безвирусного картофеля были усовершенствованы и развиты методы клонирования меристемных растений и получения миниклубней в условиях гидропоники. Она была уверена в перспективности выращивания оздоровленного

картофеля в Томской области. В 2006 г. Областная Администрация г. Томска поддержала создание Томского центра безвирусного семеноводства картофеля. В 2009 г. по инициативе Р.А. Карначук было открыто малое предприятие ООО «БиоГен-Т» при ТГУ по производству безвирусного семенного картофеля на основе меристемных технологий. Время подтвердило правильность выбранного направления – в настоящее время производство безвирусного картофеля является одной из значимых биотехнологий, развиваемых в Томской области. Оздоровленный семенной картофель применяется в практике картофелеводства Томского и других регионов Западной Сибири, и пользуется большим спросом у населения Томска, – достойный пример того, как фундаментальные исследования находят применение в сельскохозяйственной практике. Совместно с проф. А.С Миничем из Томского педагогического университета Раиса Александровна работала по внедрению светокорректирующих пленок в сельскохозяйственное производство (2002, 2006).

В последние годы Р.А. Карначук успешно развивала научное направление, связанное с выяснением фоторецепции у базидиальных грибов медицинского назначения и роли гормона сна, мелатонина, в растении.

Выполняя научные исследования в стенах университета, Раиса Александровна в течение долгих лет была в центре преподавания физиологии растений студентам ТГУ. В 70-е годы Кафедра физиологии и биохимии растений и микробиологии переживала трудные времена. После неожиданного отъезда М.М. Окунцова в 1969 г. Кафедра была расформирована. Преподавание физиологии растений было передано Кафедре ботаники, курс микробиологии перенесен на Кафедру цитологии и генетики. Защитив докторскую диссертацию в 1989 году, Р.А. Карначук взяла на себя нелегкий труд восстановления кафедры в Томском университете. Восстановление кафедры физиологии растений поддержали зав. кафедрой ботаники ТГУ, А.В. Положий, и директор Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева АН СССР, А.Т. Мокроносов.

Раиса Александровна всегда стремилась смотреть вперед и в науке, и в преподавании. Она еще в 90-е годы говорила о необходимость интеграции Российской науки в международное сообщество исследователей. Стремясь поднять преподавание биологических наук до международных стандартов, она была одним из основных инициаторов и создателей Международного факультета сельского хозяйства, природопользования и охраны окружающей среды (МФСХ) в Томском университете. Создание нового факультета (1994 г.) было результатом тесного сотрудничества с университетом штата Огайо (США). Новая образовательная программа на факультете

предполагала интенсивное изучение английского языка студентами, мобильность студентов и преподавателей – те критерии современной высшей школы, которые Российское общество выдвигает перед университетами в настоящее время. В отсутствие достаточного финансирования в 90-е годы, Р.А. Карначук находила возможности для студентов факультета проходить обучение в университете штата Огайо, совмещая учебу с работой на малых предприятиях. В летний период МФСХ принимал на обучение американских студентов, специализирующихся в изучении окружающей среды и экологии. Раиса Александровна была бессменным деканом этого факультета до момента его слияния с Биологическим институтом ТГУ в 2007 году.

Раиса Александровна была открытым, нацеленным на научные контакты исследователем и поддерживала научные связи со многими физиологами растений в России, бывших республиках Советского Союза и за рубежом. Она высоко ценила внимание к ее исследованиям Натальи Павловны Воскресенской, мирового лидера в области изучения влияния спектрального состава света на растения. Незадолго до своего ухода из жизни профессор Воскресенская прочитала докторскую диссертацию Раисы Александровны и сделала на полях ценные пометки. Раиса Александровна всегда с теплотой отзывалась об академике Адольфе Трофимовиче Мокроносове, своевременно высказавшем пожелания при работе с мезоструктурой листьев лекарственных растений, профессоре Валентине Ильиче Кефели, научившем биотестированию активности фитогормонов ее ученицу И.Ф. Головацкую. Она дорожила дружбой с профессорами Ольгой Николаевной Кулаевой, Натальей Владимировной Обручевой. Многие из ведущих физиологов растений побывали в Томске с лекциями для студентов. В 1988 г. проф. Р.А. Карначук организовала и возглавила Томское отделение Российского общества физиологов растений.

Профессор Р.А. Карначук является автором и соавтором более 200 научных работ и 15 патентов на изобретения РФ. В их числе изданные оригинальные учебные пособия: «Свет и растения», «Ростовые вещества», «Биотехнология и генная инженерия растений», «Биотехнология растений и микроорганизмов» и «Практикум по биотехнологии растений». Раиса Александровна внесла большой вклад в развитие физиологии растений. Основные труды посвящены изучению световой и гормональной регуляции фотосинтеза и морфогенеза лекарственных, сельскохозяйственных, декоративных и трансгенных растений *in vivo* и *in vitro*, фоторегуляции вторичного метаболизма лекарственных растений и грибов, продуктивности безвирусного картофеля.

Реалии последних лет позволили Р.А. Карначук воплотить ее научный авторитет в материальную поддержку исследований со стороны государственных организаций и фондов. Руководимые Раисой Александровной научные проекты были поддержаны многочисленными грантами Министерства образования, Российского Фонда Фундаментальных Исследований и других организаций, поддерживающих научные исследования.

Научный и организаторский авторитет Р.А. Карначук не был обойден вниманием со стороны деятелей Российского государства. Она была отмечена званием «Заслуженный работник Высшей школы РФ», нагрудным знаком «Почетный работник высшего профессионального образования Российской Федерации», дважды стала лауреатом конкурса Томской области в сфере образования, науки, здравоохранения и культуры, награждена медалями «За заслуги перед Томским государственным университетом», медалью РАЕН им. В.И. Вернадского, им. Петра I, юбилейной медалью «400 лет городу Томску», серебряной медалью «В благодарность за вклад в развитие Томского государственного университета», многочисленными почетными грамотами. Раиса Александровна Карначук очень ценила тот факт, что она стала первым в истории Томской области лауреатом профессорской стипендии Губернатора.

С именем Р.А. Карначук связано создание в Томском государственном университете научной школы в области физиологии и биотехнологии растений. Восстановив кафедру, она смогла передать любовь к изучению физиологии растений своим многочисленным ученикам. Под ее руководством были защищены 2 докторских и более 20-ти кандидатских диссертаций. Чистота и добросовестность в проведении экспериментов было научным кредо Раисы Александровны. Она обогнала действительность в борьбе с подделками и подтасовками научных фактов и недобросовестными диссертациями. К сожалению, ей часто приходилось вести эту борьбу в одиночку. Но время все расставляет на свои истинные места.

Р.А. Карначук любили и уважали многочисленные коллеги и люди, с которыми ее сталкивала жизнь. Исключительно чуткая и отзывчивая к коллегам, друзьям и ученикам, щедрая в добрых делах, тонко понимающая искусство и литературу, тактичная и интеллигентная во всем, сеющая добро, готовая в любой момент прийти на помощь. Такой она останется с нами навсегда. Светлая память о Раисе Александровне Карначук сохранится в сердцах и памяти ее учеников, коллег, всех, кому выпало счастье с ней работать.

Сотрудники кафедры физиологии растений и биотехнологии

Список избранных научных трудов профессора Р.А. Карначук

Карначук Р.А., Малыш Л.К. Действие света различного спектрального состава на превращение углеводов в зелёных листьях // Физиология растений. 1972. Т. 19. вып 1. 5с.

Карначук Р.А., Постовалова В.М., Беленькая Е.В., Жуланова С.Г. Фитохромный контроль метаболизма углеводов-C^{14} в растениях // Физиология растений, 1978. Т. 25, вып. 2. 5с.

Карначук Р.А., Постовалова В.М., Ревина Т.А., Венгеровская Е.И. Об активности фотосинтетического аппарата некоторых видов р. *Sedum L.,* адаптированных // Физиология растений. 1981. Т. 28. вып. 1. 8с.

Карначук Р.А., Ревина Т.А., Тайлашева Т.Я. Динамика содержания экдистерона в надземной части *Serratula coronata L.* и влияние на него света // Растительные ресурсы, Т. 22, вып. 1, 1986.

Карначук Р.А., Протасова Н.Н., Добровольский М.В., Ревина Т.А., Ничипорович А.А. Физиологическая адаптация листа левзеи к спектральному составу света // Физиология растений.- 1987, Т.34, вып.1.- С.51-59.

Карначук Р.А. Регуляторное влияние зеленого света на рост и фотосинтез листьев // Физиология растений. 1987, Т.34, вып.4.- С.765-773.

Карначук Р.А., Негрецкий В.А., Головацкая И.Ф. Гормональный баланс листа растений на свету разного спектрального состава // Физиология растений - 1990, Т.37, вып.3. С.527-534.

Карначук Р.А., Гвоздева Е.С. Влияние света на баланс фитогормонов и морфогенез в культуре тканей зародышей пшеницы // Физиология растений. 1998. Т.45, Вып.2. С. 289-295.

Карначук Р.А., Головацкая И.Ф. Гормональный статус, рост и фотосинтез растений, выращенных на свету разного спектрального состава // Физиология растений. 1998. Т.45. Вып. 6. - С. 925-934.

Головацкая И.Ф., Карначук Р.А., Никитина А.В., Пенкина Ю.В., Мусатенко Л.И. Влияние света на рост и баланс гормонов в проростках овса на начальных этапах онтогенеза // Физиология и биохимия культурных растений. 2000. №6. С.453-461.

Карначук Р.А., Тищенко С.Ю., Головацкая И.Ф. Эндогенные гормоны и регуляция морфогенеза *Arabidopsis thaliana* синим светом // Физиология растений. 2001. Т. 48.№2. С. 262-267.

Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Альтерман И.Е., Карначук Р.А. Регенерация побегов из листовых эксплантов *Lycium barbarum* и агробактериальной трансформации // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 4. С. 523-528.

Головацкая И.Ф., Карначук Р.А., Ефимова М.В. Рост и гормональный баланс арабидопсиса на зеленом свету // Вестник Башкирского университета. 2001. № 2. С. 114-116.

Карначук Р.А., Тищенко С.Ю., Головацкая И.Ф. Роль синего света в регуляции роста и гормонального баланса арабидопсиса // Вестник Башкирского университета. 2001. № 2. С. 124-126.

Тищенко С.Ю., Карначук Р.А., Хрипач В.А. Участие эпибрассинолида в фоторегуляции роста и гормонального баланса арабидопсиса на синем свету // Вестник Башкирского университета. 2001. № 2. С. 166-167.

Карначук Р.А., Головацкая И.Ф., Ефимова М.В., Хрипач В.А. Действие эпибрассинолида на морфогенез и соотношение гормонов у проростков Arabidopsis на зеленом свету // Физиология растений. 2002. Москва. Т.49. №4. С. 591-595.

Минич А.С., Минич И.Б., Райда В.С., Карначук Р.А., Толстиков Г.А. Биологическое тестирование светокорректирующих пленок в условиях закрытого грунта при выращивании белокочанной капусты // Селькохоз. биол., 2003. -№3. -с. 112-115.

Минич А.С., Минич И.Б., Зеленьчукова Н.С., Карначук Р.А., Головацкая И.Ф., Ефимова М.В., Райда В.С. Роль красного люминесцентного излучения низкой интенсивности в регуляции морфогенеза и гормонального баланса *Arabidopsis thaliana* // Физиология растений. 2006. Т. 53. №6. С. 863-868.

Головацкая И.Ф., Карначук Р.А., Ефимова М.В., Копылова Т.Н., Светличный В.А. Роль криптохрома 1 и фитохромов А-Е в регуляции роста арабидопсиса на зеленом свету // Вестник Томского государственного университета. 2007. №297. С. 184-187.

Карначук Р.А., Дорофеев В.Ю., Гвоздева Е.С., Медведева Ю.В., Ефимова М.В., Чурин А.А., Глухова Л.Б. Создание клеточной культуры трансгенного табака с геном интерлейкина-18 человека как продуцента белков медицинского назначения // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2007. № 1. С. 75-86.

Гвоздева Е.С., Ефимова М.В., Карначук Р.А., Дорофеев В.Ю., Асташкина М.П. Роль света в морфогенезе клеточной культуры *in vitro* трансгенного табака с геном интерлейкина-18 человека // Вестник Томского государственного университета. – 2007. – № 300 (II). – С. 116-118.

Карначук Р.А., Гвоздева Е.С., Парфенова С.А. Введение в культуру *in vitro* растений трансгенного табака с геном интерлейкина-18 человека // Вестник Томского государственного университета. Томск: Изд-во ТГУ, 2007. - № 300 (II). – С. 159-161

Головацкая И.Ф., Карначук Р.А. Динамика роста растений и содержание эндогенных фитогормонов в процессе ското- и фотоморфогенеза // Физиология растений. 2007. Т. 54. №3. С. 461-468.

Головацкая И. Ф., Карначук Р. А. Влияние жасмоновой кислоты на морфогенез и содержание фотосинтетических пигментов у проростков *Arabidopsis* на зеленом свету// Физиология растений. 2008. Т. 55. №2. С. 240–244.

Карначук Р.А., Большакова М.А., Ефимова М.В., Головацкая И.Ф. Интеграция сигналов синего света и жасмоновой кислоты в морфогенезе *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 5. С. 534–538.

Карначук Р.А., Дорофеев В.Ю., Гвоздева Е.С., Головацкая И.Ф., Чурин А.А., Суслов Н.И., Медведева Ю.В. Влияние физиологически активных соединений на рост и уровень тритерпеновых сапонинов и флавоноидов клеточной культуры *Atragene speciosa* Weinm. // Вестник Томского государственного университета. Биология, 2008, № 3(4). С. 48-54.

Дорофеев В.Ю., Карначук Р.А., Пулькина С.В., Комлева Е.В., Дубина В.Б., Медведева Ю.В. Культура княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) *in vitro*: цитогенетический анализ и образование тритерпеновых гликозидов и флавоноидов // Вестник Томского государственного университета, 3(7). - Томск: Томский государственный университет, 2009. - С. 37-41.

Головацкая И.Ф., Карначук Р.А. Роль брассинолида в регуляции роста и гормонального баланса растений // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2010. №1(9). С. 13–19.

Карначук Р.А., Дорофеев В.Ю., Медведева Ю.В., Дубина В.Б., Суслов Н.И., Чурин А.А. Клеточная культура *Atragene speciosa* Weinm. – возможный продуцент биологически активных веществ ноотропного и адаптогенного действия // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 1. - Москва: изд-во «Радиотехника», 2011. - С. 17-21.

Ефимова М.В., Кузнецов В.В., Кравцов А.К., Барташевич Д.А. Карначук Р.А., Ковтун И.С., Кузнецов Вл.В.Особенности экспрессии пластидного генома и развития растений *Arabidopsis thaliana* с нарушенным синтезом брассиностероидов // Физиология растений, Т 59, № 1, 2012. С. 32-39.

Ильинских Н.Н., Глухова Л.Б., Ильинских Е.Н., Карначук Р.А. Цитологические и цитогенетические изменения Т-лимфоцитов крови человека при воздействии противоопухолевого препарата адриамицина на фоне введения экстрактов из мицелия грибов шиитаке (*Lentinula edodes*) в условиях *in vitro* // Томский вестник № 356 март 2012 - с.171-175.

Ефимова М.В., Кузнецов В.В., Кравцов А.К., Карначук Р.А., Хрипач В.А., Кузнецов Вл.В. Брассиностероиды регулируют транскрипцию пластидных генов у растений // Доклады РАН. 2012. Т. 445. № 6. С. 693–697.

Ильинских Н.Н., Глухова Л.Б., Ильинских Е.Н., Карначук Р.А. Бласттрансформирующая активность экстрактов мицелия грибов шиитаке (*Lentinula edodes*), выращенных при различных световых режимах, в экспериментах на культурах т-лимфоцитов человека // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 2. С. 53-56.

Головацкая И.Ф., Кулагина Ю.М., Крахалева А.В., Карначук Р.А. Влияние селена на морфогенез и биохимические параметры растений *Triticum aestivum* L. в зависимости от селективного света // Агрохимия. 2013. № 5. С. 558-565.

Головацкая И.Ф., Дорофеев В.Ю., Медведева Ю.В., Никифоров П.Е., Карначук Р.А. Оптимизация условий освещения при культивировании микроклонов *Solanum tuberosum* L. сорта Луговской *in vitro* // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. (в печати)

Устные доклады

Физиология растений – фундаментальная основа современных биотехнологий

Вл. В. Кузнецов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
Томский государственный университет, г. Томск

Физиология растений изучает закономерности и механизмы протекания сложных физиологических явлений и процессов, а также интеграцию функций в целом организме. В течение полутора столетий физиология растений являлась, прежде всего, теоретической базой высокопродуктивного земледелия и фундаментальной основой 3-х зеленых революций, каждая из которых приводила к удвоению урожая. В настоящее время значительно изменились приоритеты этой науки, которая становится не только научной основой локальной, региональной и глобальной экологии, но и фундаментальной базой современных биотехнологий. Данный доклад посвящен рассмотрению инновационных биотехнологий растений, которые созданы на основе важнейших достижений физиологии растений, и направлены на решение глобальных общечеловеческих проблем (проблема голода, негативные последствия изменений климата на планете, борьба с болезнями, поиск новых возобновляемых источников энергии, сохранение биоразнообразия).

Для заметок

Гипертермофильные археи: новые свойства, новые группы

Е.А. Бонч-Осмоловская

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН

Гипертермофильные археи типов Crenarchaeota и Euryarchaeota развиваются при температуре 80-100°С, отличаясь при этом значительным метаболическим и филогенетическим разнообразием. Ряд новых свойств удалось обнаружить благодаря анализам их полных геномов. Это новый катаболический процесс, основанный на анаэробном окислении формиата с образованием водорода; способность к сульфатредукции, впервые реализуемая с помощью чисто архейного, а не бактериального набора генов. Некоторые новые свойства гипертермофильных архей, например, анаэробное гидрогеногенное окисление CO, способность к разложению целлюлозы и труднодоступных белков (альфа- и бета-кератинов), наборот, были установлены экспериментальным путем. Анализ генов 16S рРНК и ключевых функциональных генов в природных микробных сообществах позволил выявить новые группы метаногенных и анаэробных метанокисляющих термофильных архей.

Для заметок

Проточные системы культивирования и принципы устойчивой организации микробных сообществ

А.Г. Дегерменджи

Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск

В докладе представлены экспериментальные и теоретические основы исследования механизмов устойчивости сообществ микроорганизмов в системах непрерывного (проточного) культивирования. Представлены способы непрерывного культивирования микроорганизмов, моделирующие основные принципы организации природных экосистем (отбор, непрерывный трофический поток и др.). В основе доклада - поиск и изучение физико-химических механизмов действия плотностных контролирующих рост факторов (ПКРФ) и закономерностей устойчивого сосуществования лабораторных и природных популяций микроорганизмов. В этой области достигнуты следующие экспериментальные и теоретические результаты для хемостатных систем (скорость протока постоянна): 1) доказана связь предельного числа сосуществующих видов (n) и числа ПКРФ (m): n<m; 2) через изменение входных ПКРФ предложены правила формирования структуры сообщества с наперед заданным видовым составом и методы поиска ПКРФ; 3) определена общая направленность и конкретные пороговые значения уровня ингибитора роста, разрушающего сообщество; 4) открыто фундаментальное явление аутостабилизации ПКРФ: независимость фоновых уровней ПКРФ от их входных потоков (т.е. равенство нулю коэффициентов чувствительности (КЧ) ПКРФ); доказана и проверена экспериментально обобщенная теорема о «квантовании»: сумма всех КЧ всегда целое число(!) и в точности равна разности числа ПКРФ и числа популяций в сообществе (УКЧ=m-n); 3) предложен новый критерий классификации межпопуляционных микробных взаимодействий через отклик ускорения скорости роста одной из популяций при изменении численности другой (как мера суммарного действия всех ПКРФ); новая классификация взаимодействий сопоставлена с классической; 4) на микроводорослевых, бактериальных и дрожжевых сообществах показана полная адекватность экспериментальных и теоретических механизмов устойчивости и управляемости состава сообществ; проверены способы управления уровнем "цветения" типичных доминантных видов сине-зеленых микроводорослей в лабораторной культуре. Полученные результаты приложены к прогнозу состояния водных экосистем и качества воды ряда водохранилищ (Красноярского (залив), Кадатского и Кантатского) и озер юга Хакасии. Обсуждается общеэкологическая значимость полученных результатов.

Для заметок

Роль высших растений в искусственных экосистемах

А.А. Тихомиров[1], С.А. Ушакова[1], Н.А. Тихомирова[1], Н.Н.Дегерменджи[2]

[1]Институт биофизики СО РАН,г. Красноярск
[2]Красноярский государственный медицинский университет, г. Красноярск

Рассматриваются возможности использования высших растений в поддержании круговоротных процессов для замкнутых искусственных экосистем, где вещества, используемые с определенной скоростью для биологического обмена одними звеньями, с такой же средней скоростью регенерируются из конечных продуктов их обмена до исходного состояния другими звеньями и вновь используются в тех же циклах биологического обмена. В этой связи рассматриваются две важнейшие функции высших растений: 1) обеспечение человека растительной пищей и кислородом; 2) утилизация отходов жизнедеятельности человека. Для реализации этих функций высшие растения в искусственной экосистеме должны соответствовать следующим важнейшим требованиям: полное удовлетворение потребностей человека в биохимическом и минеральном составе растительной пищи; высокая скорость биосинтеза съедобной биомассы; эффективное использование минерализованных жидких и твердых выделений человека как источников минерального питания растений.

Работами Г.М. Лисовского с соавторами [1] было показано, что для формирования полноценной растительной диеты человека в искусственной экосистеме может быть использован набор культур, включающий пшеницу, чуфу и ряд овощных растений, выращивание которых целесообразно проводить в разновозрастном конвейерном режиме и повышенном уровне облученности фотосинтетически активной радиации (ФАР), составляющей 150-180 Вт/м2. Дальнейшие исследования [2-5 и др.] показали, что резервы увеличения скорости продукции съедобной биомассы и кислорода для дыхания человека в искусственных экосистемах далеко не исчерпаны. Использование высокоинтенсивных потоков ФАР и эффективный подбор ее спектрального состава позволяет в 2-3 раза повысить выход полезной растительной продукции с единицы площади и увеличить производство кислорода. Физиологическое обоснование такого подхода базируется на более высоком плато светового насыщения для фитоценоза в сравнении со световым насыщением для отдельного листа или одиночного растения. Это позволяет уменьшить площади, занимаемые растениями для обеспечения человека пищей и кислородом, либо увеличить число членов экипажа внутри системы, при тех же габаритах фотосинтезирующего звена. Цикл исследований влияния спектрального состава ФАР на продуктивность растений показал [4;5], что при культивировании мультивидового сообщества ценозов растений в искусственной экосистеме белый свет является компромиссным и наиболее оптимальным. В этом случае обеспечивается высокая (но для многих видов не максимально возможная) продуктивность. Тем не менее, белый свет гарантирует возможность получения высокой продуктивности для многовидового ценоза и поэтому он наиболее предпочтителен для фотосинтезирующего звена системы.

Для утилизации отходов жизнедеятельности человека и несъедобной растительной биомассы в искусственной экосистеме в Институте биофизики СО РАН были разработаны методы культивирования растений на растворах, полученных в результате минерализации экзометаболитов человека и растительных отходов методами биологического и физико-химического окисления [6]. Эти методы позволяют значительно сократить запасы минеральных элементов, расходуемых на воспроизводство несъедобной биомассы растений, и вернуть в массообмен элементы и соединения, содержащиеся в экзометаболитах, используя их в качестве основы для приготовления питательных растворов для выращивания растений. Особое место в разработке этих методов занимает проблема включения во внутрисистемныймассообмен NaCl, содержащегося в жидких выделениях человека. Для решения этой проблемы были использованы съедобные для человека растения-галофиты *Salicorniaeuropaea*, способные накапливать до 50% NaCl в биомассе. Экспериментальные исследования показали [7], что за счет использования *Salicorniaeuropaea* концентрацию натрия в питательных растворах основной культуры, пшеницы, удается удерживать в пределах 0,04%, что существенно ниже критических для этих растений пороговых концентраций. При этом процессы роста и развития растений *Salicorniaeuropaea* не подвергались ингибированию. Таким образом, с помощью растений Salicorniaeuropaea удалось создать экологически чистый способ включения NaCl во внутрисистемный круговорот искусственных экосистем.

В целом, выполненные исследования показывают ключевую роль зеленых растений в регенерации пищи и кислорода, а также в вовлечении органических отходов в круговоротный процесс искусственных биологических экосистем с человеком.

Литература

1. Замкнутая система: человек - высшие растения / под ред. Лисовского Г.М. Новосибирск: Наука, 1979. – 160 с.

2. Gitelson J.I. Optimal structure of plant conveyor for human life support in a closed ecosystem "BIOS-3" Gitelson J.I., Lisovsky G.M, Tikhomirov A.A. // Plant Production in Closed Ecosystems. - 1997. - P. 297-304.

3. Тихомиров А.А. Уровни организации фотосинтетического аппарата и управление продукционным процессом в фитоценозах в условиях светокультуры / Тихомиров А.А., Лисовский Г.М. // Физиология растений. - 2001. - Т. 48, № 3. - С. 461-466.

4. Тихомиров А.А. Спектральный состав света и продуктивность растений / Тихомиров А.А., Лисовский Г.М., Сидько Ф.Я. Новосибирск:Наука, 1991. - 168 с.

5. Тихомиров А.А. Светокультура растений / А.А. Тихомиров, В.П. Шарупич, Г.М. Лисовский – Новосибирск: СО РАН, 2000. – 202 с.

6. Zolotukhin I.G. Biological and physicochemical methods for utilization of plant wastes and human exometabolites for increasing internal cycling and closure of life support systems / Zolotukhin I.G., Tikhomirov A.A., KudenkoYu.A., Gribovskaya I.V. // Advances in Space Research. – 2005. - V. 35. - P. 1559–1562.

7. Ushakova S.A. A biological method of including mineralized human liquid and solid wastes into the mass exchange of bio-technical life supports / Ushakova S.A., Tikhomirov A.A., Tikhomirova N.A., KudenkoYu.A, LitovkaYu.A., Anishchenko O.V. // Advances in Space Research, V. 50, 2012. P. 932–940.

Для заметок

Трансгенные растения как модели для фундаментальных исследований в области физиологии растений

Е.В. Дейнеко[1,2], Гвоздева Е.С.[2]

[1]Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск,
[2]Томский государственный университет, г. Томск,

Введение фрагментов чужеродной ДНК или Т-ДНК в геном трансгенных растений позволяет не только переносить гены, определяющие хозяйственно ценные признаки, но и создавать модели для изучения фундаментальных проблем функционирования генов, в том числе и генов, затрагивающих важные физиологические признаки. К настоящему времени выделено и охарактеризовано немалое количество генов, так или иначе принимающих участие в гормональной регуляции роста и развития растений и представляющих интерес с точки зрения модуляции всей гормональной системы растения.

Используемые в настоящее время методы модификации геномов растений основаны на случайном распределении Т-ДНК-инсерций по геному. Интеграция фрагментов экзогенной ДНК может происходить в разные районы, в том числе и в функционально-активные. В таких случаях инсерции экзогенной ДНК могут приводить к изменению функционирования растительных генов и вызывать изменения различных признаков у растений. Преимуществом таких мутационных изменений является то, что Т-ДНК-инсерции одновременно служат маркерами геномной локализации генов, определяющих измененные признаки.

В Институте Цитологии и Генетики СО РАН (г. Новосибирск) создана коллекция трансгенных растений табака (*N.tabacum*, L., линия SR1) с мутантным фенотипом (измененное строение цветка: лонгостилия, волнистый венчик и разросшийся пестик). Морфологические изменения у большей части растений коррелировали с пониженным уровнем мужской фертильности. Выявлен сцепленный характер наследования признаков измененного строения цветка и устойчивости к антибиотику канамицину, что подтверждало инсерционную природу мутации у большей части анализируемых растений [1]. На основании сравнительного анализа динамики ИУК и суммарных цитокининов на разных стадиях флорального морфогенеза (I–XII) у трансгенных растений с мутантным фенотипом выявлена корреляция нарушение структуры цветка с изменениями в содержании и динамике исследованных фитогормонов. Например, у растения с фенотипом «волнистый венчик» – с 3-кратным по сравнению с контролем увеличением содержания ИУК на стадии VIII, у растения с фенотипом «лонгостилия» – с постепенным его возрастанием от VIII до XII стадии и с многократным увеличением (в 9 раз) на XII стадии. Изменения, затрагивающие флоральный морфогенез, могут быть связаны с нарушениями в соотношении фитогормонов, с их инактивацией, а также с нарушениями их транспорта [2].

Из пяти биохимических путей биосинтеза ИУК наиболее изученным на сегодняшний день является триптаминовый путь с участием *YUCCA*-генов *Arabidopsis thaliana*. Относительно генов, вовлеченных в биосинтез ауксинов у табака, такая информация отсутствовала. Однако ген *FZY*, являющийся ортологом *YUCCA*-генов, выявлен у растений томатов, относящихся наравне с табаком к семейству *Solanaceae*. Представляло интерес обнаружить у растений табака с мутантным фенотипом ортологи генов *FZY*-семейства, которые могли быть вовлечены в наблюдаемые морфологические изменения цветка [3].

С применением набора праймеров, комплементарных последовательностям генов To*FZY* мультигенного семейства томатов, в геноме *N. tabacum* обнаружены четыре неизвестные ранее гена, гомологичные генам томатов. Дальнейшее развитие работ предполагает сравнительный анализ уровня экспрессии Nt*FZY*-генов у растений табака с мутантным фенотипом методом ПЦР в реальном времени.

В Томском государственном университете на кафедре физиологии растений и биотехнологии по инициативе проф., д.б.н. Р.А. Карначук были инициированы работы по физиологии трансгенного растения. Основная идея этого направления исследований – выявление и анализ изменений в различных физиологических реакциях трансгенного растения, в частности, в ответ на действие селективного света. Для этих целей в качестве модели были использованы две гомозиготные моноинсерционные линии трансгенных растений табака (II18№7 и II18№28), характеризующиеся разными сайтами интеграции Т-ДНК-инсерции в растительный геном. Так как используемые нами методы модификации генома растений основаны на случайном распределении инсерций чужеродной ДНК по геному, то встройки в исследуемых нами растениях могли быть интегрированы в районы расположения собственных генов растения и привести к изменению их функционирования. Известно, что транскрипция около 30% генов *Arabidopsis thaliana* изменяется в процессе фотоморфогенеза, причем более половины из них активируются светом [4, 5]. Представляло интерес провести сравнительный анализ морфологических реакций растений табака (на ранней стадии развития проростка – 7 дней от начала прорастания) двух трансгенных

линий табака и растения линии SR1 (контроль) в ответ на воздействие селективного света. В качестве контроля использовали 7-дневные проростки, выращенные в условиях абсолютной темноты.

Установлены различные морфологические реакции исследуемых трансгенных растений табака при экспозиции проростков на селективном (синем (max=436 нм, Q=46800 мкмоль/м^{2}с), зеленом (max=543 нм, Q=25200 мкмоль/м^{2}с) и красном (max=661 нм, Q=48600 мкмоль/м^{2}с) свету, достоверно отличающиеся от контроля. Различия ростовых ответов исследуемых линий трансгенных растений табака при воздействии светом различного спектрального состава были сопряжены с изменением уровня эндогенных фитогормонов (зеатина, индолилуксусной и абсцизовой кислот) [6, 7]. Линии IL18№7 проявляли более высокую чувствительность к действию экзогенных брассинолида и жасмоновой кислоты (10^{-6}-10^{-9} М) [8, 9] и к действию ингибитора «медленных» внешних Ca^{2+}-каналов – верапамила (0,1; 0,25; и 0,5 мМ) [10].

Различные реакции растений двух исследуемых линий трансгенных растений табака вероятнее всего обусловлены изменениями функционирования сложных генетических сетей, контролирующих фотоморфогенез, гормональную регуляцию и Ca^{2+}-сигнальную систему на ранней стадии онтогенеза в результате встраивания Т-ДНК инсерций.

Литература

1. Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Шумный В.К. Т-ДНК-индуцированные мутации у трансгенных растений. // Генетика. - 2007. - Т. 43, №1. - С. 5-17.
2. Загорская А.А., Сидорчук Ю.В., Шумный В.К., Дейнеко Е.В. Динамика ИУК и цитокининов в тканях цветков трансгенных растений табака с мутантным фенотипом // Физиология растений. - 2009. - Т. 56, №6. - С. 917-925.
3. Розов, С.М.; Загорская, А.А.; Щербаков, Д.Н.; Белавин, П.А.; Дейнеко, Е.В.; Шумный, В.К. Выявление семейства Nt-генов табака *Nicotiana tabacum*, учавствующих в триптофанзависимом пути биосинтеза ауксина // Доклады Академии наук. - 2012. - Т. 444, № 1. - С. 101-104.
4. Ma L., Li J., Qu L., Chen Z., Zhao H., Deng X.W. Genomic Evidence for COP1 as a Repressor of Light-Regulated Gene Expression and Development in Arabidopsis // Plant Cell. - 2002. - Vol. 14, № 10. - P. 2383-2398
5. Tepperman J.M., Zhu T., Chang H.S., Wang X., Quail P.H. Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling //Proc. Natl. Acad.Sci. USA.- 2001. - Vol. 98, № 16. - P. 9437-9442.
6. Гвоздева Е.С., Карначук Р.А., Дейнеко Е.В. Фотоморфогенез трансгенных растений табака на ранних этапах онтогенеза // Ноосферные знания и технологии: Сб. трудов / Под ред. Проф. Г.В. Майера. Томск: Изд-во НЛТ, 2006. - Вып. 2. - С. 47-50.
7. Карначук Р.А., Гвоздева Е.С., Ефимова М.В. Световая регуляция морфогенеза растений табака, трансформированных геном интерлейкина-18 человека // Физиология растений. - 2008. - Т. 55. № 4. - С. 560-564.
8. Gvozdeva E., Deineko E., Karnachuk R. The action of brassinolide and jasmonic acid on skotomorphogenesis of transgenic tobacco plants // Abstract of XVIII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology and EPSO, Germany, Freiburg, 29 July – 3 August 2012. - P. 769-770.
9. Гвоздева Е.С. Действие брассинолида на скотоморфогенез трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) // Вестник Томского государственного педагогического университета. – Томск: Изд-во ТГПУ, 2012. - № 7 (122). - С. 106-110.
10. Гвоздева Е.С., Дейнеко Е.В. Особенности скотоморфогенеза трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) под действием верапамила // Материалы IV Всероссийского симпозиума «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность» и годичного собрания Общества физиологов растений России (19 – 23 ноября 2012 г., Москва). Москва, 2012. - С. 28.

Для заметок

Сообщество сульфатредуцирующих бактерий окисленных вод Черного и Балтийского морей

Н.В. Пименов, А.Л. Брюханов

Институт микробиологии им. С.Н.Виноградского РАН, г. Москва

Традиционно считалось, что сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) в водной толще Черного моря развиваются на глубинах свыше 85-130 м, где исчезает кислород. В серии микробиологических и биогеохимических работ конца прошлого столетия доказано, что сероводородное заражение черноморских вод происходит, главным образом, за счет бактериального восстановления сульфатов непосредственно в анаэробной водной толще. Однако, совсем недавно радиоизотопным методом в окисленных водах Черного моря был зафиксирован процесс сульфатредукции, причем внесение ацетата и бутирата приводило к увеличению его интенсивности. С использованием 16S рРНК-специфичных олигонуклеотидных зондов методом флуоресцентной in situ гибридизации получены количественные данные по распределению СРБ в водной толще глубоководной зоны Черного моря. В аэробных водах на глубине 30 м было выявлено значительное количество СРБ, относящихся к родам *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, а также *Desulfobacter*, тогда как на глубине 150 м у верхней границы хемоклина преобладали представители рода *Desulfomicrobium*. С помощью денатурирующего градиентного гель-электрофореза продуктов амплификации гена *dsrB* (кодирующего диссимиляционную сульфитредуктазу) с последующим секвенированием реамплифицированных нуклеотидных последовательностей нами был определен филогенетический состав сообществ СРБ на различных горизонтах водной толщи Черного моря.

Проведены исследования активности и разнообразия СРБ в водной толще Гданьской впадины Балтийского моря, где в последние годы глубже 85 м наблюдается присутствие свободного сероводорода. Аналогично Черному морю, в Гданьской впадине процесс СР зафиксирован не только в придонных сероводородных водах, но и в окисленной зоне. Наличие гена *dsrB* в пробах тотальной ДНК также выявлено как в аэробной зоне (0-30 м) и более глубоких аэробных водах (50-80 м), так и в придонном анаэробном слое, содержащем свободный сероводород. ПЦР анализ выделенной из взвеси ДНК с использованием олигонуклеотидных праймеров к участкам гена 16S рРНК подтвердил присутствие СРБ во всех исследуемых образцах водной толщи Гданьской впадины. Здесь, как и в Черном море, доминантными группами СРБ были *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* и *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*, хотя в минорных компонентах отмечались некоторые отличия.

Толерантность сульфатредукторов к присутствию кислорода обусловлена существованием поведенческих и ферментативных механизмов противостояния окислительному стрессу. К первым относятся формирование скоплений (флоков), симбиозы с аэробными бактериями и аэротаксис. Хеморецептор DcrA *D. vulgaris* Hildenborough служит сенсором концентрации кислорода или ОВП окружающей среды и определяет миграцию бактерий в предпочтительные местообитания; благодаря данному механизму клетки избегают окисленных систем. Ферментативное восстановление кислорода происходит в рамках дыхательных электрон-транспортных цепей (ЭТЦ) – цитоплазматической или периплазматической. Помимо классических ферментов антиокислительной защиты, свойственных аэробным микроорганизмам и эукариотам (супероксиддисмутазы, каталазы и различных пероксидаз), сульфатредукторы имеют уникальные ферменты, функционирующие как супероксидредуктазы (десульфоферродоксин и нееларедоксин) и пероксидазы (рубреритрин и нигеритрин. Многообразие механизмов антиокислительной защиты СРБ позволяет им занимать различные экологические ниши, обеспечивает конкурентные преимущества и выживание в изменяющихся условиях окружающей среды. Поэтому не вызывает сомнения, что в аэробных водах морских водоемов СРБ могут не только сохранять жизнеспособность, но и активно функционировать, вызывая образование восстановленных соединений серы. При этом стратегия выживания и сохранения жизнеспособности у разных видов СРБ может отличаться. По-видимому, некоторые СРБ сохраняют активность за счет образования ассоциаций с гетеротрофными аэробными микроорганизмами на частицах взвеси, в кишечнике зоопланктона и т.д., другие СРБ обладают собственной мощной внутриклеточной антиокислительной защитой.

Из аэробной толщи Черного моря, с глубины 30 м, была выделена чистая культура психрофильной грамотрицательной неспорообразующей СРБ, имеющей на основе анализа последовательности гена 16S рРНК 99% сходства с СРБ *Desulfofrigus fragile*, выделенной из морских арктических осадков у побережья Свальбарда. Эксперименты по определению влияния различных концентраций кислорода на процесс сульфатредукции показали, что исследуемая культура является достаточно аэротолерантной, поскольку сохраняет высокую физиологическую активность при 1 мМ O_2 в питательной среде, а полная остановка роста и прекращение сульфатредукции происходят только при концентрации кислорода, равной 5 мМ. С использованием впервые сконструированных вырожденных праймеров на основные гены

антиокислительной защиты СРБ был проведен ПЦР анализ наличия этих генов в геноме выделенной *Desulfofrigus* sp. Было показано, что в геноме исследуемого микроорганизма присутствуют гены, кодирующие супероксиддисмутазу (*sod*), десульфоферродоксин (*dfx*), рубреритрин (*rbr*), рубредоксин-кислород оксидоредуктазу (*roo*) и гибридный кластерный белок HCP1 (*hcp*). Гены *dfx* и *hcp* были клонированы с использованием плазмиды pGEM-T Easy и секвенированы. Также было обнаружено, что НАДН существенно усиливает процесс восстановления кислорода клетками *Desulfofrigus* sp. Полученные результаты свидетельствуют о наличии в клетках выделенной нами СРБ *Desulfofrigus* sp. сложных многокомпонентных систем ответа на окислительные стрессы.

Работа частично финансировалась из средств РФФИ 12-04-91052_НЦНИ_а.

Для заметок

Микроорганизмы, медь и кислород

О.В. Карначук

Томский государственный университет

Многие прокариоты используют медь в качестве кофактора ферментов. Вероятно, использование меди живыми клетками стало возможным только после оксигенирования океана и перехода меди из нерастворимых сульфидов в биодоступные формы. Считают, что медь не имеет функций в анаэробном мире. Поиск возможных медьсодержащих белков в доступных геномах прокариот подтверждает, что медь является «современным» биометаллом. Сравнительный анализ купропротеомов представителя нового филума *Ignavibacteria*, *Melioribacter roseus*, и ближайших представителей филумов *Bacteroidetes* и *Chlorobi*, подтверждает возможную эволюцию анаэробных *Chlorobi* от факультативно анаэробных *Ignavibacteria*.

В отличие от медьсодержащих белков, системы транспорта меди, защищающие клетки от повышенных концентраций этого металла, могли возникнуть на ранних этапах эволюции в анаэробных условиях. До недавнего времени практически не было сведений о купропротеомах и системах гомеостаза меди у анаэробных сульфатредуцирующих прокариот (СРП). Понимание гомеостаза меди в этой древней группе микроорганизмов имеет большое значение для биотехнологии. СРП широко используют для переведения металлов, включая медь, в форму нерастворимых сульфидов и очистки стоков, загрязненных металлами.

Анализ всех доступных полных геномов СРП показал, что эта группа обладает развитыми системами транспортеров меди, включая медные АТРазы и периплазматические RND-транспортеры. Анализ драфт-геномов СРП устойчивых к меди показал, что RND-транспортеры могут быть ответственны за повышенную устойчивость к меди. Неожиданным открытием было наличие большого количества медь-содержащих белков в геномах анаэробных СРП. Купропротеомы СРП свидетельствуют в пользу возможного широкого распространения факультативного анаэробиоза в некоторых филогенетических группах, получающих энергию за счет диссимиляционной сульфатредукции.

Для заметок

Флуоресцентный метод в оценке стрессоустойчивости яровой пшеницы

Н.А. Гаевский[1], В.Ю. Ступко[2], Н.В. Зобова[1,2]

[1] Сибирский федеральный университет, г. Красноярск
[2] Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии, г. Красноярск

Создание сортов яровой пшеницы, способных противостоять стрессовым эдафическим факторам, по-прежнему остается актуальной задачей, решение которой стимулирует развитие, как современных методов селекции, так и оперативных методов контроля получаемых результатов. Одним из тестируемых физиологических показателей может быть выбрана фотосинтетическая активность (ФА), связанная с продуктивностью растений тканей и чутко реагирующая на влияние различных стрессоров [0, 0]. Современные методические решения и приборы позволяют проводить численное и визуальное документирование основных показателей ФА без разрушения объекта исследования, отслеживая динамику реакции растения на стрессовое воздействие [3, 4].

Исследовали проростки следующих сортов пшеницы: Минуса, Саратовская 29, Мильтурум 533, а также каллусные культуры сортов Таежная, Новосибирская 15, Минуса и селекционной линии КС-1607. Проростки по 25 шт. в каждом варианте, в 4-х повторностях выращивали в сосудах объемом 2 $дм^3$ на керамзите в следующих вариантах: контроль - pH 5,6-5,8; 1 - NaCl 1.68%; 2 - pH 3.0; 3 – засуха (полив прекращали за неделю до измерения параметров). Каллусы получены из незрелых зародышей на среде с 2,4-Д (1 мг/л), пассированы на оптимальную (pH 5,7) и селективные (с NaCl 0,73% или с pH 4,0) среды.

Оценку ФА проводили на флуориметре IMAGING-PAMM-SeriesMAXIVersion (ChlorophyllFluorometer, «HeinzWalzGmbH», Германия). Лист пшеницы перед измерением ФА делили на три части: нижнюю – листовое влагалище; верхнюю треть, отличающуюся максимальной шириной листовой пластины и среднюю часть, имеющую одинаковую ширину листа на всём протяжении. Прижизненную оценку ФА у зеленеющих на свету каллусных клеток, проводили в стерильных чашках Петри. Измерение ФА каллусов производили спустя неделю после их пересадки на селективные среды пролиферации. Достоверность средних величин оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Флуориметр IMAGING-PAMM-SeriesMAXIVersion позволяет одновременно тестировать целый ряд показателей ФА по всей площади листовой пластинки: максимальный уровень флуоресценции (Fm), который положительно связан с содержанием хлорофилла «а», максимальный квантовый выход фотосистемы 2 (Y_{II}), характеризующий степень сформированности и потенциальную функциональную активность реакционного центра, скорость нециклического транспорта электронов (ETR) в режиме записи быстрой световой кривой, ряд других показателей.Согласно работы [0] и нашим наблюдениям ETR и Y_{II} в сравнении с другими показателями отличаются меньшей пространственной неоднородностью, что делает их удобными для проведения скрининга ФА разных генотипов на оптимальном и стрессовых фонах. В данной работе обсуждаются результаты действия стрессовых факторов на световую кривую транспорта электронов (в уравнение для определения ETR входит Y_{II}).

Наибольшие отличия ETR у контрольных и опытных (засоление, засуха) проростков были обнаружены в нижней трети листа (рис. 1), однако при этом вариабельность показателей была значительной. ETR в средней части листа были различны у проростков, выращенных в контрольных и стрессовых условиях, но не между вариантами стрессоров.

При определении ETR у проростков трех разных генотипов, выращенных в условиях засоления, наибольшие различия отмечены при исследовании средней части листа (рис. 2 а-в), где сорт Мильтурум 533 имел достоверно большие показатели по сравнению с двумя другими формами. В условиях засухи ETR сортов Саратовская 29 и Мильтурум 533 достоверно превышали таковые сорта Минуса (рис. 2г) с увеличением плотности светового потока > 111 мкмоль фотонов/$м^2$с , при которых показатели ETR выходили на стационарный уровень. Эта часть световой кривой ETR представляется наиболее репрезентативной для проведения сравнения ФА генотипов в стрессовых условиях.

Для ранней диагностики селекционно-полезных свойств могут быть использованы каллусные культуры. На начальных этапах культивирования каллус представляет собой аморфную массу полупрозрачных клеток. Клетки каллуса приобретают светло-зеленую окраску на следующем световом этапе пролиферации, когда начинается вторичная дифференцировка клеток. Процесс, ведущий к регенерации в высокой степени зависит от условий культивирования и слабо изучен с позиции развития фотосинтетического аппарата.

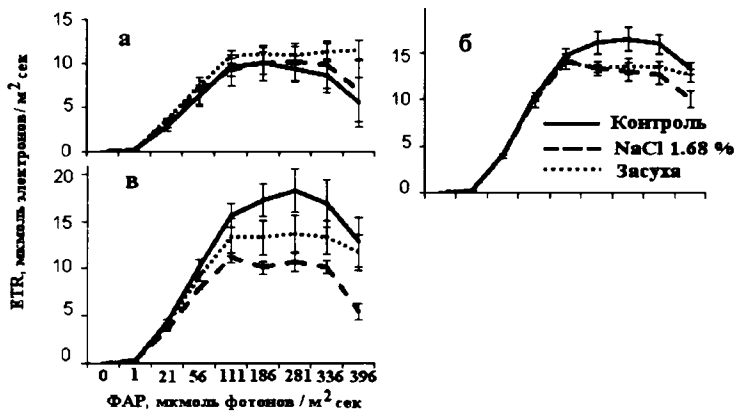


Рисунок 1 - Влияние условий культивирования и локализации ткани листа(а – верхняя треть, б – средняя часть, в – нижняя треть) на световую кривую транспорта электронов

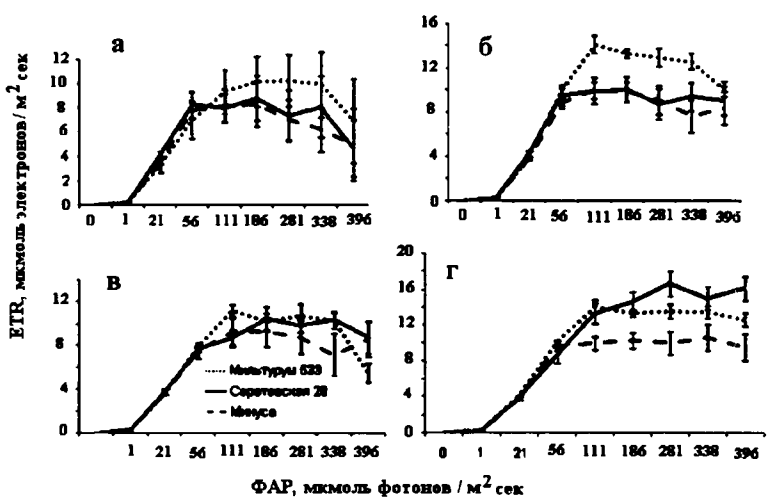


Рисунок 2 - Влияние засоления на скорость транспорта электронов (а-в) в зависимости от локализации ткани листа (а – верхняя, б – средняя, в – нижняя треть) и засухи (г) различных генотипов (средняя треть листа)

Были изучены каллусные ткани мягкой яровой пшеницы (усредненные данные по 4-м генотипам), полученные как в нормальных условиях, так и в условиях засоления и закисления среды (рис. 3).

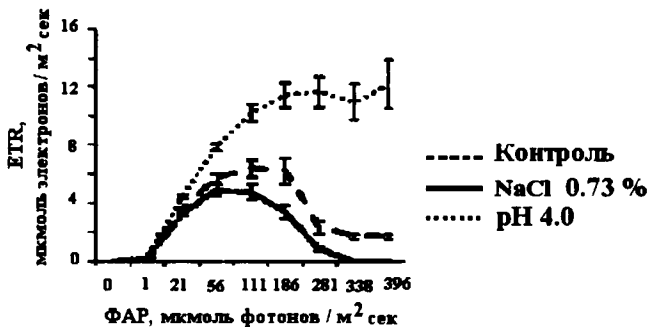


Рисунок 3 – Влияние засоления и закисления среды на скорость транспорта электронов у каллусной ткани мягкой яровой пшеницы в зависимости от ФАР

Различия ФА между контрольными и опытными каллусами достоверны на всех участках световой кривой. В отличие от листьев (рис. 1 и 2) у каллусов в контроле и при засолении ETR снижается до значений близких к нулю (рис.3), демонстрируя эффект фотоингибирования. В кислой среде (pH 4,0) фотоингибирование не проявилось. Не исключено, что степень фотоингибирования ФА у каллусов может служить селективно значимым признаком.

Заключение

Световые кривые транспорта электронов, регистрируемые флуориметром IMAGING-PAM, позволили оценить сформированностьфотосинтетического аппарата и устойчивость ФА у исследуемых сортов пшеницы. Данный биофизический метод отличается чувствительностью и производительностью, позволяет сохранить объект в нативном состоянии и может быть использован для ранней оценки физиологической устойчивости отбираемых генотипов.

Семенной материал, любезно предоставлен сотрудниками лаборатории селекции Красноярского НИИСХ. Работа поддержана за счёт средств, предоставленных путём выделения целевого финансирования КГАУ

«Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках конкурса РФФИ «Сибирь».

Литература

1. Maxwell K., Johnson G. L. Chlorophyll fluorescence – a practical guide // J. Exp. Bot., 2000. – V. 51.- N. 345.- P. 659-668.

2. Князев Б. М., Хамоков Х. А. Фотосинтетическая деятельность и продуктивность сои в условиях недостаточного увлажнения // Зерновое хозяйство. - 2005. - №2. - С. 17-18.

3. Rosenqvist E, Kooten O. V. Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature. / DeEll JR, Toivonen PMA, eds. Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology. - United States of America: Kluwer Academic Publishers. – 2003. – P. 32-71.

4. Schreiber U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview // Advances in Photosynthesis and Respirati. – 2004. – V. 19. – P. 279-319.

5. IMAGING-PAM M-series Chlorophyll Fluorometer Instrument Description and Information for Users. – GmbH: Heinz Walz, - 2006. - 215 p.

Для заметок

Структурные и физиолого-биохимические перестройки в стареющих листьях сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. при нитратном и углеводном стрессах

Г.А. Семенова[1], А.К. Романова[2], Н.С. Новичкова[2], А.Р. Игнатьев[2]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино
[2]Институт фундаментальных проблем Биологии РАН, г. Пущино

Введение

Углерод и азот – ключевые макроэлементы питания растений. Дефицит нитрата, так же как и его избыток, негативно отражались на росте, фотосинтезе и ряде физиолого-биохимических параметров сахарной свеклы [1]. Старение разновозрастных листьев одного и того же растения, выращенного на норме нитрата (1N), использовано в качестве модели физиолого-биохимических изменений в листе [2]. Применение комплексного подхода к исследованию гомеостаза в онтогенезе сахарной свеклы предоставило широкие возможности для оценки изменений в листьях [3]. Ранее было показано, что как при естественном старении листьев сахарной свеклы, так и при старении, "ускоренном" в результате индукции негативного сигнального эффекта ($НСЭ_{глю}$) в высечках из тех же листьев, экспонированных в воде, накапливается глюкоза [4]. Замедлялись: синтез растворимого белка (рБел), биосинтез ключевого фермента автотрофии рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилазы/оксигеназы(РБФК/О) и активности широко распространенной в живой природе растворимой карбоангидразы (рКА), которая катализирует обратимые pH-зависимые взаимопревращения негидратированного диоксида углерода и его гидратированной формы – иона бикарбоната HCO_3^- [2, 4]. Оба фермента использовали ввиду присутствия их значительных количеств в хлоропластах и надежности использования РБФК/О качестве возможной мишени $НСЭ_{глю}$. Однако, непосредственная зависимость увеличения содержания глюкозы и снижения активности РБФК/О и рКА при естественном и ускоренном старении отсутствовала. Проявление $НСЭ_{глю}$ для биосинтеза рБел и, в частности, для РБФК/О было связано со старением листа и растения в целом [4]. Роль азотного питания в проявлении $НСЭ_{глю}$ у сахарной свеклы ранее не исследовали.

Задача настоящей работы – описание морфо-физиологических перестроек и одновременно комплексная оценка характерных изменений параметров при дефиците нитрата и в процессе ускоренного старения листьев сахарной свеклы.

Методы

Сахарную свеклу *Beta vulgaris* L. выращивали в песчаной культуре с трехкратным в неделю поливом смесью Кнопа (1N) и в остальные дни водой. После 5 недель роста на полной смеси Кнопа $Ca(NO_3)_2$ питательной смеси заменяли на $CaCl_2$ (ДефN). Использован комплексный подход для оценки гомеостаза старых (в данном случае третьих) листьев при действии стрессов [2]. Накопление глюкозы – важнейшее условие для проявления негативного сигнального эффекта ($НСЭ_{глю}$) – создавали путем задержки оттока фотометаболитов из высечек листьев после выдерживания их в плавающем состоянии на поверхности воды в течение 41 часа в условиях роста: свет/темнота (часы) 6/8/16/8/3. Из тех же листьев отбирали пробы на микроскопирование. Для структурных исследований высечки листьев (2x2 мм) фиксировали 3%-нымглутаровым альдегидом в фосфатном буфере с постфиксацией 1%-нымтетраоксидом осмия. Дальнейшую обработку производили соответственно стандартным процедурам. Биохимические анализы и определение активности рКА проводили с использованием традиционных методов [2].

Результаты

Выращивание сахарной свеклы при ДефN приводило к существенным морфологическим изменениям листьев [4]. В данном исследовании число живых листьев при 1N было больше, чем после роста при ДефN, а число отмерших листьев – наоборот, меньше. Это являлось основанием для предположения о том, что отмирающие листья могут поддерживать рост новых молодых листьев и корня за счет продуктов протеолиза. Частота появления листьев у 1N-растений была на 30% больше, чем при дефиците N. При микроскопировании видны различия структуры листьев: в варианте 1N толщина исследуемого (третьего) листа была минимальной, а плотность укладки клеток максимальной. Клеточные мембраны во всех вариантах были интактны, а вакуоли занимали до 80% площади среза. При этом в узком цитоплазматическом тяже 80% площади занимали хлоропласты. Структура цитоплазмы в 1N-нормальная, а в ДефN-листе в некоторых клетках деградирована. В высечках $1N_{H2O}$ и в $ДефN_{H2O}$ повторялась их исходная структура. Отношение длина:ширина хлоропластов в листьях варианта 1N (=3.0) больше, чем при дефиците N (=2.2), что соответствует бьльшей фотосинтетической активности 1N-хлоропластов [4]. В хлоропластах 1N-листьев обнаружены некрупные крахмальные зерна. В ДефN-хлоропластах крахмала было так же мало, но преобладали массивныепластоглобулы. После инкубации высечек в воде в хлоропластах вариантов как $1N_{H2O}$, так и $ДефN_{H2O}$, появились крупные крахмальные зерна и

немного глобул. Ядерные структуры во всех вариантах были в норме, кромеварианта ДефN_{H2O}, где имеются признаки конденсация ядра. Форма митохондрий (МХ), в 1N-листьях и в 1N_{H2O} была округлой, а матрикс почти не содержал крист и был электронно-прозрачен. При ДефN, как и в варианте ДефN_{H2O}форма МХ становилась более вытянутой, а матрикс более плотным и появлялись кристы. Значительные различия в структуре митохондрий отражали их функциональную активность.

Снижение параметров азотсодержащих продуктов: растворимого белка (рБел) и активности рКА наблюдали во всех неблагоприятных условиях: ДефN, 1N_{H2O} и ДефN_{H2O}(табл. 1). В целях сравнения изменений параметров силу негативного воздействия на содержание рБел и активность ферментов выражали в % снижения соответствующих величин, принимая за 100% значения для листа 1N-варианта. Содержание рУгл в третьем листе всех вариантов опыта было выше содержания глюкозы и увеличивалось более, чем вдвое, только в варианте 1N_{H2O} (таблица). В варианте 1N_{H2O} содержание глюкозы в листьях возросло в 9.4 раза. Такое накопление глюкозы, инициированное экспозицией высечек листьев, могло быть достаточным для выявления $НСЭ_{глю}$ по снижению содержания белка и/или ферментов. Однако, при совместном действии стрессов (вариант ДефN_{H2O})содержание глюкозы возросло лишь на 21.8%, (хотя и было более чем в 1.5 раза больше, чем в варианте ДефN). Чем больше снижение содержания ("пулов") азотсодержащих продуктов стареющего листа (рБел и рКА), тем сильнее выражена его донорная функция и более сбалансирован обмен с растущими органами целого растения, что свойственно сеянцам сахарной свеклы до возраста 4-6 недель [2]. При старении лист-акцептор превращается влист-донор, что особенно отчетливо выражено в самом старом из остающихся живых листьев. Содержание рБел при ДефN и в варианте ДефN_{H2O} по сравнению с контролем (вариант 1N) снижалось практически одинаково: на 42.1%, на 45.0%. В отличие от этого в варианте 1N_{H2O}, отражающем силу $НСЭ_{глю}$, содержание рБел было лишь на 16.5 % ниже, чем в контроле. Это означает, что негативное действие дефицита нитрата на содержание рБел в 3-м листе 54-дневного растения имеет явное преимущество по сравнению с действием избытка глюкозы после экспозиции на воде (вариант ДефN_{H2O}). Это подтверждается наблюдением, что при совместном действии двух стрессов (вариант ДефN_{H2O}) негативное действие на содержание белка было лишь незначительно сильнее, чем сумма индивидуальных эффектов ДефN и 1N_{H2O} по отдельности. Следовательно, снижение активности рКА в вариантах с ДефN, т.е. при ДефN отдельно и при ДефN_{H2O} (совместно) было обусловлено именно дефицитом нитрата. Специфический ингибитор, подавляющий активность рКА при старении листа, не известен. Резкое и закономерное снижение активности рКА может рассматриваться как результат практически полного протеолиза белка фермента и транспорта продуктов распада в другие, растущие ткани. У 56-дневной сахарной свеклы имеется только два органа-акцептора: корень, рост которого усиливается с началом сахаронакопления [5], и вновь формируемые листья, остро нуждающиеся в восстановленном азоте аминокислот в условиях острого дефицита нитрата. Умеренное снижение активности рКА и еще меньшее рБел в варианте 1N_{H2O} демонстрирует принципиальную возможность возникновения $НСЭ_{глю}$ и снижении активности рКА только вдвое. Результаты совместного воздействия двух стрессов в варианте ДефN_{H2O}, показывают, что эффект ДефN имеет приоритет по сравнению с $НСЭ_{глю}$. Исходя из гипотезы о возможности использования продуктов протеолизарКА в качестве источника азота,можно предполагать, что, несмотря на умеренное содержание (1-2% от рБел хлоропласта) рКА в фототрофных клетках [6], она может достаточно эффективно исполнять донорную функцию стареющего листа растения в 50-60-дневном возрасте.

Таблица 1 - Содержание метаболитов и активности рКА при ДефN до и после выдержки высечек из листьев на поверхности воды. Третий настоящий лист после появления семядолей. Возраст растения 55 дней; из них первые 30 дней рост в присутствии нитрата, остальные 25 дней без подкормки нитратом. Плотность квантов света 250 мкмоль. $м^{-2}. с^{-1}$. Фотопериод – 16 часов. Температура 28 º ±2 º С.

Измеряемые величины	Варианты опытов			
	1N	ДефN	1N_{H2O}	ДефN_{H2O}
Метаболиты				
рУгл безГлю,мг	20.56±0.12	16.38±0.15	44.05±0.20	17.4±0.2
Глюкоза –"–	1.79±0.11	0.83±0.04	13.07±0.15	2.18±0.15
рБелок–"–	13.34±0.13	7.72±0.06	11.14±0.10	7.33±0.07
рУгл/рБел	1.68±0.02	2.23±0.01	5.13±.05	2.37±0.02
Фермент				
рКАмкмоль / мин	10050±100	50±75	5080±508	35±33

Анализ результатов морфологического и физиолого-биохимического исследований влияния дефицита нитрата и увеличения пула углеводов (глюкозы) в старом листе растения в началесахаронакопления показывает, что оба стресс-генерирующих фактора приводят к значительным изменениям

мезо- и ультраструктуры. Изменяются формы хлоропластов, митохондрий и масса крахмальных зелен и пластоглобул. Резкое снижение активности рКА происходило при дефиците нитрата и при умеренном снижении рУгл и глюкозы до и, наоборот, при заметном увеличении их количества в высечках. $НСЭ_{Глю}$ при высоком накоплении глюкозы выразился в снижении активности рКА только на 50% и был сравним с эффектом на активность РБФК/Ов тех же условиях (не показано). Следовательно, оба фактора в разной степени могут отрицательно влиять на активность рКА. При этом заметные структурные изменения в ядрах наблюдались только при влиянии обоих факторов.

Литература

1. Романова А.К., Мудрик В., А., Полякова В.А., Демидова Р.Н. и Новичкова Н.С. // Физиол. Раст. 2002. Т. 49. С. 230 – 237. 6. Романова А.К. //Физиология растенийю.- 2005. - Т.52. - С. 129–145.

2. Романова А.К, Новичкова. Н.С., Игнатьев А.Р.,Мудрик В.А. и Иванов Б.Н. // Физиология растений. – 2011. - Т.56. - С. 221–233.

3. Новичкова Н.С., Романова А.К., Игнатьев А.Р., Власова Т.А., Креславский В.Д. и Иванов Б.Н. // Физиология растений. – 2006. - Т.53. - С. 493 – 502.

4. Новичкова Н.С., Романова А.К., Игнатьев А.Р. Мудрик В.А.., Пермяков С.Е. и Иванов Б.Н. // Физиология Растений. - 2008. - Т.55. - С. 219–229.

5. Балахонцев Е.Н. Минеральное питание и продуктивность сахарной свеклы / М.: Наука, 1988, 101с. 6. Иванов Б.Н., Игнатова Л.К., Романова А.К. // Физиология растений. – 2007. - Т.54. - С.165–185.

Для заметок

Грамположительные спорообразующие бактерии глубинных подземных горизонтов Западно-Сибирского нефтегазоносного бассейна

Ю.А. Франк, О.В. Карначук

Томский государственный университет

К настоящему времени охарактеризованы многочисленные микробные сообщества нефтяных месторождений, имеющих различную локализацию, геологические особенности и способы эксплуатации. Однако, как отмечают некоторые исследователи (например, [1]), наши знания о филогенетическом разнообразии и динамике сообществ прокариот глубинных нефтеносных пластов, понимание их метаболических особенностей и экологической роли далеки от совершенства. В частности, вопрос об истинно аборигенной микрофлоре нефтяных месторождений, поставленный еще в начале 20 века [2], до сих пор активно обсуждается в литературе [3-5].

Грамположительные спорообразующие бактерии отдела *Firmicutes* являются важной составляющей глубинной подземной биосферы. Результаты нескольких работ [6], [7] свидетельствуют о том, что фирмикуты могут составлять большинство прокариот, обитающих в глубоко расположенных породах и гидротермальных флюидах под ложем океана. В уникальном *in situ* эксперименте по колонизации микроорганизмами базальтов океанического ложа [8] показано, что *Firmicutes* доминируют (до 52% всех прокариот) на поздних стадиях заселения подземных экосистем, сменяя сообщество железоокисляющих микроорганизмов. Возможная метаболическая роль грамположительных спорообразующих бактерий, как предполагается, связана с участием в циклах серы и азота.

Объектами настоящего исследования стали бактерии глубинных экосистем (1.8-2.6 км), связанных с месторождениями нефти Западно-Сибирского нефтегазоносного бассейна. Месторождения нефти и газа Западной Сибири малоизученны с микробиологической точки зрения. Лишь единичные работы с применением информативных современных методов посвящены оценке разнообразия и возможных биогеохимических функций микроорганизмов из нефтегазоносных пластов этого региона (например, [9]). Основной задачей исследования было выявление доминирующей части бактериальных сообществ из пластового флюида и нефти Столбового месторождения и термальной воды нефтепоисковой скважины 3Р в Томской области. Анализировали также нефтесодержащий пластовый флюид Самотлорского месторождения нефти в Тюменской области.

Для оценки филогенетического разнообразия микробных сообществ использован метод ПЦР-ДГГЭ, подразумевающий разделение смеси амплифицированных фрагментов генов в денатурирующем градиенте с последующей экстракцией ДНК из геля, секвенированием и анализом последовательностей. ПЦР-ДГГЭ позволяет получить информацию о филогенетическом разнообразии доминирующих микроорганизмов в природных и лабораторных образцах и используется для сравнительного анализа микробных сообществ [10], [11]. Был выполнен молекулярный скрининг доминирующих бактерий в образцах воды и пластовых флюидов нефтяных месторождений с использованием в качестве мишеней гена 16S рРНК и функционального гена сульфатредукции *dsr*AB. Бактериальное сообщество термальной подземной воды из глубинного водоносного горизонта, вскрытого нефтепоисковой скважиной 3Р в Парабельском районе Томской области, исследовали в динамике с 2009 по 2012 гг.

Подавляющее большинство бактериальных филотипов из глубинного водоносного горизонта, вскрытого нефтепоисковой скв. 3Р, принадлежали представителям *Firmicutes*. Для значительной части филотипов, обнаруженных в воде в разное время года, наиболее близкородственным (98-99%) организмом является *Desulfovirgula thermocuniculi*, впервые выделенная из геотермальной шахты в Японии [12]. Род *Desulfovirgula* классифицируют внутри порядка *Thermoanaerobacterales* отдела *Firmicutes*. По результатам последнего ПЦР-ДГГЭ анализа на основе гена 16S рРНК, 100% филотипов принадлежало грамположительным спорообразующим бактериям. Помимо последовательностей, гомологичных *D. thermocuniculi*, в воде скважины выявлена группа бактериальных филотипов, принадлежащих уникальным микроорганизмам, демонстрирующим очень отдаленное родство с термофильными фирмикутами *Caldanaerovirga acetigignens* (86% гомологии), *Gelria glutamica* (88-89%), *Lutispora thermophila* (87%).

Доминирующие бактериальные филотипы из пластовой воды и водно-нефтяной эмульсии Самотлорского и Столбового месторождений нефти также принадлежали ветви *Firmicutes*. Большинство филотипов, полученных из пластовой воды и флюида (водно-нефтяной эмульсии) Самотлорского месторождения путем анализа гена 16S рРНК, были близки *Desulfotomaculum geothermicum* и *Desulfotomaculum thermosubterraneum* (83.5 - 92.6% гомологии последовательности). Представители *Desulfotomaculum* были ранее зафиксированы в пластовой воде Самотлорского месторождения путем молекулярного анализа с

использованием микрочипа и культуральными методами [9]. В настоящем исследовании выявлены также филотипы, дальнородственные другим валидно описанным фирмикутам *Thermoanaeromonas toyohensis* (86.4 - 87.6% гомологии) и *Gelria glutamica* (87.5 - 88.6%). Единственный протеобактериальный филотип, найденный в водно-нефтяной эмульсии Самотлорского месторождения, принадлежал к роду *Acinetobacter*.

За небольшим исключением бактериальные филотипы из пластового флюида и сырой нефти Столбового месторождения также относились к грамположительным спорообразующим прокариотам. В отличие от Самотлорских филотипов, большинство представителей *Firmicutes*, обнаруженных в образцах из пластов Столбового месторождения, группируются внутри порядка *Clostridiales*. Два филотипа на 97% гомологичны *Clostridium caminithermale* и *Clostridium halophilum*. Один филотип из сырой нефти Столбового месторождения представляет собой глубокую ветвь в том же кластере (*C. caminithermale*) и не имеет ближайших родственников с гомологией выше 89%. Один из бактериальных филотипов, полученных при разделении фрагментов гена 16S рРНК, был родственен *Desulfotomaculum geothermicum* с 90.1% гомологией. Несколько найденных последовательностей были гомологичны 16S рДНК *Acetobacterium* (ближайший культивируемый организм *A. carbinolicum* с 93.9 - 99.8% гомологией). Два филотипа из водно-нефтяной эмульсии и сырой нефти Столбового месторождения не имели ближайших родственников среди культивируемых и некультивируемых микроорганизмов с гомологией выше 88%. Надо отметить, что при сравнении между собой эти два филотипа не показали высокого сходства последовательностей (лишь 83%).

Путем молекулярной детекции функционального гена *dsr*AB подтверждено присутствие в глубинных пластах Западно-Сибирского нефтегазоносного бассейна микроорганизмов, способных к диссимиляционной сульфатредукции. Среди них также найдены представители грамположительных спорообразующих *Frimicutes*. Так фрагмент гена *dsr*B, полученный из осадка пластового флюида Столбового месторождения нефти, представлял единственный сульфатредуцирующий прокариотический организм. Уникальный филотип демонстрировал лишь 77% гомологию с последовательностью *dsr*B *Desulfotomaculum acetoxidans*.

Таким образом, спорообразующие грамположительные бактерии отдела *Firmicutes* представляют важную часть микробных сообществ глубинных экосистем Западно-Сибирского нефтегазоносного бассейна. Фирмикуты заметно доминировали среди филотипов, полученных в ходе разделения амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК из всех проанализированных месторождений. Таксономическая принадлежность бактериальных филотипов внутри отдела варьировала. Наибольшее число филотипов принадлежали *Clostridiales* и *Thermoanaerobacteriales*. Значительная часть найденных микроорганизмов не имеет культивируемых родственников и относится к еще неописанным филогенетическим группам бактерий внутри отдела *Firmicutes*.

Исследование поддержано грантом РФФИ мол_а № 12-04-31370 и грантом Президента РФ (МК-919.2013.4).

Литература

1. Yuossef N., Elshahed M.S. and McInerney M.J. Microbial processes in oil fields: culprits, problems and opportunities // Advances in applied microbiology. – 2009. - V. 66. – P.141-251.
2. Bastin E.S. The presence of sulphate-reducing bacteria in oil field waters // Science. – 1926. - V. 63. – P.21-24.
Stetter K.O., Huber R., Blochl E., Kurr M., Eden R.D., Fielder M., Cash H. and Vance
3. Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs // Nature. – 1993. – V. 365. – P.743–745.
4. Magot M., Ollivier B. and Patel B.K.C. Microbiology of petroleum reservoirs // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2000. – V. 77. – P.103-116.
5. Magot M. Indigenous microbial communities in oil fields. In: Petroleum microbiology, Ollivier B., Magot M. Eds., ASM Press, Washington DC, 2005. – P.21 - 34.
6. Cowen J.P., Giovannoni S.J., Kenig F., Johnson H.P., Butterfield D., Rappé M.S., Hutnak M., Lam P. Fluids from aging ocean crust that support microbial Life // Science. – 2003. – V.299. – P.120–123.
7. Nakagawa S., Inagaki F., Suzuki Y., Steinsbu B.O., Lever M.A., Takai K., Engelen B., Sako Y., Wheat C.G., Horikoshi K. Microbial community in black rust exposed to hot ridge flank crustal fluids // Appl Environ Microbiol. – 2006. – V. 72. – P.6789–6799.
8. Orcutt B.N., Bach W., Becker K., Fisher A.T., Hentscher M., Toner B.M., Wheat C.G. and Edwards K.J. Colonization of subsurface microbial observatories deployed in young ocean crust // ISME J. – 2011. – V.5(4). – P. 692-703.
9. Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Nazina T.N., Ivoilov V.S., et al. Radioisotopic, culture-based and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high temperature petroleum reservoir // Appl Environ Microbiol. – 2003. – V.69. – P. 6143-6151.
10. Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural

ecosystems // Current opinion in Microbiology. – 1999. – V. 2. – P.317-322.
11. Green S.J., Leigh M.B., Neufeld J.D. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. In: Microbiology of Hydrocarbons, oils, lipids and derived compounds, Timmis K. Ed., Springer (Heidelberg, Germany), 2009. – P. 4137-4158.
12. Kaksonen A.H., Spring S., Schumann P., Kroppenstedt R.M. and Puhakka J.A. *Desulfovirgula thermocuniculi* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducer isolated from a geothermal underground mine in Japan // Int J Syst Evol Microbiol. – 2007. - 57 (PT 1). – P. 98-102.

Для заметок

Микроводоросли горных местообитаний – объекты перспективные для биотехнологии

Е.Н. Патова, И.В. Новаковская, Н.В. Матистов, М.Д. Сивков, В.В. Володин

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

За счет небольших размеров, высокой устойчивости к экстремальным условиям среды, быстрого размножения микроводоросли рассматриваются как ценнейший возобновляемый сырьевой ресурс широко используемый в биотехнологии для производства биологически активных веществ (БАВ) [2]. Особое внимание в настоящее время уделяется поиску видов, обитающих в различных природно-климатических зонах, способных быстро накапливать биомассу и синтезировать различные БАВ. К широко распространенным и устойчивым к экстремальным условиям, способным накапливать липиды, вторичные каротиноиды и крахмал в широком диапазоне, относят водоросли *Eustigmatosmagnus* (Peters.) Hibberd, *Dictyococcusvarians*Gerneck,*Halochlorellarubescens*Dang.,*Pseudococcomyxasimplex* (Mainx) Fott и *Scotiellopsisterrestris* (Reisigl) Punč. etKalina., являющиеся в том числе важными компонентами почвенной и водной биоты в горных экосистемах Полярного и Приполярного Урала [3].

Цель работы - изучение морфологических, количественных и биохимических особенностей штаммов *Eustigmatosmagnus*, *Dictyococcusvarians*,*Halochlorellarubescens*, *Pseudococcomyxasimplex* и *Scotiellopsisterrestris* из коллекции живых культур Института биологии Коми НЦ УрО РАН.

Для культивирования были использованы штаммы, выделенные из различных горно-тундровых сообществ (разнотравно-злаково-ивнякового (h – 630 м над ур. м.) - *Eustigmatosmagnus*, вторичной злаковой луговины (h – 697 м над ур. м.) - *Dictyococcusvarians*, травяно-мохово-каменистого (h – 185 м над ур. м.) - *Halochlorellarubescens*, кустарничково-лишайникового (h – 189 м над ур. м.) - *Scotiellopsisterrestris* и из почвы угольных отвалов - *Pseudococcomyxasimplex*) Полярного и Приполярного Урала, а также о. Шпицберген в 2009-2011 г. [3]. Очистку штаммов от сопутствующих грибов и бактерий проводили методом нескольких разведений (по Больду) и смесью антибиотиков и фунгицидов. Очистить культуры с наименьшим токсическим эффектом для водорослей позволили растворы пенициллина и бифосина, а также левомицетина и нистатина.

Для культивирования штаммы помещали в стеклянные колбы со 100 мл жидкой среды 3N-BBM (pH 5.58). Наращивание биомассы проводили на шейкере (Elpan 357) с амплитудой 6 и скоростью 110 с.р.m. в течение шести-девяти недель при температуре t = 22-24 С. Для инициации роста клеток использовали световую установку с лампами SylvaniaGero-Lux с плотностью потока фотонов 32 мкМоль $м^{-2} \cdot с^{-1}$. Соотношение периодов свет/темнота – 14/10 часов. Исследование водорослей проводили на микроскопах ZeissAxioLab и NikonEclipse 80i при увеличении в х400, х1000 раз. Количественный счет клеток водорослей выполнен с помощью камеры Горяева. Размеры клеток определены с использованием программы AxioVisionRel. 4.7. Для оценки роста биомассы использовали метод спектроскопирования образцов в отраженном свете с применением спектрорадиометраFieldSpec HH 325-1075 (США). Прирост биомассы оценивали по индексу Chl NDI, вычисляемого по формуле (R750 - R705)/(R750 + R705), в которой R705 и R750 отражательные способности в длинах волн 705 и 750 нм соответственно, обычно применяемых для оценки хлорофилла в растительных объектах.

Культуры, выращенные в лабораторных условиях, концентрировали с помощью центрифугирования, далее высушивались под вакуумом в эксикаторе с водоотнимающим агентом. Сухие образцы повергались экстракции для извлечения суммы общих липидов. Для выделения ОЛ мелко измельченные сухие водоросли подвергали трехкратной экстракции смесью гексана/этиловый спирт в соотношении 96/4 при комнатной температуре и постоянном перемешивании на перемешивающем устройстве LS210 LOIP (Россия). Экстракты объединяли, фильтровали через слой безводного Na_2SO_4 для удаления остатков воды и упаривали в вакууме на роторном испарителе при температуре не выше 40 С (для предотвращения окисления липидов) до полного исчезновения запаха растворителя. Массовую долю ОЛ определяли гравиметрическим методом.

При культивировании водорослей значимых морфологических изменений, по сравнению с природными популяциями отмечено не было. Размеры и форма клеток исследованных нами штаммов микроводорослей (табл. 1) соответствуют приведенным в определителях [1, 4].

Из исследованных штаммов наибольшими размерами характеризуются микроводоросли *Dictyococcusvarians* и *Scotiellopsisterrestris*. При этом максимальные количественные показатели развития (табл. 1) при одинаковых условиях культивирования были отмечены для мелкоклеточного вида*Halochlorellarubescens*, что в первую очередь связано с быстрой скоростью размножения микроводоросли.

Таблица 1 - Морфологические и количественные показатели исследованных штаммов микроводорослей

Штамм	Средние размеры клетки (мкм)		Максимальные размеры клетки (мкм)		Числен-ность клеток/л	Биомасса г/л
	длинна	ширина	длинна	ширина		
Eustigmatosmagnus	9-9.4		12.5		$4\text{-}26.8\cdot10^9$	10.3±1.3*
Dictyococcusvarians	7.2-8.6		31.3		$17.5\text{-}17.7\cdot10^9$	3.5±0.8
Halochlorellarubes-cens	5.55-8.52		12.45		$26\text{-}36\cdot10^9$	14.7±2.2
Pseudococcomy-xasimplex	6.7-6.75	2.9-3.1	11.3	1.92±0.59	$19.5\text{-}54\cdot10^9$	1.9±0.6
Scotiellopsister-restris	15.7-8.5	8.8-14.3	22	4.3±1.4	$1.4\text{-}2.9\cdot10^9$	4.3±1.4

* - погрешность определения биомассы

Процессы накопления биомассы в лабораторных условиях были изучены для всех исследованных штаммов. Динамика среднесуточного роста культуры, отражающего накопление биомассы приведена на примере *Halochlorellarubescens*(рис.). При заданных условиях рост культуры начинался спустя 10 суток после посева пробы. Явно выраженный прирост биомассы прекратился к концу эксперимента (45 дней). Максимальную скорость роста биомассы наблюдали в пробе на 22 сутки после посева (рис.1). Затем произошло резкое снижение скорости роста и постепенное снижение прироста биомассы до нулевых значений в конце эксперимента. Среднесуточный прирост биомассы за период вегетации составил примерно 0.27 г/л.

Среди исследованных штаммов микроводорослей наибольшее содержание ОЛ обнаружено для *Halochlorellarubescens* (7.42 %) и *Pseudococcomyxasimplex*(6.81%) (табл. 2). Проведено сравнение накопления липидов и жирных кислот для вышеперечисленных видов в условиях контрастных температур и разной освещенности. Образцы, выращенные в лабораторных условиях при разных температурных режимах, имели отличия в количественном содержании ОЛ, хотя качественный состав их был одинаков, отмечено повышение содержания общих липидов на 50% в микроводорослях выращенных при низких температурах, и при высокой интенсивности света.

Все исследованные микроводоросли отличались простотой получения альгологически чистых штаммов, активным ростом в культуре, способностью быстро наращивать биомассу, и накапливать липиды. Данные виды обладают биотехнологическим потенциалом и могут стать объектами интенсивных исследований. Наибольшая скорость роста и высокое накопление общих липидов отмечено для *Halochlorellarubescens*.

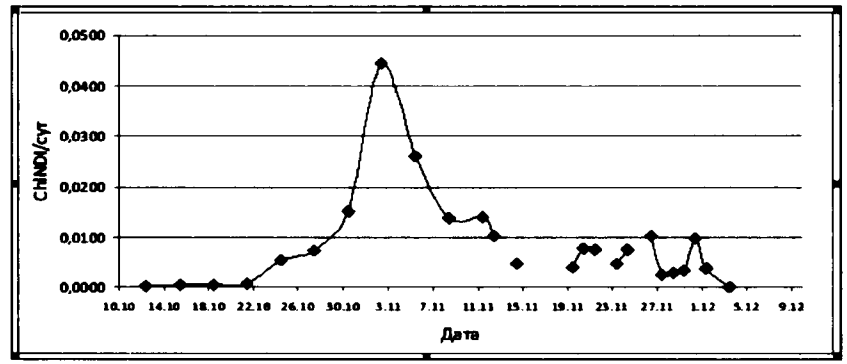


Рисунок 1 - Динамика среднесуточного роста *Halochlorellarubescens* по индексу Chl NDI, измеренная с применением спектрорадиометраFieldSpec HH 325-1075.

Таблица 2 - Массовая доля общих липидов в исследованных штаммов микроводорослей

Штамм	Массовая доля ОЛ, %	Стандартное отклонение
Eustigmatosmagnus	3.07	0.15
Dictyococcusvarians	4.96	0.11
Halochlorellarubescens	7.42	0.12
Pseudococcomyxasimplex	6.81	0.20
Scotiellopsisterrestris	3.85	0.11

Исследования выполнены при поддержке проекта 12-И-4-2007 «Биоресурсный потенциал и биохимическая оценка микроводорослей европейского северо-востока России в качестве объектов биотехнологии».

Литература

1. Андреева В. М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (*Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales*). – СПб.: Наука, 1998. – 351 с.

2.Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н., Терентьева Н. В. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор // Морськийекологічний журнал, 2008. – № 2. – С. 5-23.

3. Новаковская И.В., Патова Е.Н. Коллекция живых штаммов микроводорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН и перспективы ее использования // Изв. Коми научного центра УрО РАН, 2012. – № 2 (10). – С. 36-41.

4. Ettl H. Xanthophyceae. 1 Teil // Sьsswasserflora von Mitteleuropa. Bd. 3.– Stuttgart: G. Fisher, 1978. – 530 p.

Для заметок

Сравнительная оценка состояния фотосинтетического аппарата *Pinus sibirica* и *Pinus pumila* в зимний период

О.Г. Бендер, А.П. Зотикова

Институт мониторинга климатических и экологических систем СО РАН, г. Томск

В зимний период листовой аппарат хвойных вечнозеленых растений бореальной зоны испытывает неблагоприятное воздействие низких температур и высокой инсоляции. Фотосинтез в этот период ингибируется низкими температурами, в то же время хлорофилл сохраняет способность адсорбировать световую энергию. В результате обратимых зимних перестроек структуры хлоропластов, заключающихся в распаде гран и уменьшении числа тилакоидов [1] избыточная световая энергия, поглощенная пигментами передается на кислород, образуя перекисные формы кислорода, которые окисляют липиды мембран и ингибируют функциональную активность фотосинтетического аппарата (ФА) [2]. В процессе эволюции у вечнозеленых растений выработался ряд адаптивных реакций для снижения уровня солнечной радиации, поглощенной фотосинтетическими пигментами. Так хвойные растения, обитающие высоко в горах приобрели стелющиеся жизненные формы и, в суровых зимних условиях толстый снежный покров защищает их не только от низких температур воздуха, но и от избыточной световой энергии [3]. С другой стороны важную защитную роль от избыточной световой энергии играют процессы увеличения количества каротиноидов [4] и усиления деэпоксидации пигментов виолаксантинового цикла в зимний период [5]. При интродукции кедрового стланика на юге Западной Сибири весной неоднократно была отмечена гибель прививок стланика, которые зимовали в надснежном состоянии. Проведенные нами исследования водного обмена хвои показали, что причиной гибели хвои не является ее иссушение [6]. Мы предположили, что зимнее функциональное состояние ФА будет отличаться у хвойных растений различных жизненных форм в связи с разной степенью его защищенности от воздействий низких температур и высокой световой энергии. Для исследования были выбраны два вида: кедр сибирский (*Pinus sibirica* Du Tour), имеющий прямостоячую форму роста и в естественных условиях зимующий в надснежном состоянии и кедровый стланик (*Pinus pumila* (Pall.) Regel), имеющий стелющуюся форму роста и в природе зимующий под снегом. Целью работы была оценка состояния ФА по результатам анализа динамики зеленых и желтых пигментов и показателей флуоресценции хлорофилла в зимний период. В декабре месяце первая группа объектов была полностью засыпана снегом. Со второй группы растений снег удалялся в течение всего периода наблюдений, т.е. объекты зимовали в надснежном состоянии. С декабря по апрель с 5 деревьев каждого вида отбирали образцы однолетней хвои для определения содержания фотосинтетических пигментов и параметров индуцированной флуоресценции хлорофилла. Определение содержания фотосинтетических пигментов проводили на спектрофотометре UV-1600 (Shimadzu, Япония). Флуоресценцию хлорофилла определяли с помощью портативной фотосинтетической системы Li-6400 XT (LiCor, США).

Проведенные исследования показали, что содержание хлорофиллов и каротиноидов в надснежной и подснежной хвое различалось у обоих видов и имело определенную сезонную динамику (табл.). Однако если у кедра сибирского содержание фотосинтетических пигментов снижалось в зимние месяцы, как в надснежной, так и в подснежной хвое, то у кедрового стланика количество хлорофиллов в подснежной хвое изменялось незначительно, а в надснежной уменьшалось до 50%. Это, вероятно, является результатом длительной адаптации к перезимовке данного вида под снегом. Значительное мартовское снижение пула хлорофиллов можно объяснить разрушением пигментов под воздействием сильной инсоляции в данный период. Если содержание зеленых пигментов в зимние месяцы снижалось по сравнению с летним периодом [7], то количество каротиноидов наоборот зимой увеличивалось, что связано с их защитной функцией, при этом у кедрового стланика количество желтых пигментов было меньше, чем у кедра. Кроме того, отношение хлорофиллов к каротиноидам (табл.), в основном, было выше у стланика, что указывает на снижение их доли в общем пигментном фонде, особенно в подснежной хвое. Расчет размеров пигмент-белковолипидных комплексов хлоропластов показал, что в декабре в большей степени разрушался светособирающий комплекс (ССК), а в последующие месяцы изменения фотосинтетических мембран были более значительными и затрагивали ПБЛК фотосистем. Так доля ССК в общем пигментном фонде кедра сибирского с декабря по март увеличилась с 39 до 53 % в надснежной и до 57 % в подснежной хвое. У кедрового стланика изменения пигментного комплекса надснежной хвои были больше, по сравнению с подснежным вариантом, так как процент ССК к концу зимы достигал, соответственно, 64 % и 58 %.

Сезонная динамика максимального квантового выхода фотохимии ФС II (Fv/Fm), отражающего количество активных комплексов была сходной у обеих групп и видов: уменьшалась с декабря по февраль, и затем

увеличивалась в апреле (рис.). Во время всего периода наблюдений в надснежной группе растений величина Fv/Fm была выше в 1,5-2 раза у кедра сибирского, чем у кедрового стланика. Противоположная картина наблюдалась в подснежной группе объектов: в зимние месяцы величина Fv/Fm у кедра сибирского была ниже, чем у кедрового стланика в 2-3 раза. Ранней весной количество активных комплексов у кедра сибирского превышало их число у кедрового стланика на 45% в марте и 10% в апреле.

Таблица 1 – Динамика содержания суммы хлорофиллов и каротиноидов (мкг/г сухой массы) в хвое кедра сибирского и кедрового стланика в зимний и ранневесенний периоды

Показатель	Сроки отбора проб, месяц	*Pinus sibirica*		*Pinus pumila*	
		Варианты			
		надснежный, норма	подснежный, эксперимент	надснежный, эксперимент	подснежный, норма
Сумма хлорофиллов	XII	1634±24	1689±31	1374±12	1663±29
	I	1674±32	1621±25	1189±23	1655±32
	II	1683±18	1415±23	1117±24	1693±11
	III	1343±20	1573±14	613±35	1642±28
	IV	2039±26	1933±39	1448±14	1330±16
Сумма каротиноидов	XII	515±14	520±18	302±12	436±15
	I	613±18	527±20	328±11	386±10
	II	623±25	596±28	364±17	353±25
	III	406±10	436±27	218±20	337±12
	IV	507±22	609±29	531±11	374±16
Хлорофилл/ Каротиноиды	XII	3,17	3,25	4,55	3,81
	I	2,73	3,08	3,62	4,29
	II	2,70	2,37	3,07	4,80
	III	3,31	3,61	2,81	4,87
	IV	4,02	3,17	2,73	3,56

Расчеты величин реального квантового выхода фотохимической активности ФС II (ФpsII) характеризующих долю световой энергии, используемой в процессе электронного транспорта показали, что ФpsII имела низкие значения в зимние месяцы и возрастала на 30-55% в апреле (рис.). Величина ФpsII в надснежной хвое обоих видов была ниже, чем в подснежной на 15-30%. У кедра сибирского в надснежной и в подснежной хвое доля световой энергии, используемой в процессе электронного транспорта, была выше, чем у кедрового стланика на 20-30%.

Скорость транспорта электронов в мембранах тилакоидов (ETR) имела минимальные значения в декабре-феврале, в марте-апреле наметилась тенденция к увеличению ETR (рис.). Во все сроки наблюдений подснежная хвоя кедра и стланика имела более высокую скорость транспорта электронов, чем хвоя соответствующих надснежных образцов.

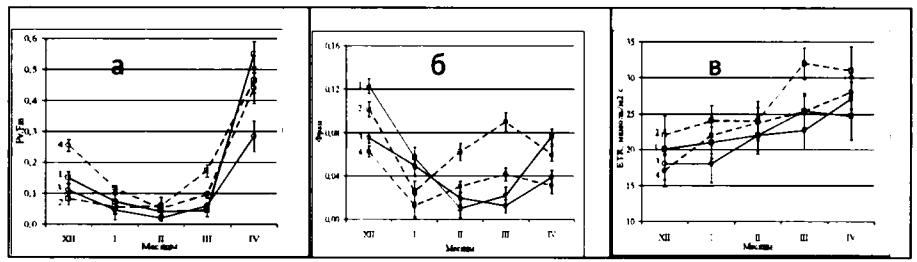


Рисунок 1 – Средние значения максимального квантового выхода фотохимии ФС II (а), реального квантового выхода фотохимической активности ФС II (б) и скорость транспорта электронов в мембранах тилакоидов (в) в надснежной и подснежной хвое в зимний и ранневесенний период: 1 – *P. sibirica,* надснежная хвоя, 2 – *P. sibirica,* подснежная хвоя, 3 – *P. pumila,* надснежная хвоя, 4 – *P. pumila,* подснежная хвоя

Оценка доли тепловой диссипации (D) показала, что наибольшие потери энергии возбуждения происходили у всех видов с декабря по март и составили 0,85-0,95 от световой энергии, поглощенной ФС II. В апреле величина D возрастала на 10-20%. Показатель D был достоверно ниже в хвое подснежной группы, причем кедр сибирский имел более низкие значения, чем стланик. В надснежном варианте величина тепловой диссипации была максимальной у кедрового стланика.

Таким образом, различия исследованных параметров в надснежной и подснежной хвое были более выражены у кедрового стланика, что свидетельствует о большой роли снежного покрова в защите фотосинтетического аппарата от неблагоприятных зимних факторов. Анализ содержания пигментов и показателей флуоресценции в хвое кедра сибирского позволяет предположить, что данный вид характеризуется лучшими механизмами защиты от низких температур и солнечной радиации в зимний период по сравнению с кедровым стлаником.

Литература

1. Ходасевич Э.В., Арнаутова А.И., Мышковец Е.Н. Ультраструктурная организация хлоропластов в связи с обратимой деградацией фонда пигментов у хвойных // Физиология растений. - 1978. - Т.25. – С. 810-814.

2. Sharma K.P., Singhal S.G. The role of thylakoid in the photodamage of photosynthetic activity // Physiol. Plant. - 1992. - V.86. - P. 623-629.
3. Lehner G., Lütz C. Photosynthetic functions of cembran pine and dwarf pines during winter at timberline as regulated by different temperatures, snowcover and light // J. Plant Physiol. - 2003. - № 160. - P.153-166.
4. Маслова Т.Г., Мамушина Н.С., Шерстнева О.А., Буболо Л.С., Зубкова Е.К. Структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата зимневегетирующих хвойных растений в различные сезоны года // Физиология растений. - 2009. - Т.56. - С. 672-681.
5. Adams W.W.III, Zarter C.R., Ebbert V., Demig-Adams B. Photoprotective strategies of overwinterig evergreens // BioScience. - 2004. - V. 54,№ 1. - P. 41-49.
6. Бендер О.Г., Зотикова А.П. Состояние пигментного фонда и особенности водного режима кедра сибирского, кедрового стланика и их гибридов в клоновом архиве // Материалы VII Всероссийского симпозиума «Контроль окружающей среды и климата». 2010. С. 117-119.
7. Зотикова А.П., Бендер О.Г., Рудник Т.И. Экофизиологические реакции листового аппарата кедра сибирского на изменение климата // Оптика атмосферы и океана. - 2006. - Т. 19, № 11. - С.969-972.

Для заметок

Влияние криогеля на основе поливинилового спирта на рост и развитие почвенных микроорганизмов и растений

Д.А. Филатов[1], Л.И.Сваровская[1], В.С. Овсянникова[1], Ю.З. Гусева[1] , М.С. Фуфаева[1], Е.А.Жук[2].

[1]Институт химии нефти Сибирского отделения Российской академии наук, г.Томск

[2]Институт мониторинга климатических и экологических систем Сибирского отделения Российской академии наук, г.Томск

Наиболее перспективным направлением борьбы с эрозией почв представляется комбинация химического и биологического способов защиты. С этой целью может быть использована технология её криоструктурирования с применением водных растворов поливинилового спирта (ПВС). Криогели на основе ПВС образуются в условиях кристаллизации растворителя (для воды при температуре ниже 0 °С). Температура их плавления превышает + 70 °С. Механические и теплофизические свойства криогелей ПВС зависят от состава и концентрации компонентов исходного раствора, а также от режимов и способов криогенной обработки исходных растворов. Увеличение числа циклов замораживания – оттаивания приводит к упрочнению криогеля [1]. Кроме того, криогели обладают микро- и макропористостью, что обеспечивает свободный массоперенос веществ в объеме криогеля. Они устойчивы во многих средах и мало подвержены биологическому разложению.

Сотрудниками Института химии нефти СО РАН разработан метод получения полимерной матрицы криогеля на основе ПВС с высокой адгезией к песку, глине и т.д. [2]. Твердые и мелкодисперсные ингредиенты грунта могут быть связаны в наполненный криогель, практически неподверженный ветровой эрозии. Преимуществом разрабатываемого метода является комплексный подход к решению проблемы опустынивания почв, основанный на применении криогелей, в комплексе с многолетними травами и древесными породами растений. Полимерная матрица криогеля в почве, с одной стороны, достаточно прочна, чтобы выдержать воздействие эрозионных процессов, с другой – достаточно эластична, чтобы не препятствовать росту растений [3]. Семена прорастают сквозь криогелевый слой и образуют устойчивый зеленый покров

Цель работы – исследовать влияние криогеля на рост и развитие почвенных микроорганизмов и растений.

Ранее нами показано, что модуль упругости почвы с криогелем в 8.5 раз выше по сравнению с обычным криогелем. Экспериментально подтвержденным достоинством структурированной почвы является то, что ее коэффициент теплопроводности на 25 % ниже по сравнению с обычной влажной почвой, этот фактор может повысить выживаемость корневой системы растений в период низких температур. Установлено, что криоструктурированная почва удерживает влагу [4].

С жизнедеятельностью почвенной микрофлоры связаны многие протекающие в почве процессы, в первую очередь – круговорот биогенных элементов, утилизация органических и минеральных соединений, синтез ферментов, витаминов, аминокислот, ауксинов и хелатов, играющих значительную роль в процессах повышения плодородия почвы и питании растений [5].

Результаты опытов в лабораторных условиях показали, что криогель введенный в почву в качестве криоструктурата не угнетает, но в некоторой степени даже ускоряют протекание процессов роста и развития почвенной микрофлоры. Для примера на рисунке 1 представлена кинетика роста гетеротрофных бактерий в контрольной и криоструктурированной почве с семенами некоторых исследуемых растений.

Исходная численность исследуемых микроорганизмов в почве определялась в интервале 40-60·10^3 КОЕ/г почвы. В опытных вариантах по ходу эксперимента численность микроорганизмов превышала контрольные данные в 2-3 раза (рис.1). Это может быть связано с тем, что криогель в почве удерживает влагу, потому в период высоких среднесуточных температур почва будет меньше высыхать, тем самым повышая выживаемость посаженых в ней растений. Активность каталазы на протяжении всего эксперимента значимо не изменяется, а на некоторые сутки даже превышает контрольные данные.

Всхожесть семян многолетних трав в почве наполненной криогелем на 7-13 % превышает всхожесть семян в обычной почве. Всхожесть кедра сибирского на 66 % превышает контрольные данные. Сухая масса надземной части многолетних трав в почве с криогелем на 11-15 % превышает массу растений в обычной почве. Сухая масса кедра сибирского на 73 % превышает массу кедра в контрольной почве (табл. 1).

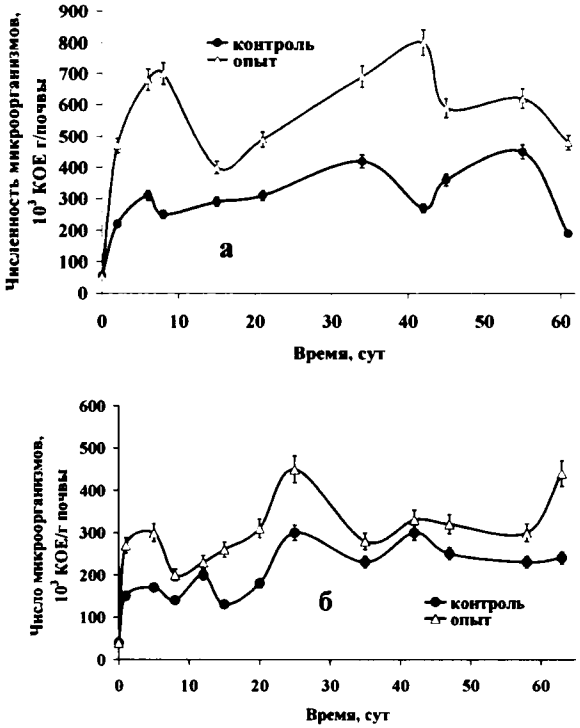


Рисунок 1 – Динамика численности гетеротрофных бактерий в почве с семенами овсяницы красной (а) и клевера ползучего (б)

Таблица 1 – Всхожесть и сухая масса исследуемых растений с применением криогеля

Название растения	Всхожесть семян, %	Сухая масса надземной части, г	
		контроль	опыт
Газонная трава	109±2	0.7621±0.0361	0.8972±0.0273
Клевер ползучий	108±1	2.6473±0.0612	2.9892±0.0445
Клевер горный	108±1	2.5471±0.0741	2.8991±0.0436
Овсяница красная	113±2	0.6893±0.0181	0.7934±0.0192
Копеечник альпийский	107±1	0.7981±0.0562	0.9225±0.0487
Эспарцет песчаный	107±1	0.8871±0.0398	0.9985±0.0411
Астрагал бороздчатый	109±2	0.8211±0.0231	0.9561±0.0317
Кедр сибирский	166±3	20.5800±0.8512	35.7210±0.7810

Проведенные исследования показали, что на 30-ые сутки интенсивность фотосинтеза и транспирации в 2-1,5 раза выше в опытном варианте по сравнению с контролем (табл. 2). На 60-ые сутки интенсивность фотосинтеза в опытном варианте увеличилась в 3,8 раза, интенсивность транспирации не изменялась. Эффективность использования воды у образца с криогелем при первом и втором измерении была выше на 20 % и 260 %, соответственно.

Таблица 2 - Интенсивность фотосинтеза и транспирации клевера ползучего при его выращивании с использованием криогеля

Сутки опыта	Образец	Интенсивность фотосинтеза, мкмоль $г^{-1}$ $с^{-1}$	Интенсивность транспирации, млмоль $г^{-1}$ $с^{-1}$	Эффективность использования воды, мкмоль CO_2/млмоль H_2O
30	Контроль	3.95±0.3	4.63±0.02	0.9±0.05
	Опыт	8.04±0.7	7.05±0.04	1.14±0.1
60	Контроль	3.43±1.1	7.08±0.03	0.5±0.12
	Опыт	12.89±1.2	7.11±0.05	1.8±1.3

Результаты полевых экспериментов показали, что семена посаженных растений взошли в конце мая на 30-33 сутки. Всхожесть семян, средняя длина стебля в криоструктурированной почве на 13-21 %, 10-20 % соответственно превышает контрольные данные. Всхожесть семян кедра в криоструктурированной почве на 60 % превысила всхожесть семян в контроле. Максимальная численность микроорганизмов в 2,5-4 раза превышает контрольные данные (табл. 3).

Таблица 3 – Биометрические данные растений и численность микроорганизмов в криоструктурированной почве на территории Томской области

Наименование растения	Всхожесть семян, %	Средняя длина стебля, мм		Максимальная численность микроорганизмов, тыс. кл/г	
		контроль	опыт	контроль	опыт
Щучка дернистая	113±2	100±8	120±11	200±15	450±25
Тимофеевка степная	121±1	143±7	160±8	170±12	510±18
Копеечник альпийский	118±1	78±5	92±5	110±15	390±20
Эспарцет песчаный	115±2	89±6	100±10	130±25	550±32
Кедр сибирский	160±3	65±5	70±4	200±18	790±23

В почве с криогелем активность каталазы на протяжении всего эксперимента на 5-8 % превышала контрольные данные.

Анализ показал, что интенсивность фотосинтеза и транспирации в листьях копеечника альпийского, выращенного на опытном участке, в 2,5 и 1,4 раза соответственно выше контрольных данных. Эффективность использования воды у образца с криогелем была выше в 2 раза.

Таким образом показано, что криогель, меняя физические свойства почвы, оказывает положительное влияние на аборигенную почвенную микрофлору, каталазную активность почвы и выживаемость растений.

Экспериментально подтвержденным достоинством структурированной почвы является то, что посеянные в ней семена хорошо прорастают и формируют устойчивый растительный покров. Доказано, что растения, выращенные в почве с криогелем, обладают более высокой адаптивностью по сравнению с контролем.

Литература

1. Алтунина Л.К., Манжай В.Н., Фуфаева М.С. Механические и теплофизические свойства криогелей и пенокриогелей, полученных из водных растворов поливинилового спирта // Журнал прикладной химии. - 2006. - Т. 79., №10. - С. 1689–1692.

2. Алтунина Л.К., Кувшинов В.А., Долгих С.Н. Криогели для тампонажных работ в районах распространения многолетнемерзлых пород // Гидротехника. - 2010. - № 3. - С. 56–60.

3. Алтунина Л.К., Фуфаева М.С., Филатов Д.А., Сваровская Л.И., Жук Е.А., Бендер О.Г. Метод защиты почв от эрозии с применением криогелей и многолетних растений // Вестник ТГПУ. - 2012. - Т 122, № 7. - С. 177-183.

4. Алтунина Л.К., Манжай В.Н., Пельтек С.Е., Ганн-Эрдэн Т., Филатов Д.А., Фуфаева М.С. Применение криогелей для стабилизации почв при ветровой эрозии // Проблемы агрохимии и экологии. - 2012. - №3. - С.44-47.

5. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ. 1991. - 304 с.

Для заметок

Фотосинтез, дыхание и соотношение дыхательных путей в процессе деэтиоляции проростков пшеницы

Е.В. Гармаш, М.А. Шелякин, Р.В. Малышев, Т.К. Головко

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

Свет – это источник энергии и доминирующий сигнал для фотосинтезирующих организмов. До 30-50% генов, экспрессируемых в фотосинтезирующем листе, регулируется светом, влияя на активность метаболизма [1]. Проблема взаимодействия фотосинтеза и дыхания в фототрофных тканях на свету по-прежнему остается в центре внимания исследователей. Идеи о том, что на свету митохондрии участвуют в поддержании функциональной активности хлоропластов, получили экспериментальное подтверждение в ряде последних работ [2, 3, 4, 5]. Показано, что избыток экспортированных из хлоропластов восстановителей могут окисляться в дыхательной ЭТЦ благодаря активации нефосфорилирующих путей [3].

Нами исследована фотосинтетическая и дыхательная функции и оценена роль энергетически мало эффективного альтернативного пути дыхания (АП) у проростков яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L., var. Irgina) в процессе деэтиоляции на непрерывном свету в течение 48 ч. Зеленение как светоиндуцируемый процесс биогенеза пластид и формирования тилакоидной системы хлоропластов может служить удобной моделью для выяснения фундаментальных вопросов взаимодействия фотосинтеза и дыхания, оценки роли дыхания в этом процессе.

Семена проращивали в течение четырех суток в полной темноте, а на 5^{й} день этиолированные проростки переносили в условия непрерывного света (ФАР 190 мкмоль/м^{2}с). В течение 48 ч зеленения исследовали содержание и состав хлоропластных пигментов, дыхательную и фотосинтетическую активность. Для характеристики вовлечения АП использовали метод специфических ингибиторов. Функциональное состояние фотосинтетического аппарата оценивали по скорости CO_2-газообмена и показателям индуцированной флуоресценции хлорофилла.

Хотя процесс зеленения осуществлялся в относительно оптимальных условиях, можно полагать, что на начальном этапе деэтиоляции листья получали количество света, намного больше, чем требовалось для фотосинтетической фиксации CO_2. Оценка функциональности фотосинтетического аппарата показала, что первые 2 ч деэтиоляции характеризовались низкими величинами максимального (F_v/F_m) квантового выхода ФСII и фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (табл.). Значение F_v/F_m достигало типичной для функционально зрелого листа величины (0.8) после 24 ч зеленения, когда концентрация хлорофиллов составляла около 5 мг/г сухой массы.

В ходе формирования фотосинтетического аппарата наблюдали изменение дыхательной активности листьев. В первые 2 ч деэтиоляция дыхание, измеренное по скорости поглощения O_2 и выделения CO_2, несколько снизилось, что, по-видимому, было связано с замедлением метаболических процессов в связи с адаптацией к световым условиям (табл. 1, рис. 1). Следующий за этим подъем дыхательной активности и отрицательный баланс нетто-фотосинтеза свидетельствовали о превалировании в первые 6 ч зеленения процессов декарбоксилирования. Изменение активности дыхания было связано с индукцией альтернативного пути (АП). Доля АП возрастала от 10 до 50% от общего дыхания тканей листа и была наиболее высокой в период от 4 до 6 часов (рис. 1).

Таблица 1 – Параметры индуцированной флуоресценции хлорофилла (F_v/F_m, qP, qN), скорость видимого фотосинтеза (Фв), темнового дыхания (Дт) и активность перекисного окисления липидов (ПОЛ, ТБК-РП, нмоль/г) в листе проростков пшеницы в процессе их деэтиоляции. Прочерк обозначает отсутствие данных

Деэтиоляция, ч	F_v/F_m	qP	qN	Ф	$Д_т$	ПОЛ
				мг CO_2/(г ч)		
0	-	-	-	-	3.7 ± 0.2	136 ± 7
2	0.48 ± 0.02	0.86 ± 0.01	0.38 ± 0.03	-2.1 ± 1.1	3.5 ± 0.4	182 ± 8
4	0.64 ± 0.02	0.90 ± 0.01	0.50 ± 0.04	-1.4 ± 0.6	4.0 ± 0.3	180 ± 9
6	0.69 ± 0.01	0.94 ± 0.01	0.56 ± 0.01	-0.3 ± 0.7	4.4 ± 0.3	260 ± 20
12	0.74 ± 0.01	0.93±0.02	0.59 ± 0.01	4.0 ± 0.3	2.3 ± 0.3	260 ± 18
24	0.76 ± 0.01	0.96±0.01	0.4 ± 0.03	3.2 ± 0.4	2.7 ± 0.3	196 ± 16
48	0.80 ± 0.01	0.94±0.03	0.45 ± 0.04	4.9 ± 0.4	3.2 ± 0.2	210 ± 13

Чтобы более полно выявить возможные причины индукции АП светом в зеленеющем листе, мы проанализировали зависимость активности АП от уровня окислительного стресса и содержания углеводов. Нами показано, что корреляция между активностью АП и уровнем перекисного окисления липидов (ПОЛ) была слабой ($y = 3.7x - 10.5$, $R^2=0.34$). Следовательно, функция АП не сводится к предотвращению избыточного накопления АФК, что согласуется с мнением других авторов [6]. Данные таблицы показывают, что уровень ПОЛ и нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла в процессе деэтиоляции первого листа

проростков пшеницы изменялись синхронно. Это указывает на эффективность фотопротекторных механизмов, препятствующих избыточному образованию АФК в хлоропластах.

Анализ связи дыхания с углеводным статусом листа показал, что скорость цитохромного дыхания прямо зависела от содержания углеводов и скорости роста (y=0.05x+129, R^2= 0.7; y=585x+141, R^2=0.7 соответственно). Это позволяет заключить, что во время зеленения субстратная регуляция активности ЦП опосредована процессами роста и находится под жестким дыхательным контролем. Активность АП в процессе деэтиоляции изменялась независимо от содержания растворимых углеводов. Это указывает на существование, помимо субстратной регуляции, других более сложных механизмов вовлечения АП. Усиление активности АП при деэтиоляции, по-видимому, было связано с окислением восстановительных эквивалентов, поступающих из хлоропластов в митохондрии посредством челноков [2].

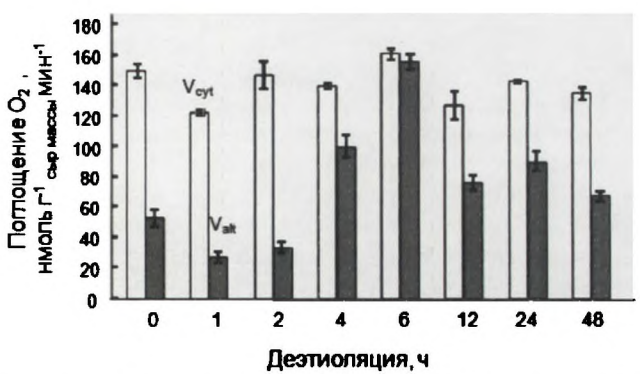


Рисунок 1 – Активность цитохромного (Vcyt) и альтернативного пути дыхания (Valt) в листе проростков пшеницы в процессе их деэтиоляции

Таким образом, получены новые данные о регуляции светом активности электрон-транспортных митохондриальных путей в процессе деэтиоляции листа пшеницы. Максимальные значения скорости дыхания зарегистрированы после 6 ч экспозиции проростков к свету. Изменение дыхательной активности сопровождалось индукцией АП, доля которого возрастала до 40-50%. Результаты свидетельствуют об участии АП дыхания в поддержании гомеостаза фотосинтезирующей клетки в период становления фотосинтетической функции.

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

Литература

1. Rasmusson A. G. Escobar M. A. Light and diurnal regulation of plant respiratory gene expression // Physiologia Plantarum. - 2007. - V. 129. - P. 57–67.

2. Raghavendra A. S., Padmasree K. Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation // Trends Plant Sci. - 2003. - V. 8. - P. 546 – 553.

3. Noguchi K., Yoshida K. Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves // Mitochondrion. - 2008. - V. 8. - P. 87 – 99.

4. Dinakar C., Agepati S., Raghavendra A.S. Padmasree K. Importance of AOX pathway in optimizing photosynthesis under high light stress: role of pyruvate and malate in activating AOX // Physiologia Plantarum. - 2010. - V. 139. - P. 13 – 26.

5. Garmash E. V., Dymova O. V., Malyshev R. V., Grabelnykh O. A., Borovik O. A., Plyusnina S. V., Kokovkina E. V., Voinikov V. K., Golovko T. K. Light regulation of mitochondrial and chloroplast energy-dissipating systems activity during wheat seedlings deetiolation // Abstracts of the 3rd International Symposium: Inracellular Signalling and Bioactive Molecules Design (L'viv, Ukraine, 17-23 September 2012). - P.48.

6. Umbach A. L, Fiorani F, Siedow J. N. Characterization of transformed Arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue // Plant Physiol. - 2005. - V.139. - P. 1806–1820.

Для заметок

Подбор условий культивирования и клеточная селекция каллусов клевера ползучего на устойчивость к высоким дозам меди

А.А. Ермошин, М.Н. Цибизова, И.С. Киселёва

Уральский федеральный университет, г. Екатеринбург

Активная антропогенная деятельность человека приводит к изменению окружающей среды, в том числе загрязнению её тяжелыми металлами. Поэтому все более актуальной задачей становиться создание линий растений, устойчивых к повышенным дозам металлов в окружающей среде.

По способности накапливать металлы растения можно разделить на аккумуляторы, индикаторы и исключители. Первые, накапливая в своих тканях металлов больше, чем в окружающей среде, могут быть использованы для целей фиторемедиации и рекультивации нарушенных земель. Последние накапливают меньше поллютантов, чем в среде, поэтому могут использоваться для получение экологически чистого сельскохозяйственного сырья на загрязненных территориях. Выращивание таких растений на техногенно нарушенных землях поможет вернуть их в хозяйственный оборот.

Классическая селекция требует длительного времени и больших посевных площадей, на которых необходимо создавать искусственный загрязненный фон. Всех этих недостатков лишена клеточная селекция.

В нашей работе мы проводили клеточную селекцию растений клевера ползучего на устойчивость к ионам меди.

Данное растение было выбрано потому, что это оно – космополит, имеет широкий ареал и произрастает в различного типа ценозах. Вид широко используется как кормовое и медоносное растение, седератное удобрение, может быть использовано как газонное растение. Кроме того, в ряде стран его молодые побеги используются в пищу человеком.

Медь как стрессор была выбрана в связи с тем, что это один из самых токсичных элементов для растений, при этом она крайне широко используется в производстве всех видов техники и оборудования. Кроме того, Средний Урал является геохимической провинцией с повышенным содержанием меди в грунтах, поэтому получение растений, устойчивых к избытку меди является крайне актуальной задачей этого региона.

На первом этапе работы необходимо было подобрать условия для получения каллуса клевера ползучего. В литературе мы не нашли протокола для клевера ползучего, а в качестве основы для среды культивирования использовали протокол для близкого вида – клевера лугового [1].

Для культивирования *in vitro* были испытаны две смеси фитогормонов, которые дали хорошие результаты с клевером луговым (Табл.1) [1]. Для бобовых рекомендуют использовать среду Гамборга (Б-5) [2], но как показали наши исследования наилучшие результаты дает использование среды МС с 3 % сахарозы.

Таблица 1 - Комбинации фитогормонов, использованные в работе

Шифр	Состав фитогормонов, мг/л	Частота образования каллуса клевера лугового, %
К3	2,4-Д – 2 НУК – 0,5 Кинетин – 2	95,6 – 99.2
К8	НУК – 1 БАП – 1	70,9 – 83,4

Как видно из таблицы, наилучшие результаты показала среда К3, содержащая большее количество ауксинов, цитокинин с меньшей физиологической активностью и мощный дедифференцирующий фактор. Данная среда была использована в дальнейшей работе.

Каллусы культивировали в факторостате при температуре 26°С и 16 часовом фотопериоде. Для получения каллуса использовали черешки асептических растений клевера, культивируемых *in vitro*. Схема опыта была следующей: первый пассаж – индукция каллуса, второй пассаж – субкультивирование каллуса на среде того же состава, что и в первом пассаже, без добавления стрессора. На данном этапе происходил отбор активно растущих каллусов, имеющих множественные меристематические очаги ярко-зеленого цвета. Третий пассаж – каллусы делили на равные части, каждому присваивали индивидуальный шифр. Части каллуса переносили на среду с добавлением токсиканта – 100; 200 и 300 мкМ сульфата меди. Концентрация в 100 мкМ не оказывала заметного влияния на скорость роста и выживаемость каллусов, поэтому в дальнейших экспериментах ее не использовали. После субкультивирования на среде, содержащей 200 и 300 мкМ меди были отобраны устойчивые генотипы, которые продолжали рост на среде с поллютантом и имели заметные меристематичесие очаги. Отобранные генотипы, выращенные на концентрации 300 мкМ $CuSO_4$, использовали для дальнейших исследований.

Полученные клеточные линии после пассажа на сульфате меди переносили на две среды: для каллусогенеза (для дальнейшего отбора мутантных клеточных линий) и для регенерации [1] (для проверки морфогенных свойств каллуса и получения толерантных к металлу клеточных линий). В среду для каллусогенеза и регенерации вносили по 400 мкМ

сульфата меди. Эта концентрация в два раза превышает концентрацию ионов меди, которая вызывала двух-кратное уменьшение длины корешка и всхожести семян клевера дикого типа, достоверное уменьшение длины гипокотиля на 30-40%, уменьшение содержания хлорофиллов в проростках.

Таким образом, нами были подобраны условия для каллусогенеза клевера ползучего, получены активно растущие каллусные культуры, на основе которых были получены клеточные линии, устойчивые к действию 300 мкМ меди. Данные линии используются для получения растений-регенерантов, устойчивых к 400 мкМ ионов меди, ведется генетический и цитологический анализ полученных клеточных культур.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14.A18.21.0203.

Литература

1. Куренина Л.В., Солодская Л.А., Лапотышкина Л.И. Разработка способа быстрой регенерации клевера лугового // Биотехнология. - 2001. - №6. - С. 19 – 24.

2. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений. Курс лекций. / М.: изд. РГАУ-МГСХА, 2009. - 93 с.

Для заметок

Различная регуляция выхода семян из физиологического покоя и начала прорастания

Н.В. Обручева

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

Выход семян из покоя - процесс, регулируемый гормонами и происходящий в результате снижения уровня АБК и синтеза гиббереллинов и сопровождаемый изменением соответствующих сигнальных систем. Он завершается синтезом белков, участвующих в разрыхлении клеточных оболочек. После этого начинается подготовка прорастания в результате повышения оводненности, приводящая к накоплению осмотиков, вакуолизации клеток зародышевой оси и повышении растяжимости оболочек, что происходит без участия гормонов.

Для заметок

Молекулярные механизмы гормональной регуляции биогенеза хлоропластов

В.В. Кузнецов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

Несмотря на важнейшую роль пластид в жизни растительной клетки, до настоящего времени механизмы регуляции их биогенеза изучены не достаточно. За последние два десятилетия, благодаря применению, главным образом, молекулярно-генетических методов анализа, достигнуты крупные успехи, с одной стороны, в исследовании механизмов действия фитогормонов, прежде всего, цитокининов, с другой - в изучении структуры и экспрессии пластидного и ядерного геномов. К настоящему времени открыты ферменты биосинтеза цитокининов, их мембранные рецепторы, транс-факторы и гены первичного ответа. На основании большого экспериментального материала установлены основные закономерности строения хлоропластных геномов, открыты пластидные РНК-полимеразы ядерного кодирования, получены новые результаты по регуляции экспрессии пластидных генов. Имеющиеся экспериментальные данные позволяют по-новому взглянуть на проблему биогенеза пластид. В докладе будут представлены основные результаты по структуре и регуляции экспрессии пластидного генома высших растений.

Для заметок

Физиолого-биохимические основы применения фиторегуляторов в технологии выращивания сельскохозяйственных растений

Е.С. Роньжина

Калининградский государственный технический университет, г. Калининград

В течение многих лет в Калининградском государственном техническом университете изучается возможность применения фиторегуляторов - структурных и физиологических аналогов растительных гормонов с целью повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Ведутся работы по изучению действия синтетических ауксинов, цитокининов, брассиностероидов, на комплекс физиолого-биохимических, анатомо-морфологических параметров, определяющих формирование урожая.

Показано, что эти соединения влияют на широкий спектр физиологических и биохимических процессов в растении, оказывают существенные положительные эффекты на все стороны продукционного процесса: посевные качества семян, рост, развитие, функционирование ассимиляционного аппарата и хозяйственно ценных органов, транспорт и распределение ассимилятов, отложение запасных питательных веществ, устойчивость к неблагоприятным факторам [1]. Однако технология повышения урожайности растений с помощью таких фиторегуляторов пока не разработана.

Поэтому целью настоящей работы являлась разработка рекомендаций по регламентам применения ряда фитопрепаратов в технологии выращивания важнейших сельскохозяйственных культур.

В качестве объектов исследований выбраны картофель *Solanum tuberosum* L., томаты *Lycopersicon esculentum* Mill., бобы *Vicia faba* L., кукуруза *Zea mays* L.

Картофель, томаты и кукурузу выращивали в условиях полевого мелкоделяночного опыта, бобы - в микрополевых опытах в условиях, близких к естественным, с соблюдением необходимых элементов технологии, без применения пестицидов.

У всех культур трижды в течение вегетации надземную часть в контроле опрыскивали водой, в опыте - 10^{-4} М водным раствором 6-бензиламинопурина (БАП) или 10^{-5} М водным раствором индолил-3-масляной кислоты (ИМК); количество обработок и наиболее эффективную концентрацию раствора препарата подбирали предварительно. Опыты проведены в течение трех вегетационных сезонов, повторность четырехкратная.

Посевные качества семян оценивали на семенах кукурузы *Zea mays* L., тыквы *Cucurbita pepo* L., пшеницы *Triticum aestivum* L., ячменя *Hordeum vulgare* L. со сниженной в результате длительного хранения всхожестью и энергией прорастания. В опыте семена в течение 24 ч выдерживали в 0,01% растворе препарата Эпин-Экстра («НЭСТ-М», Россия), (действующее вещество – эпибрассинолид), в контроле - в дистиллированной воде. Всхожесть и энергию прорастания семян определяли согласно ГОСТ 12038-84 [2].

Достоверность различий между вариантами оценивали по *t*-критерию Стьюдента при $P_{0.95}$; при необходимости проводили дисперсионный анализ.

Разработанные на основе проведенных опытов регламенты применения БАП и ИМК для повышения урожайности представлены в табл. 1, 2. Их соблюдение позволяет существенно повысить урожайность картофеля, томатов, бобов и кукурузы (табл. 3-6).

Таблица 1 - Рекомендации по регламентам применения БАП (10^{-4} М, водный раствор) для повышения продуктивности растений

Культура	Фенофаза	Норма расхода препарата, г/га		Расход рабочей жидкости, л/га	
		на одну обработку	за вегетаци-онный сезон	на одну обработку	за вегетаци-онный сезон
Картофель	Боковое ветвление	6.8	24.8	300	1100
	Конец бутонизации – начало цветения	9.0		400	
	Пожелтение нижних листьев	9.0		400	
Томаты	Боковое ветвление	6.8	24.8	300	1100
	Налив плодов	9.0		400	
	Молочная спелость плодов	9.0		400	
Бобы	Стеблевание	4.5	18.0	200	800
	Плодообразование	6.8		300	
	Зернообразование – зеленая спелость зерна	6.8		300	

Таблица 2 - Рекомендации по регламентам применения ИМК (10^{-5} М, водный раствор) и БАП (10^{-4} М, водный раствор) для повышения урожая зеленой массы кукурузы

Препарат	Фенофаза	Норма расхода препарата, г/га	Расход рабочего раствора, л/га
ИМК	Всходы (2-3 листа)	0,25	125
	Выбрасывание метелки	0,76	375
	Всего за вегетационный сезон	1,11	500
БАП	Всходы (2-3 листа)	2,82	125
	Выбрасывание метелки	8,45	375
	Всего за вегетационный сезон	11,37	500

Таблица 3 - Действие 10^{-4} М БАП на урожай картофеля и томатов

Картофель				Томаты			
урожай, кг/25 м^2			опыт,% от контроля	урожай, кг/20 м^2			опыт,% от контроля
вода (контроль)	БАП (опыт)	прибавка урожая		вода (контроль)	БАП (опыт)	прибавка урожая	
102 ± 9	132 ± 10	30	129	34 ± 2	53 ± 3	19	155

Таблица 4 - Действие БАП на сырую и сухую биомассу (г/растение) надземной части растений бобов в фазе молочной – начале восковой спелости

Вариант обработки	Сырая масса	Сухая масса
Сорт Херц Фрея		
Вода (контроль)	79.4±4.0	16.2±4.8
10^{-4} М БАП (опыт)	124.5±12.8	27.2±11.6
10^{-4} БАП, % от контроля	156.8	167.9
Сорт Русские черные		
Вода (контроль)	47.2±7.2	8.0±0.5
10^{-4} М БАП (опыт)	70.8±9.0	13.4±0.8
10^{-4} БАП, % от контроля	150.0	167.5

Данные по влиянию препарата Эпин-Экстра на посевные качества семян ряда важнейших сельскохозяйственных культур отражено в табл. 7. Они показывают, что существует возможность применения брассиностероидов для улучшения качества посевного материала, однако требуется тщательный предварительный подбор условий и изучение последствий такой обработки индивидуально для каждой конкретной сельскохозяйственной культуры.

Таблица 5 - Структура урожая бобов при действии 10^{-4} М БАП (опыт, % от контроля) (относительная ошибка составляет от 5.2 до 10.4%)

Сорт	Количество бобов на растении	Количество семян в бобе	Количество семян на растении	Масса створок одного боба	Масса семени	Масса створок бобов на растении	Масса семян на растении
Херц Фрея	100.0	166.7	73.9	300.0	430.0	97.5	167.1
Русские черные	93.8	100.0	56.8	135.8	156.9	108.3	161.9

Таблица 6 - Действие ИМК и БАП на сырую биомассу надземной части растений кукурузы в фазу молочно-восковой спелости

Вариант обработки		Первый год		Второй год		Третий год	
		кг/10 м^2	% от контроля	кг/10 м^2	% от контроля	кг/10м^2	% от контроля
Контроль (вода)		26	100	34	100	14	100
Опыт	ИМК, 10^{-5} М	28	108	37	109	15	107
	БАП, 10^{-4} М	29	112	38	112	16	114
$НСР_{0,5}$		2,0	-	2,0	-	2,4	-

Таблица 7 - Влияние препарата Эпин-Экстра (0,01% водный раствор, 24 ч) на всхожесть и энергию прорастания семян

Объект	Вариант опыта	Энергия прорастания		Всхожесть	
		%	% от контроля	%	% от контроля
Кукуруза	Вода (контроль)	10	100	14	100
	Эпин-Экстра (опыт)	45	450	58	414
Тыква	Вода (контроль)	85	100	100	100
	Эпин-Экстра (опыт)	90	106	100	100
Пшеница	Вода (контроль)	20	100	36	100
	Эпин-Экстра (опыт)	25	125	34	130
Ячмень	Вода (контроль)	18	100	23	100
	Эпин-Экстра (опыт)	26	144	32	139

В целом, проведенная работа указывает на то, что перспективным приемом повышения урожайности сельскохозяйственных культур является обработка регуляторами роста и развития растений – синтетическими аналогами природных фитогормонов.

Литература

1. Роньжина Е.С. Цитокинины в регуляции донорно-акцепторных связей у растений. – Калининград: КГТУ, 2005. - 266 с.
2. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. - М., 1986. – 60 с.

Для заметок

Регуляция транскрипции пластома *Arabidopsis* брассиностероидами

М.В. Ефимова[1], И.С. Ковтун[1], А.К. Кравцов[2], В.В. Кузнецов[2]

[1]Томский государственный университет, г. Томск
[2]Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

Известно, что некоторые фитогормоны в темноте могут инициировать развитие проростков с признаками светового развития. В 1991 году J. Chory с соавторами были получены мутантные растения *Arabidopsis thaliana* с нарушенным синтезом брассиностероидов (БС) [1]. В темноте проростки имели деэтиолированный фенотип, на свету его проявление усиливалось. Было выдвинуто предположение, что брассиностероиды – отрицательные регуляторы фотоморфогенеза. Дополнительным доводом в пользу этого высказывания выступает тот факт, что обработка проростков ингибитором синтеза брассиностероидов – брассиназолом в темноте также способствует формированию деэтиолированного фенотипа [2]. Вместе с тем, экспериментальные данные о вкладе брассиностероидов в регуляцию фотоморфогенеза растений весьма противоречивы. Так, некоторые исследователи установили, что брассиностероиды способны в темноте подавлять развитие гипокотилей и усиливать рост семядолей [3, 4]. С другой стороны, некоторые мутанты гороха с нарушенным биосинтезом брассиностероидов (*lka*, *lkb*) сохраняли этиолированный фенотип в темноте [5, 6]. Возможные объяснения этого противоречия и дальнейший прогресс исследований в этом направлении может быть связан с изучением экспрессии светорегулируемых фотосинтетических генов в растениях, различающихся по эндогенному уровню брассиностероидов.

Интенсивность транскрипции хлоропластных генов изучали в лизатах интактных хлоропластов розеточных листьев 3.5-недельных растений *A. thaliana* родительской линии экотипа Columbia (Col) и мутантной линии с нарушенным синтезом брассиностероидов *det2*, выросших в условиях фитотрона на белом свету (плотность потока падающих квантов составляла 220 мкмоль/м2с) при фотопериоде 16 ч/8 ч и температуре 20–22°С. Для изучения влияния экзогенных брассиностероидов розеточные листья *Arabidopsis* исходного фенотипа инкубировали на растворе 1 мкМ эпибрассинолида в течение 16 часов.

Выделение пластид и run-on транскрипцию в их лизатах проводили согласно методике, описанной ранее [7]. В ходе исследования была проанализирована транскрипция 12 хлоропластных генов ячменя высоко гомологичных генам Arabidopsis. Детальное описание генов и ген-специфичных фрагментов, использованных в качестве гибридизационных зондов, приведено в публикациях [8-10]. По 1 мкг каждого из фрагментов изучаемых генов наносили в двухкратной повторности на нейлоновую мембрану Hybond-N$^+$ (GE Healthcare, USA). После их гибридизации с ^{32}P-мечеными РНК, полученными в ходе транскрипции *in vitro*, радиоактивные сигналы были сканированы и оцифрованы, используя Phosphorimager Typhoon Trio (сканер Typhoon TRIO+ Variable Mode Imager с пакетом Typhoon Scaner Control) и ImagerQuant TL ControlCentre (GE Healthcare, USA). Каждый эксперимент проводили не менее трех раз. Результаты опытов представлены на рисунках как средние арифметические и их стандартные ошибки. Изменение интенсивности транскрипции считали достоверным, если интенсивность сигнала отличалась от контроля в два раза или более.

Сравнительный анализ интенсивности транскрипции хлоропластных генов показал, что снижение эндогенного уровня брассиностероидов в мутантной линии *det2* способствовало активации транскрипции изучаемых хлоропластных генов (рис. 1). Наибольшая активация (8–12 раз) отмечена для гена *ndhF*, кодирующего F субъединицу НАДН-пластохинооксидоредуктазы; *psbK*, кодирующего К-субъединицу (3.9 кДа) фотосистемы II и *atpB*, кодирующего в-субъединицу АТФ синтазы. Высокая активация интенсивности транскрипции (в 3–4 раза) показана для генов фотосистемы I (*psaA* и *psaB*) и II (*psbA*), гена большой субъединицы РБФК (*rbcL*), 23S-рибосомной РНК (*rrn23*), гены тРНК-Глу и тРНК-Тир (*trnE-Y*) и *rpoB* гена, кодирующего в-субъединицу РНК-полимеразы бактериального типа. В меньшей степени активировалась транскрипция *psbD* и ген 16S-рибосомной РНК (*rrn16*) генов, имевших наибольшую интенсивность транскрипции в контрольных растениях (рис. 1).

В свою очередь, экзогенный эпибрассинолид в высокой концентрации (1 мкМ) активировал транскрипцию некоторых хлоропластных генов *Arabidopsis*. Так, в хлоропластах розеточных листьев Arabidopsis, обработанных экзогенным эпибрассинолидом, наблюдалась незначительная активация транскрипции большинства (десяти) изучаемых генов, среди которых для пяти генов (*psaB*, *psbK*, *ndhF*, *rrn23* и *atpB)* были показаны достоверные различия (рис. 2). Для двух других генов – *psbD* и *rpoB* отмечена тенденция к снижению интенсивности транскрипции.

Представленные данные об активации транскрипции генов, необходимых для реализации фотосинтетической функции света, при низком эндогенном уровне брассиностероидов или при экзогенном воздействии эпибрассинолида свидетельствуют в пользу того, что брассиностероиды включаются в реализацию световой программы развития растений, регулируя интенсивность экспрессии пластидных генов.

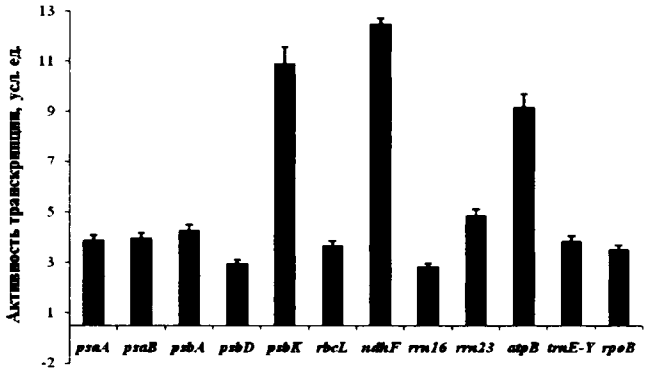


Рисунок 1 - Отношение интенсивности транскрипции пластидных генов в розеточных листьях 3.5-недельных растений *A. thaliana* мутантной линии *det2* к интенсивности транскрипции генов родительской линии Col

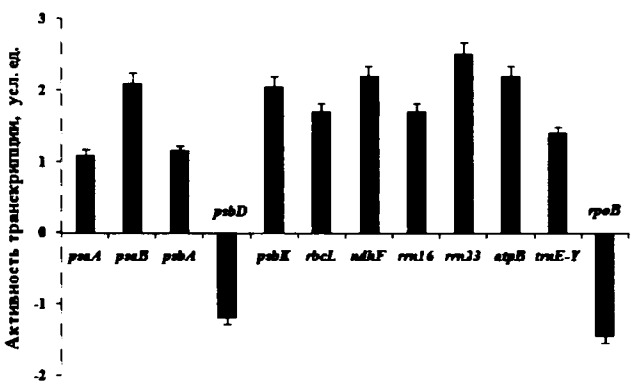


Рисунок 2 – Отношение интенсивности транскрипции пластидных генов листьев, обработанных эпибрассинолидом к интенсивности транскрипции генов, необработанных листьев *Arabidopsis* родительской линии Col

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке РФФИ (12-04-31500-мол_а, 12-04-90019-Бел_а).

Литература

1. Chory J., Nagpal P., Peto C.A. Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 1991. – V. 3: 445–459.

1. Nagata N., Min Y.K., Nakano T., Asami T., Yoshida S. Treatment of dark-grown Arabidopsis thaliana with a brassinosteroid-biosynthesis inhibitor, brassinazole, induces some characteristics of light-grown plants // Planta. -2000. – V.211. – P. 781–790.

3. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф., Ефимова М.В., Хрипач В.А. Действие 24-эпибрассинолида на морфогенез и соотношение гормонов у проростков *Arabidopsis* на зеленом свету // Физиология растений. – 2002. - Т.49. – С.591–595.

4. Ефимова М.В. Физиологическая роль брассиностероидов в развитии проростков *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh) на селективном свету // Вестн. Томского гос. ун-та. Биология. – 2010. - №4. – С. 106–116.

5. Symons G.M., Schultz L., Kerckhoffs L.H.J., Davies N.W., Gregory D., Reid J.B. Uncoupling brassinosteroid levels and de-etiolation in Pea// Physiol. Plant. – 2002. – V.115. – P. 311–319.

6. Symons G., Reid J. Hormone levels and response during de-etiolation in pea // Planta. – 2003. – V.216. – P. 422–431.

7. Зубо Я.О., Кузнецов В.В. Применение метода run-on транскрипции для изучения регуляции экспрессии пластидного генома // Физиология растений. – 2008. – Т.55. - С. 114–122.

8. Ефимова М.В., Кравцов А.К., Кузнецов В.В. Анализ транскрипции пластидных генов *Hordeum vulgare* в темноте // Вестн. Томского гос. ун-та. Биология. – 2012. - №2. – С. 166-170.

9. Ефимова М.В., Кузнецов В.В., Кравцов А.К., Барташевич Д.А. Карначук Р.А., Ковтун И.С., Кузнецов Вл.В. Особенности экспрессии пластидного генома и развития растений *Arabidopsis thaliana* с нарушенным синтезом брассиностероидов // Физиология растений. – 2012. Т.59. – С. 32-39.

10. Ефимова М.В., Кузнецов В.В., Кравцов А.К., Карначук Р.А., Хрипач В.А., Кузнецов Вл.В. Брассиностероиды регулируют транскрипцию пластидных генов у растений // Доклады РАН. - 2012. – Т.445. - С. 693–697.

Для заметок

Ацидофильные сульфатредуцирующие бактерии в местах обитания, связанных с добычей и переработкой металлов

А.Л. Герасимчук, О.В. Карначук

Томский государственный университет, г. Томск

Сульфатредуцирующие прокариоты (бактерии и археи) – это филогенетически и метаболически разнообразная группа микроорганизмов, которую объединяет способность использовать сульфат как конечный акцептор электрона в процессе анаэробного дыхания [1]. Большинство известных сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) имеют оптимум pH для роста около 7 и их рост ингибируется при значениях pH ниже 6 [2, 3].

В последние годы активность сульфатредукции сообщалась для природных или сконструированных экосистем с низкими значениями pH [4-6]. Показано, что сульфатредукция встречается также в растворах с pH 3 в биореакторах с использованием этанола, метанола или глицерола в качестве органического субстрата [6,7]. Некоторые СРБ были выделены из кислых шахтных высачиваний и озер, но они оказывались нейтрофильными и не были активны при pH ниже 5 [8-10]. Ситуация относительно существования ацидофильных СРБ до недавнего времени была не ясна. Чистые культуры, выделенные из смешанных культур, восстанавливающих сульфат при pH 3, были не способны восстанавливать сульфат при pH ниже 5.5 [9]. Гиур (Gyure) с соавт. (1990) [4] сообщали, что первоначальные сульфатвосстанавливающие накопительные культуры могут выдерживать pH 3.8, но чистые культуры, растущие при pH 3-5, не обнаружены. Поэтому было сделано предположение, что СРБ присутствуют в кислых местообитаниях, встречаясь в микросредах с более высокими значениями pH, таких как осадки или другие взвешенные частицы [4, 9]. Тем не менее, Сэн и Джонсон [11] сообщили о грам-положительных бактериях, родственных *Desulfosporosinus* и способных к росту при низких значениях pH. Также недавно появилась информация об одной выделенной СРБ, растущей при pH 3.0 [12]. Однако эти микроогранизмы до сих пор не охарактеризованы. Авторы объясняют причину успеха в получении ацидофильных СРБ использованием не кислых органических субстратов (глицерол, метанол) для накопительных культур. В 2010 году опубликована и впервые охарактеризована истинно ацидофильная СРБ *Desulfosporosinus acidiphilus*, выделенная из осадков проб, отобранных из кислых шахтных вод [13].

В полученных нами из загрязненных металлами кислых осадков накопительных культурах представители рода *Desulfosporosinus* были детектированы методами денатурирующего градиентного гель-электрофореза и молекулярного клонирования гена 16S рРНК. Выделенные из кислых шахтных высачиваний золоторудных месторождений Кузбасса культуры ацидофильных СРБ также относились к роду *Desulfosporosinus*. *Desulfosporosinus* sp. DB [14] и *Desulfosporosinus* sp. I2 демонстрировали активный рост при значениях pH от 1.5 до 3. Культура *Desulfosporosinus* sp. I2 характеризовалась облигатно ацидофильным ростом в диапазоне pH от 1 до 4.

Из изложенного выше следует, что СРБ, обнаруженные в кислых местообитаниях, в основном представлены спорообразующими организмами, относящимися к *Firmicutes*. Преимущества спорообразующих микроорганизмов очевидны в экосистемах с экстремально низким pH среды и высокой концентрацией ионов металлов.

О присутствии неспоровых дельтапротеобактриальных СРБ в КШВ известно мало. Клонирование генов 16S рРНК из богатых железом и мышьяком КШД обнаружило филотипы, ближайшими культивируемыми родственниками которых были СРП *Desulfobacterium indolicum* и *Desulfomonile tiedjei*, что по мнению авторов удивительно, так как исследованные КШВ содержали большое количество растворенного кислорода [15]. Также сообщается о микроорганизме из КШД в Бразилии, родственном *Desulfovibrio* на основе анализа гена *dsrB*, способном восстанавливать сульфат при pH 5.5, в процессе роста происходило изменение значения pH [16]. Есть сообщение об ацидофильном сообществе в осадках КШД с pH 2.5, изученном с помощью анализа библиотеки генов 16S рРНК, где преобладали последовательности 16S рРНК, относящиеся к *Deltaproteobacteria* [17]. Причем, по мнению авторов, наиболее вероятной физиологической характеристикой этого сообщества было восстановление сульфата и металлов.

Проведенный нами молекулярный анализ биоразнообразия в кислых шахтных высачиваниях золоторудных месторождений Кузбасса показал присутствие в них представителей класса *Deltaproteobacteria*, образующих вместе с несколькими клонами из кислых шахтных дренажей отдельную ветвь на филогенетическом дереве. Ближайшим культивируемым родственником оказалась галофильная СРБ *Desulfocella halophila* порядка *Desulfobacterales* с уровнем сходства не более 86%. Такой невысокий процент сходства с культивируемыми формами не позволяет достаточно подробно предсказать фенотип данных микроорганизмов, однако можно предположить их вовлеченность в цикл серы по аналогии с *Desulfobacterales*. Ранее неспоровые представители класса *Deltaproteobacteria* считались

обитателями экосистем с нейтральными или щелочными значениями pH, однако в последние годы появляется все больше сведений относительно их обитания в экосистемах с кислой средой, таких как КШД. Впервые дельтапротеобактриальных СРБ были обнаружены в системе КШД в Северной Калифорнии [18] и с тех пор обнаружены в нескольких подобных местообитаниях.

Анализ гена-маркера на процесс сульфатредукции *dsrAB* методом молекулярного клонирования показал присутствие представителей *Desulfosporosinus* непосредственно в пробе кислых осадков. Также были детектированы клоны, родственные последовательностям *dsrAB* некультивируемых микроорганизмов, полученным из хвостохранилищ отходов добычи урана, загрязненных мышьяком кислых шахтных вод и из кислых почвенных фенов. Обнаружение генов одного из ключевых ферментов, ответственных за сульфатредукцию, может свидетельствовать либо о присутствии неизвестных СРБ или организмов, для которых способность к диссимиляционному восстановлению сульфатов пока не описана, либо о наличии в пробе генов микроорганизмов цикла серы, вовлеченных в процесс сульфидогенеза и отличных от традиционных сульфатредукторов.

Несмотря на имеющиеся сведения о присутствии и активности СРБ в экосистемах с низкими значениями pH, необходимо дальнейшее изучение разнообразия восстанавливающих сульфаты микроорганизмов в таких экстремальных местообитаниях с целью поиска новых устойчивых форм и более глубокого понимания значения СРБ в природных экосистемах.

Литература

1. Rabus R., T. A. Hansen and F. Widdel. Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes // In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds). The Prokaryotes. 3rd ed. Springer, New York. – 2006. – V. 2. – P. 659-768.
2. Widdel F.Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur-reducing bacteria. Biology of Anaerobic тMicroorganisms. Zehnder AJB, ed. Wiley, – 1988. – P. 469-585.
3. Fauque G., Ollivier B. Anaerobes: the sulfate-reducing bacteria as an example of metabolic diversity. // *In*: Bull A.T. (ed). Microbial diversity and prospecting. ASM, Washington, – 2004. – P. 169-176.
4. Gyure R.A., Konopka A., Brooks A., Doemel W. Microbial sulphate reduction in acidic (pH 3) strip mine lakes. // FEMS Microbiol. Ecol. – 1990. – V. 73. – P. 193-202.
5. Kolmert A., Johnson D.B. Remediation of acidic waste waters using immobilised, acidophilic sulfate-reducing bacteria. // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 2001. – V. 76. – P. 836-843.
6. Koschorreck M., Wendt-Potthoff K., Geller W. Microbial sulfate reduction at low pH in sediments of an acidic lake in Argentina. // Environ. Sci. Technol. – 2003. – V. 37. – P.1159-1162.
7. Sierra-Alvarez R., Karri S., Freeman S., Field J. A. Biological treatment of heavy metals in acid mine drainage using sulfate reducing bioreactors. // Water Sci. Technol. – 2006. – V. 54 (2). – P. 179-185.
8. Kusel K.A., Roth U., Trinkwalter T., Peiffer S. Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments. // Environ. Exp. Bot. – 2001. – V. 46. – P. 213- 223.
9. Tuttle J.H., Dugan P.R., Macmilla C., Randles C.I. Microbial dissimilatory sulfur cycle in acid mine water. // J. Bacteriol. – 1969. – V. 97. – P. 594-602.
10. Lee Y.J., Romanek C.S., Wiegel J. *Desulfosporosinus youngiae* sp. nov., a spore forming, sulfate-reducing bacterium isolated from a constructed wetland treating acid mine drainage. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2009. – V. 59. – P. 2743-2746.
11. Sen A.M., Johnson B. Acidophilic sulphate-reducing bacteria: candidates for remediation of acid mining drainage. // *In:* Amils R. and Ballester A. (Eds). Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century. Process Metallurgy 9B. Elsevier, Amsterdam. – 1999. – P. 709-718.
12. Johnson D.B., Jameson E., Rowe O.F., Wakeman K. and Hallberg K.B. Sulfidogenesis at low pH by acidophilic bacteria and its potential for the selective recovery of transition metals from mine waters. // Adv. Mat. Res. – 2009. – V.73. – P. 693–696.
13. Alazard D., Joseph M., Battaglia-Brunet F., Cayol J.L. and Ollivier B. *Desulfosporosinus acidiphilus* sp. nov.: a moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments. // Extremophiles. – 2010. – V. 14. – P. 305-312.
14. Карначук О.В., А.Л. Герасимчук, Д. Бэнкс, Б. Френгстадт, Г.А. Стыкон, З.Л. Тихонова, А.Х. Каксонен, Я.А. Пухакка, А.С. Яненко, Н.В. Пименов Бактерии цикла серы в осадках хвостохранилища добычи золота в Кузбассе. // Микробиология. – 2009. – Т. 78. – № 4. – С. 483-491.
15. Bruneel O., R. Duran, C. Casiot, F. Elbaz-Poulichet, J.-C. Personne. Diversity of microorganisms in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoule`s, France. // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – V. 72. – № 1. – P. 551-556.

16. Rampinelli L. R., R. D. Azevedo, M. C. Teixeira, R. Guerra-Sá, V. A. Leão. A sulfate-reducing bacterium with unusual growing capacity in moderately acidic conditions. // Biodegradation. – 2008. – V. 19. – P. 613-619.
17. Hao C., Zhang H., Haas R., Bai Z. and Zhang B. A novel community of acidophiles in an acid mine drainage sediment // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 23. – P. 15-21.
18. Bond P.L., Smriga S.P. and Banfield J.F. Phylogeny of microorganisms populating a thick, Subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. // Appl. Environ. Microb. – 2000. – V. 66. – P. 3842-3849.

Для заметок

Взаимосвязь продуктивности *Lactuca sativa* L., активности гетеротрофных бактерий почвы и спектрального состава света

Н.Л. Пермякова, Ю.С. Белянцева, М.А. Юрьева, А.Г. Ивлева, И.Б. Минич, А.С. Минич

Томский государственный педагогический университет, г. Томск

В защищенном грунте для изменения спектрального состава солнечная энергия применяют флуоресцентные пленки, которые за счет поглощения части УФ-А радиации люминесцирует в видимой узкой области спектра [1]. Их использование на практике приводит к повышению продуктивности растений [2]. Продуктивность растений связана с почвенным плодородием, в создании которого значительную роль выполняют фермент каталаза и гетеротрофные микроорганизмы, участвующие в процессах разложения органических соединений. Однако связь между увеличением продуктивности растений в защищенном грунте под флуоресцентными пленками, изменяющими спектральный состав света, и деятельностью микроорганизмов почвы ранее не была установлена.

Цель работы

Установить взаимосвязь влияния красного излучения низкой интенсивности, генерируемого флуоресцентными пленками, на морфогенез, накопление фотосинтетических пигментов (ФСП), синтез аскорбиновой кислоты (АК), уровень эндогенных фитогормонов *Lactuca sativa* L. и активность микроорганизмов почвы.

Материалы и методы исследований

Трехлетние испытания проведены на агробиостанции ТГПУ путем определения микробиологической активности почвы, морфометрических и биохимических показателей *L. sativa* сорта Московский парниковый. Семена растений высевали в грунт и выращивали в течение 40 суток под полиэтиленовыми пленками: немодифицированной (контроль) и флуоресцентными (ФЕ), различающимися интенсивностью люминесценции в красной области спектра с максимумом 615 нм. Площадь поверхности листьев салата высчитывали бумажно-весовым методом. Выделение и определение содержания АК проводили по методике [3]. Выделение и количественное определение эндогенных ИУК и АБК проводили по методикам, представленным в [4]. Численность гетеротрофных бактерий почвы определяли при выращивании на мясопептонном агаре, активность каталазы – газометрическим методом [5].

Измерения морфометрических параметров и биохимические исследования были выполнены на 30 растениях в 3-х повторностях. Для статистической обработки экспериментальных результатов использовали программу «Excel». Оценку достоверности результатов исследований проводили при 95 %-ом уровне.

Результаты исследований и обсуждение

Результаты исследований показали различные ростовые ответы растений в зависимости от применяемой пленки. В опыте отметили торможение роста гипокотиля *L. sativa* по сравнению с контролем, к 9-ти суткам длина гипокотиля у опытных растений была меньше контрольных в 2,3 раза. В дальнейшем наблюдали более активное развитие растений в опыте по сравнению с контролем, сопровождавшееся более быстрым формированием листовых пластинок. В возрасте 19 суток у опытных растений относительно контроля установили достоверное увеличение числа, высоты розетки и площади поверхности листьев (рис. 1-2).

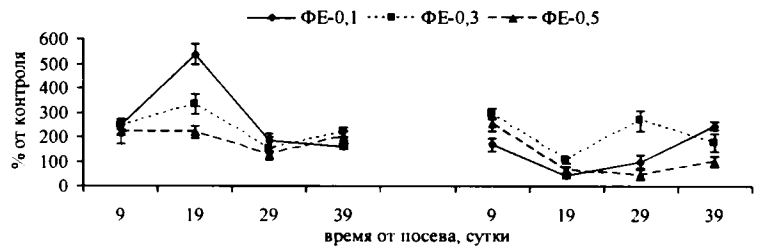


Рисунок 1 – Динамика площади поверхности листьев *Lactuca sativa* L. (слева) и содержания в листьях АК (справа) под флуоресцентными и немодифицированной пленками

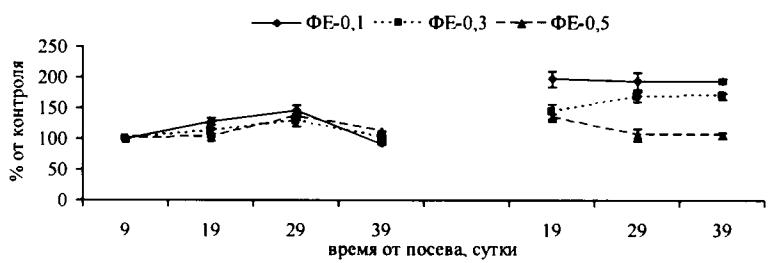


Рисунок 2 – Динамика числа листьев (слева) и высоты розетки листьев (справа) *Lactuca sativa* L. под флуоресцентными и немодифицированной пленками

Динамика сырой массы и массы сухого вещества растений сопряжены с изменениями габитуса (рис. 3). Динамика сырой массы растений коррелировала с увеличением площади листовых пластинок (r=0,99), а динамика сухой массы растений – числа листьев (r=0,87). Изменение продуктивности *L. sativa* в контроле и опыте сопряжены с динамикой содержания АК в листьях растений и ростовых веществ (рис. 1). Минимальное содержание АК в опыте относительно контроля отметили в момент максимального различия их продуктивности (на 19-20-е сутки).

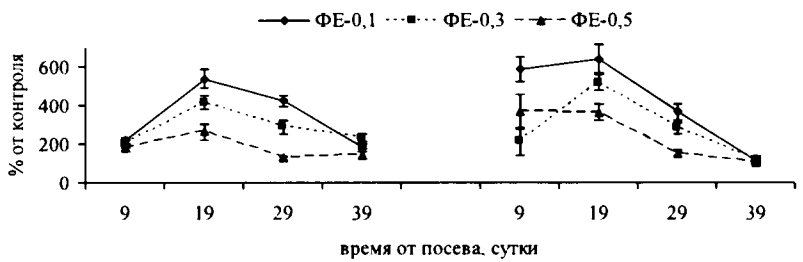


Рисунок 3 – Динамика сырой (слева) и сухой (справа) массы *Lactuca sativa* L. под флуоресцентными и немодифицированной пленками

Можно полагать, что уровень ИУК и АБК, вовлеченных в систему трансдукции светового сигнала, зависит от люминесцентного излучения флуоресцентных пленок и изменяет работу регуляторной системы салата. Увеличение продуктивности *L. sativa* в опыте сопряжены с изменением почвенной микрофлоры (рис. 4). В почве под флуоресцентными пленками на протяжении всего опыта установили увеличение активности каталазы и повышенную численность изучаемых микроорганизмов в относительно контроля. Оба показателя контрольных и опытных образцов почвы характеризуются двумя пиками подъема на 9-13-е и 21-е сутки.

У опытных растений на 9-19-е сутки вегетации отметили повышенный уровень ИУК и минимальное содержание АБК (табл. 1). В дальнейшем уменьшение содержания ИУК было связано с ее расходованием на образование репродуктивных органов, а меньшие размеры контрольных растений были опосредованы более высоким содержанием в них АБК.

Влияние солнечного света на микробиологические параметры почвы, сопряженные с ней рост и развитие корней растений, и их продуктивность в целом, определяются специфическим для флуоресцентных пленок свойством – люминесцентным излучением (рис. 5).

Таблица 1 – Содержание эндогенных ИУК и АБК в *Lactuca sativa* L. под немодифицированной (контроль) и флуоресцентными пленками с различной интенсивностью люминесцентного излучения с максимумом 615 нм

Возраст растений, сутки	Содержание эндогенных гормонов, нг/растение							
	Свободная ИУК				Свободная АБК			
	контроль	ФЕ-0,1	ФЕ-0,3	ФЕ-0,5	контроль	ФЕ-0,1	ФЕ-0,3	ФЕ-0,5
9	следы	2.93±0.29	2.34±0.59	0.26±0.35	0.88±0.35	0.44±0.02	следы	следы
19	0.19±0.01	0.47±0.09	1.06±0.01	1.17±0.16	0.26±0.05	0.18±0.03	следы	следы
29	0.47±0.08	следы	следы	следы	0.84±0.20	0.62±0.15	0.35±0.03	0.26±0.07
39	следы	1.17±0.29	0.15±0.02	0.29±0.02	6.17±0.93	0.31±0.07	0.75±0.16	0.09±0.01

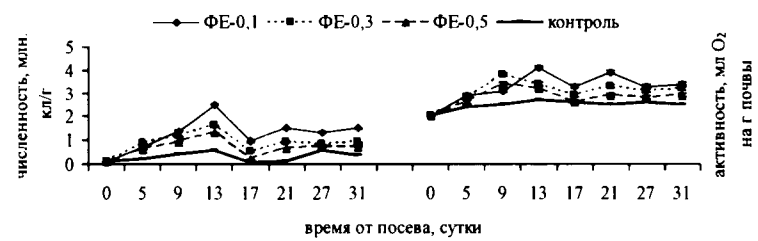


Рисунок 4 – Динамика численности гетеротрофных бактерий (справа) и активности каталазы (слева) в почве под флуоресцентными и немодифицированной (контроль) пленками

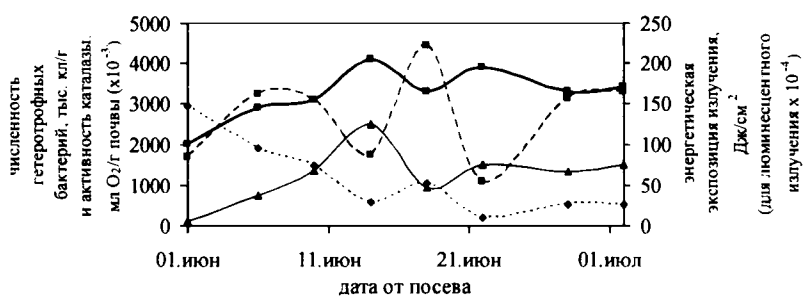


Рисунок 5 – Динамика (——■——) активности каталазы и (——•——) численности гетеротрофных бактерий в почве, (– –■– –) УФ излучения Солнца и (···•···) люминесцентного излучения флуоресцентной пленки ФЕ-0,1 при выращивании *Lactuca sativa* L.

Заключение

Применение на практике флуоресцентных пленок способствует повышению продуктивности *L. sativa*. Это происходит за счет влияния люминесцентного излучения флуоресцентных пленок на уменьшение содержания АК, увеличение соотношения ИУК / АБК в растениях, и сопряжено с изменением ферментативной активности аборигенной почвенной микрофлоры.

Литература

1. Brown R.P. Polymers in agriculture and horticulture // Rapra Review Reports. – 2004. – Vol. 15, № 2. – P. 1–92.
2. Райда В.С., Толстиков Г.А. Проблемы и перспективы использования и применения фотолюминесцентных полимерных пленок // Мир теплиц. – 2001. – № 7. – С. 62–64.
3. Ермаков А.И., Арасимович А.И. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.
4. Головацкая И.Ф., Карначук Р.А. Свет и растение. – Томск: Изд-во ТГУ, 1999. – 100 с.
5. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 231 с.

Для заметок

Семенное размножение *in vitro* видов рода *Cattleya* Lindl., интродуцированных в Сибирском ботаническом саду ТГУ

Г.Я. Степанюк, Л.В. Хоцкова

Сибирский ботанический сад Томского государственного университета, г. Томск

Сохранение биологического разнообразия растений мировой флоры является актуальной задачей ботанических садов на современном этапе. Интродукция растений позволяет проводить всестороннее изучение биологии роста и развития растений, разрабатывать способы ускоренного воспроизводства для видов, естественное возобновление которых в природе ослаблено или затруднено. К таким видам относятся представители семейства *Orchidaceae* Juss. тропических и субтропических широт. Семейство *Orchidaceae* в коллекционных фондах тропических и субтропических растений Сибирского ботанического сада ТГУ (СибБС ТГУ) представлено 93 видами и 86 гибридами, относящимися к 43 родам. Это представители Юго-восточной Азии, Австралии, Африки и Южной Америки. Самой многочисленной группой в оранжереях СибБС ТГУ являются выходцы из Южной Америки. Они составляют 45% от коллекционных фондов орхидей СибБС. Это виды родов *Brassavola* R.Br., *Cattleya* Lindl., *Epidendrum* L., *Laelia* Lindl., *Lycaste* Lindl., *Miltoniopsis* God.-Leb., *Odontoglossum* Kunth., *Oncidium* Sw., *Masdevallia* Ruiz & Pavon, *Maxillaria* Ruiz & Pavon, *Phragmipedium* Rolfe, *Stanhopea* J. Frost ex Hook., *Zygopetalum* Hook. и другие. Содержание тропических и субтропических орхидей в искусственных условиях и применение методики экспериментального опыления дают возможность нивелировать целый ряд факторов, лимитирующих эффективность репродукции растений в природе, прежде всего таких, как наличие опылителей и дефицит ресурсов [1, 2]. При этом становится возможным контролировать уровни абиотических факторов (влажность, температуру), в значительной степени влияющих на репродуктивный успех даже после эффективного опыления.

Род *Cattleya* Lindl. в оранжереях СибБС представлен пятью видами (*C. intermedia* Grah., *C. bowringiana* Veitch, *C. loddigesii* Lindl., *C. mossiae* Hook. и *C. hybrida*) и 9 сложными гибридами, такими как *Laeliocattleya*, *Rhincholaeliocattleya*, *Brassolaeliocattleya*. Наше внимание привлекли два вида орхидей: *C. intermedia* Grah. var. *alba* и *C. hybrida*. *Cattleya intermedia* Grah. var. *alba* – каттлея средняя форма белая. В оранжереях сада данный вид выращивается с 1997 года. Это симподиально растущая двулистная орхидея родом из Южной Бразилии. Удлиненные псевдобульбы достигают высоты 20 см и несут два крупных листа. В оранжереях сада данный вид цветет в октябре. На цветоносах развивается обычно от 2 до 5 изящных восковидных цветков молочно-белого цвета, диаметр цветка составляет в среднем 14 см. Продолжительность цветения одного цветоноса составляет от 23 до 35 дней. *Cattleya hybrida* – каттлея гибридная. В оранжереях сада выращивается с 1986 года. Это симподиальная двулистная орхидея. Удлиненные псевдобульбы до 18 см длиной несут по два крупных листа длиной 16 см. В оранжереях сада данный вид цветет в декабре – январе. На цветоносе развивается обычно 2 – 3 цветка бордово-красного цвета Продолжительность цветения одного цветоноса колеблется от 22 до 30 дней. Диаметр цветка равняется 6-8 см.

С целью массового размножения этих орхидей проводили искусственное опыление их цветков и наблюдения за ростом и развитием их плодов. После стерилизации плоды вскрывали, и семена помещали на агаризованную питательную среду Кнудсона [3] с добавлением гумата натрия и активированного угля. Прорастание семян у обоих видов происходило на 41 день после посева. Прорастание семян на питательной среде сопровождалось ростом апикальной зоны зародыша и значительными изменениями базальной зоны, что приводило к образованию протокорма – своеобразной формы послесеменного развития спорофита. Визуально это выглядело как позеленение семян. В это время проводили пересадку протокормов на новые питательные среды, а именно на среду Мурасиге-Скуга [4] с полным составом минеральных солей. В последующие 8 недель происходило активное образование и деление протокормов. Начало образования меристематических центров, из которых в последующем будет развиваться апекс побега [5], приходился на 6-ю неделю после образования протокорма. В следующей стадии формировался побег, дифференцировались листья. На четвертой стадии у основания стебля, состоящего из 2–3 листочков, образовался корешок. Образование первичных корешков мы наблюдали на 150–170 день после посева. Внешне начало роста корня напоминает образование меристематического бугорка. Затем он растет в направлении питательной среды. Сначала развивается воздушный корень, достигая среды, он растет вглубь. Иногда корни не погружаются вглубь питательной среды и располагаются на ее поверхности. После образования корня снова наблюдается рост листьев, начинается образование побегов II порядка. Через 270 дней сформированные молодые растеньица каттлей, имеющие по 3–5 развитых листьев и корней, высаживали в промежуточный субстрат для адаптации в нестерильных условиях. Период адаптации проходил в тепличных условиях при температуре +19...+22°С, относительной влажности воздуха 80–85% и естественном освещении 5 клк.

Корневые и внекорневые подкормки раствором макро- и микросолей по прописи Мурасиге-Скуга [4] производили регулярно – 1 раз в 14 дней. Было установлено, что в условиях СибБС ТГУ проростки каттлей лучше приживаются в промежуточном субстрате, если дочерние побеги (второго и далее порядков) не отделять от материнского побега (первого порядка) и выращивать их «семейками». Приживаемость сеянцев *C. intermedia* в промежуточном субстрате составляла 62%. Через 9 месяцев после пересадки в промежуточный субстрат, адаптированные сеянцы *C. intermedia* пересаживали в постоянные субстраты двух составов: 1) кора–торф–мох–уголь в соотношении 1:2/3:2/3:1/2 (Вар.1) и 2) кора–мох–уголь в соотношении 3:1:1 (Вар.2). Целью данного эксперимента стало выявление состава субстрата, оптимального для роста и развития молодых сеянцев каттлей. Через 10 месяцев эксперимента нами было установлено, что сеянцы *C. intermedia*, растущие на субстрате 1-го состава обгоняли в росте листьев и побегов растения второго субстрата. Наряду с изменениями интенсивности роста листьев и побегов каттлей на разных субстратах, проводились измерения и массы всего растения. Установлено, что растения, растущие на первом типе субстрата, характеризуются более интенсивным увеличением массы, по сравнению с растениями, растущими на втором типе субстрата (рис. 1). Впоследствии первый состав постоянного субстрата был выбран в качестве основного для выращивания видов рода *Cattleya*, интродуцированных в СибБС ТГУ.

Сеянцы *C. hybrida,* адаптированные в промежуточном субстрате (приживаемость составила 65%) к нестерильным условиям, были высажены в постоянный субстрат 1-го состава. Целью нового эксперимента стало определение влияния минерального и органического питания на рост и развитие сеянцев каттлеи и поиск взаимозаменяющих удобрений, оптимальных для выращивания этой культуры. Испытывалось три варианта удобрений: 1) раствор минеральных солей по прописи Мурасиге-Скуга [4] (он же «контроль»); 2) биогумус «Идеал» (Россия) (2 мл концентрата/ 1л дистиллированной воды); 3) специализированное удобрение для орхидей «Bona Forte» (Россия) (5 мл концентрата/ 1,5л дистиллированной воды). Корневые подкормки исследуемыми растворами (в дозировке 30 – 40 мл на одно растение) проводили регулярно – 1 раз в 14 дней. Подкормки производились на второй день после полива, в первой половине дня. Результаты эксперимента показаны на рисунках 2 – 4.

Исходя из полученных данных, на протяжении периода исследования нами было выяснено, что наиболее благоприятное воздействие на динамику роста и развития сеянцев *C. hybrida* по числу листьев и побегов по сравнению с другими видами обработок произвел раствор макро- и микроэлементов по прописи Мурасиге-Скуга. Вторым по эффективности стало специализированное удобрение для орхидей «Bona Forte». Уменьшение длины побега с февраля по май, по-видимому, связано с образованием новых дочерних побегов, которые по мере роста сначала снижают средние биометрические показатели, а затем вносят существенный вклад в интенсивность роста и развития всей побеговой системы растений каттлей.

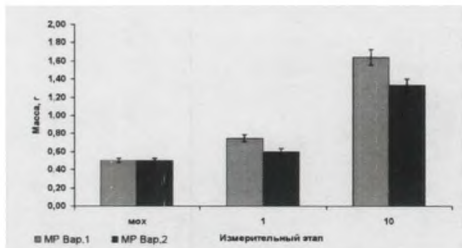


Рисунок 1 - Влияние субстратов на массу растений (МР) *Cattleya intermedia* var. alba, выращиваемых в СибБС ТГУ

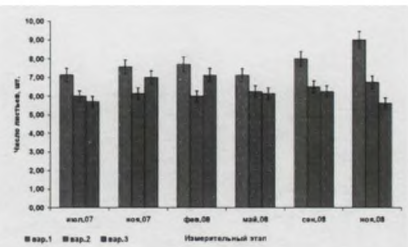


Рисунок 2 - Влияние подкормок на число листьев растений *Cattleya hybrida*, выращиваемых в СибБС ТГУ

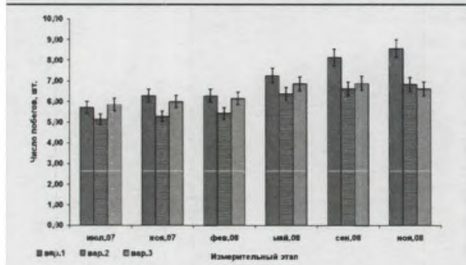


Рисунок 3 - Влияние подкормок на число побегов растений *Cattleya hybrida*, выращиваемых в СибБС ТГУ

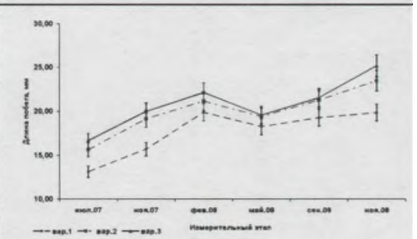


Рисунок 4 - Влияние подкормок на длину побегов растений *Cattleya hybrida*, выращиваемых в СибБС ТГУ

На основании проведенных исследований можно сделать следующее заключение. При выращивании в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ *Cattleya intermedia* var. *alba* и *Cattleya hybrida* проходят полный цикл развития. Показано, что прорастание семян исследуемых видов *in vitro* происходит на 41 день после посева семян на

питательные среды. Изучены этапы развития каттлей на питательных средах *in vitro*. Установлено, что сеянцы каттлей готовы к высадке в промежуточный субстрат через 270 дней после посева семян. Установлен оптимальный состав постоянного субстрата для роста и развития молодых растеньиц *C. intermedia* var. *alba* – это смесь сосновой коры, верхового торфа, мха-сфагнума и древесного угля в соотношении 1:2/3:2/3:1/2. Установлено, что раствор минеральных солей по прописи Мурасиге-Скуга, а также удобрение для орхидей «Bona Forte» (5 мл концентрата/ 1,5л воды) являются лучшими подкормками для сеянцев *Cattleya hybrida,* выращиваемых в постоянном субстрате.

Литература

1. Melendez-Ackerman, E.J., Ackerman, J.D., Rodriquez-Robles, J.A. Reproduction in an orchid can be resource limited over its lifetime [Text] // Biotropica. – 2000. – Vol. 32. – P. 282–290.

2. Neiland, M.R., Wilcock, C.C. Fruit-set, nectar reward and rarity in the *Orchidaceae* [Text] // Amer. J. Bot. – 1998. – Vol. 85, N. 12. – P. 1657–1671.

Knudson, L. Non symbiotic germination of orchid seeds [Text] // Botanical gazette. - 1922. - P. 73.

3. Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [Text] // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.

4. Батыгина, Т.Б., Васильева, В.Е. Система воспроизведения у орхидных [Текст] // Всесоюзный симпозиум «Охрана и культивирование орхидей»: тезисы докладов. – Таллин, 1980. – С. 107–110.

Для заметок

Оценка целесообразности и эффективности применения микробиологических препаратов для биоремедиации нефтезагрязненных почв на основе отечественного и зарубежного опыта

Терещенко Н.Н.[1], Лушников С.В.[2]

[1] Томский государственный университет, г. Томск
[2] ООО "НТО «Приборсервис», г. Томск

Биологический метод подавляющим большинством исследователей признается в качестве наиболее перспективного направления восстановления нефтезагрязненных экосистем. Высокая эффективность биоремедиация основана на использовании биохимического потенциала углеводородокисляющих микроорганизмов, обеспечивающих ускоренное разложение нефти и нефтепродуктов без причинения дополнительного ущерба экосистеме [1].

Все используемые в настоящее время способы биоремедиации условно могут быть разделены на биостимуляцию за счет активации аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры и биоаугментацию, основанную на интродукции в почву активных штаммов нефтедеструкторов.

Анализ отечественной и зарубежной научной литературы, посвященной вопросам биоремедиации нефтезагрязненных экосистем, свидетельствует о необходимости избирательного подхода при выборе наиболее эффективной технологии. При этом использование приема интродукции штаммов в составе биопрепаратов экономически и экологически оправдано на свежих нефтеразливах, а также в условиях, неблагоприятных для активного функционирования аборигенных микробных сообществ (экстремальные значения pH, наличие трудноразлагаемых токсикантов и проч.).

Кроме того показанием к использованию биопрепаратов может быть необходимость ускоренной ремедиации, например, в климатических зонах с очень коротким вегетационным периодом. Во всех остальных случаях более целесообразно применение методов биостимуляции (внесение мелиорантов, биосурфактантов, применение биокомпостирования и т.п.). Подобные выводы основаны на результатах сравнительных полевых испытаний, согласно которым в среднем через 3 месяца различия в эффективности методов биостимуляции и биоаугментации, особенно на почвах со старыми нефтеразливами, полностью нивелируются [2].

Оценка эффективности применения микробных препаратов на основе нефтедеструкторов осложнена отсутствием достаточного объема информации об испытаниях биопрепаратов в производственных условиях. Подавляющее большинство публикаций, посвященных рассматриваемому вопросу, как отечественных, так и зарубежных, основывается на результатах лабораторных испытаний или, в лучшем случае, мелко-деляночных опытов, где нефтяное загрязнение и технологии очистки почв моделируются и подчас совсем не соответствуют тем почвенно-климатическим условиям, которые имеют место при реальных разливах нефтепродуктов.

Предпринимаемые в лабораторных условиях попытки оценить влияние таких трудно воспроизводимых в мелкомасштабных опытах факторов, как неоднородность почвенных агрегатов, различие в физических свойствах нефтепродуктов разного происхождения и фракционного состава, а также неравномерность распределения в почвенном профиле влаги, свидетельствуют о значительной вариабельности результатов лабораторных экспериментов, полученных просто при использовании сосудов разных размеров и даже формы при всех прочих равных условиях [3].

При этом результаты испытаний коммерческих препаратов, как правило, представлены в печатных изданиях, имеющих статус не столько научный, сколько отраслевой и, потому часто не подвергающихся необходимому рецензированию. Весьма часто подобные публикации носят явно рекламный характер, что ставит под сомнение достоверность представленных в них результатов.

Как известно в настоящее время при разработке микробных препаратов для очистки почв от нефти используют два основных методических подхода: ведут поиск бактериальных консорциумов, которые выделяют непосредственно из очищаемой почвы, а также применяют коллекционные культуры, в том числе и генномодифицированные штаммы с трансмиссивными плазмидами, определяющими высокий уровень углеводородокисляющей активности данных штаммов и их способность продуцировать биосурфактанты. Однако из-за непредсказуемости результатов интродукции активных штаммов, в настоящее время все большее распространение получают методы, основанные на стимулировании аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры почвы за счет применения различных мелиорирующих добавок: минеральных и органических удобрений, а также использования различных технических приемов оптимизации водно-воздушного режима почвы.

Один из таких методов биоремедиации, разработанный ООО НТО «Приборсервис», помимо периодического рыхления почвы, предполагает использование экологически оправданной схемы внесения минеральных

удобрений и почвенных алюмосиликатов для стимулирования УВ-окисляющей активности почвенной аборигенной микрофлоры.

Таблица 1 – Влияние цеолита и бактериальной культуры *Ps. putida* на интенсивность биодеградации нефти в почве

№ п/п	Вариант опыта	Содержание нефти спустя 4 месяца от начала опыта, г/кг	Степень деградации нефти, %
Чернозем южный тяжелосуглинистый (исходное содержание нефти – 22,57 ± 5,63 г/кг)			
1	Контроль	22,05 ± 5,50	2,44
2	Цеолит	11,94 ± 2,99	47,10
3	Цеолит +*Ps. putida*	9,30 ± 2,32	58,66
Торфо-почвенный грунт (исходное содержание нефти – 109,76 ± 27,44 г/кг)			
4	Контроль	83,39 ± 20,85	24,03
5	Цеолит	65,09 ± 16,27	40,70
6	Цеолит +*Ps. putida*	43,70 ± 10,93	60,20

Как известно, одним из негативных побочных эффектов биодеградации нефти является повышение уровня фитотоксичности почвы в процессе очистки по причине высокой токсичности продуктов разрушения нефти и метаболитов самих почвенных микроорганизмов. Высокая токсичность почвы может существенно снизить эффективность завершающего этапа рекультивации – фиторемедиации.

Для снижения уровня токсичности почвы в зоне ризосферы растений, применяемых при фиторемедиации, технология предполагает применение приема предпосевной обработки семян бактериальным препаратом на основе бактерий рода *Pseudomonas,* отличающихся повышенной устойчивостью к веществам-токсикантам. Применение мелиорантов на основе цеолита и глауконита, а также предпосевная обработка семян растений обеспечивает 40–60%-ю степень очистки нефтезагрязненной почвы за 2 месяца в зависимости от типа почвы и исходного уровня ее загрязнения (таблица 1) [4].

Литература

1. Абросимов А.А. Экология переработки углеводородных систем. М.: Химия, 2002. – 608 с.

2. Плешакова Е.В. Эколого-функциональные аспекты микробной ремедиации нефтезагрязнённых почв / Автореф. диссертации на соискание ученого звания доктора биологических наук, Саратов, 2010, 47с.

3. Davis C., Cort T., Illangasekare T.H. Dai D., Munakata-Marr J. Effects of heterogeneity and experimental scale on the biodegradation of diesel // Biodegradation, 2003. – № 14. – P. 373–384.

4. Tereshchenko N.N. Uzing of zeolites for biological remediation of oil contaminated soil / N.N. Tereshchenko, S.V. Lushnicov, A.B. Bubina // Geominas. – 2008. – V. 36. – № 45. – P. 23 – 26.

Для заметок

Образование индолилуксусной кислоты энтеробактериями, патогенными для человека

Ю.А. Маркова, А.Л. Турская, А.В. Духанина, Т.Е. Путилина, А.А. Ульданова, А.В. Крамарский, Л.А. Беловежец

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г Иркутск

Исследованиями последних лет показано, что многие виды микроорганизмов способны колонизировать как растительные, так и животные организмы, что связывают с так называемым явлением полигостальности [3;6;10;13]. Колонизируя представителей разных царств жизни, бактерии формируют с ними ассоциативные, либо антагонистические взаимоотношения. Для создания таких взаимоотношений микроорганизм должен обладать набором метаболитов, облегчающих размножение и выживание в соответствующих хозяевах.

Одним из метаболитов, способствующих взаимодействию бактерий с растительным организмом, может быть бактериальная индолилуксусная кислота (ИУК). ИУК является одной из главных форм фитогормона ауксина. Ее бактериальный синтез изучен достаточно хорошо [11;12]. Показано, что этот фитогормон синтезируется как фитопатогенными, так и симбиотическими бактериями, так называемыми PGPR-штаммами (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) [4;9]. В то же время, имеются сведения о синтезе этого соединения свободноживущими микроорганизмами [7].

В настоящее время особый интерес приобретает проблема колонизации растений бактериями, патогенными для человека. Среди бактерий, способных к полигостальности, особый интерес представляют виды семейства *Enterobacteriaceae*, которое включает в себя как фитопатогенные, так и патогенные для человека микроорганизмы. Показано, что фрукты и овощи, контаминированные такими патогенами, могут быть причиной кишечных инфекций человека [10;13]. Однако, до сих пор неизвестны механизмы их взаимодействия с растениями, в этом аспекте, синтез ИУК энтеробактериями может способствовать их выживанию в растительных тканях.

Целью представленных исследований было сравнительное изучение синтеза индолил-уксусной кислоты разными видами энтеробактерий.

Материалы и методы. В настоящих исследованиях использовались следующие виды энтеробактерий – *Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Proteus mirabilis, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Shigella sonnei, Shigella flexneri, Pectobacterium carotovorum* В-1247. Все виды, за исключением последнего, были изолированы от больных людей, находящихся на стационарном лечении в инфекционной больнице г. Иркутска.

Бактерии культивировались в забуференном физиологическом растворе с добавлением 200 мг/мл триптофана как предшественника индолилуксусной кислоты (ИУК) [1;2]. Через трое суток культивирования бактериальную суспензию центрифугировали 30 мин при 3000 об/мин [5], 1 мл супернатанта смешивали с 1 мл реактива Сальковского [8]. Развитие розовой окраски показывает наличие ИУК. Оптическую плотность измеряли при 530 нм с помощью спектрофотометра Specord S-100. Концентрацию ИУК определяли по калибровочной кривой.

Результаты.

В забуференном физиологическом растворе при добавлении 200 мг/л триптофана и культивировании при 24 °С, наиболее высокие концентрации ИУК (333,82±18,7 мкг/мл) продуцировал *E. aerogenes*. Достаточно много этого фитогормона обнаружено в супернатанте *C.freundii* (140,91±12,23 мкг/мл) и *P.mirabilis* (184,12±12,65 мкг/мл) (Рис. 1).

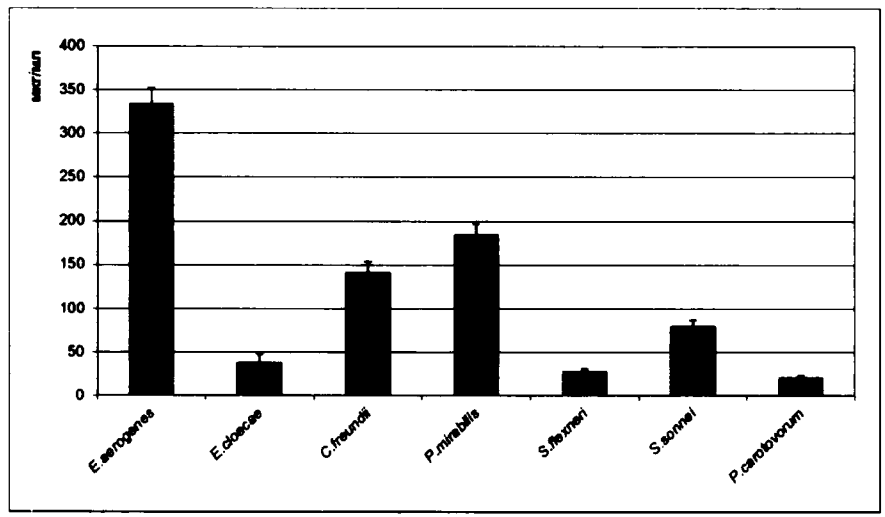


Рисунок 1 - Количество ИУК в супернатанте среды культивирования разных видов энтеробактерий

Даже в отсутствие триптофана, который, как известно, является предшественником бактериальной ИУК, в забуференном физиологическом

растворе наблюдаются существенные количества ИУК в супернатанте *E. aerogenes* (148,23±5,02 мкг/мл) и *P.mirabilis* (138,86±2,32 мкг/мл). Внесение триптофана способствует возрастанию ее количества у *E. aerogenes*, *C.freundii*, *P.mirabilis* и *S.sonnei* (Табл. 1).

Таблица 1 - Сравнительное количество ИУК в среде культивирования разных видов энтеробактерий в зависимости от добавления триптофана (200 мг/л)

Вид	Забуференный физиологический раствор без триптофана, 24 °С (мкг/мл)	Забуференный физиологический раствор с триптофаном, 24 °С (мкг/мл)
E. aerogenes	148,23±5,02	333,82±18,70
E.cloacae	41,69±4,87	37,65±10,40
K.pneumoniae	0	0
C.freundii	68,51±6,22	140,91±12,23
P.mirabilis	138,86±2,32	184,12±12,65
S.sonnei	24,51±5,83	27,42±3,44
S.flexneri	34,83±26,07	78,83±7,57
P.carotovorum	17,34±5,40	20,40±2,48

Таким образом, в наших исследованиях виды *E. aerogenes, C.freundii* и *P.mirabilis,* изолированные от больных людей, являются активными продуцентами ИУК. Штамм *K.pneumoniae* при данных условиях не образовывал данный метаболит.

Бактериальный синтез ИУК в отсутствие растения может свидетельствовать о возможности выполнения этим фитогомоном и иных функций [4; 7]. Известно, например, что ИУК является предшественником других соединений, например, антраниловой кислоты, которая в свою очередь может быть регулятором экспрессии генов, или межклеточным сигналом, аналогичным ацил-гомосерин-лактону. Имеются сведения, что образование ИУК можно рассматривать как процесс детоксикации триптофана, который является для прокариот токсическим соединением, о чем свидетельствует активация синтеза ИУК клетками *A.brasilense, E.cloacae, P.putida* в условиях стресса (недостаток кислорода и источников углерода, переход в стационарную фазу роста и пр.) [1]. Исследования Bianco *et al.* (2006) продемонстрировали, что ИУК способна изменять экспрессию генов *E. coli*. Например, показано, что гены, вовлеченные в центральные метаболические пути, в частности, биосинтез аминокислот (лейцина, изолейцина, валина и пролина), активировались ИУК [7].

Все изложенное свидетельствует, что патогенные и условно-патогенные для человека энтеробактерии, изолированные от больных людей синтезируют ИУК, которая выполняет функцию фитогормона ауксина. Следовательно, при попадании в организм растения, эти виды (в первую очередь, *E. aerogenes, C.freundii* и *P.mirabilis)* могут оказывать значимое влияние на рост и развитие растительного организма, сопоставимое с таковым у эндофитных и разосферных бактерий.

Литература

1. Кацы, Е.И. Молекулярная генетика ассоциативного взаимодействия бактерий и растений: состояние и перспективы исследований / Е.И. Кацы; [отв. ред. В.В. Игнатов]; Ин-т биохимии и физиологии растений и микроорганизмов. – М.: Наука, 2007. – 86 с.
2. Кравченко, Л.В. Роль триптофана в корневых экзометаболитах для фитостимулирующей активности ризобактерий / Л.В. Кравченко, Т.С. Азарова, Н.М. Макарова, И.А. Тихонович // Микробиология. – 2004, Т 73, № 2. – С. 195-119.
3. Литвин, В.Ю. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий / В.Ю. Литвин, А.Л. Гинцбург, В.И. Пушкарёва и др. – изд-во «ФармарусПринт», 1998. – 256 с.
4. Цавкелова, Е.А. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) / Е.А. Цавкелова, С.Ю., Климова, Т.А. Чердынцева и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т.42, №2. – С.133-143.
5. Ahmad, F. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities / F. Ahmad, I. Ahmad, M.S. Khan // Microbiological Research. – 2008. – V. 163. – P. 173-181.
6. Arthurson, V. Persistence and spread of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in soil and on spinach plants / V. Arthurson, A. Sessitsch, L. Jäderlund // FEMS Microbiology Lett. – 2011. – V. 314, № 1. – P. 67–74.
7. Bianco, C. Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli* / C. Bianco, E. Imperlini, R. Calogero, B. Senatore, P. Pucci, R. Defez // Microbiology. – 2006. – V. 152, № 8. – P.2421-431.
8. Celloto, V.R. Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid by New *Klebsiella oxytoca* Free and Immobilized Cells on Inorganic Matrices / V.R. Celloto, A.J.B. Oliveira, J.E. Goncalves // The Scientific World Journal. – 2012. – Article ID 495970. – 7 p.
9. Dimkpa, C.O. Production of Indole-3-Acetic Acid via the Indole-3-Acetamide Pathway in the Plant-Beneficial Bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 is Inhibited by ZnO Nanoparticles but Enhanced by CuO Nanoparticles / C.O. Dimkpa, J. Zeng, J.E. McLean et al. // Appl. and Environ. Microbiol. – 2012. – V. 78, № 5. - P. 1404-410.

10. Kirzinger, M.W.B. Insights into Cross-Kingdom Plant Pathogenic Bacteria / M.W.B. Kirzinger, G. Nadarasah, J. Stavrinides // Genes. – 2011. - № 2. - P. 980-997.
11. Li, J. ACC Deaminase Minus Mutant of *Enterobacter cloacae* UW4No Longer Promotes Root Elongation / J. Li, D.H. Ovakim, T.C. Charles et al. // Current Microbiology. – 2000. – V. 41, № 2. – P. 101-105.
12. Ona, O. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled / O. Ona, J. Van Impe, E. Prinsen, J. Vanderleyden // FEMS Microbiol. Lett. – 2005. – V. 246. – P. 125-132.
13. Tyler, H.L. Plants as a Habitat for Beneficial and /or Human Pathogenic Bacterium / H.L. Tyler, E.W. Triplett // Annu. Rev. Phytopathol. - 2008. – V.46. – P. 53-73.

Для заметок

Образование активных форм кислорода в корнях проростков редиса при воздействии *Escherichia coli*

А.Л. Турская, А.А. Ульданова, Т.Е. Путилина, А.В. Степанов, Ю.А. Маркова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск

В процессе эволюции у растений развились две системы иммунного ответа. Это PAMP-индуцированный иммунный ответ, аналогичный врожденному иммунитету животных, и эффектор-индуцированный иммунный ответ, реализуемый через специфическое взаимодействие R-белков растений и эффекторных белков бактерий [1;5]. PAMP-индуцированный ответ запускается при распознавании консервативных молекулярных структур бактерий образраспознающими рецепторами растений. В реализации защитных механизмов PAMP-индуцированного и эффектор-индуцированного иммунитета важная роль принадлежит активным формам кислорода (АФК). Продукция АФК является одним из первых событий в защитном ответе, они выполняют роль сигнальных молекул, а также служат защитными соединениями в стрессовых условиях [2;3]. Подробно изучен PAMP-индуцированный ответ на воздействие фитопатогенов, но практически нет сведений о контакте растений с эндофитами, среди которых встречаются бактерии, патогенные для человека.

В связи с этим, объектами исследования были 7-дневные проростки редиса (*Rhaphanus sativus* L.) сорта Жара, инокулированные патогеном человека *Escherichia coli* (музейный штамм XL-1Blue). Для сравнения использовали фитопатоген *Pectobacterium carotovorum* (штамм В-1247). В качестве среды культивирования использовали стерильную дистиллированную воду.

Наиболее естественной зоной контакта между бактериями и растительным организмом служит корневая система, в процессе такого взаимодействия в среду выпускается определенный спектр метаболитов, среди которых присутствуют сигнальные молекулы, в том числе и АФК [4;6]. Мы проводили исследования по изменению концентрации одного из компонентов АФК – пероксида водорода, выделяемого в среду культивирования корнями проростков редиса при заражении их *E. coli*. Измерения концентрации пероксида водорода проводили в течение 28 часов. Такой интервал времени позволяет выявить первую и вторую волны окислительного «взрыва», которые соответствуют PAMP-индуцированному и эффектор-индуцированному ответам.

Сравнение ответа растений редиса сорта Жара на фитопатоген *P.carotovorum* и патоген человека *E. coli* на ранних и поздних стадиях взаимодействия представлено на рис. 1 и 2. Через пять минут после внесения *E. coli* в среду культивирования с помещенными корнями редиса наблюдалось существенное повышение уровня АФК (рис.1). Всего отмечено три выраженных пика, которые наблюдались через десять минут, три и пять часов кокультивирования. Последующие показатели, полученные через 16-28 часов, свидетельствуют о постепенном снижении концентрации АФК в среде (рис. 2).

Динамика концентрации пероксида водорода при заражении фитопатогеном *P.carotovorum* значительно отличалась (рис. 1). Первый пик увеличения уровня АФК наблюдался уже через пять минут после заражения, а второй – через 60 минут. После этого, количество АФК было на уровне контроля до 17 часов (1020 мин) кокультивирования с бактерией (рис. 2). К концу эксперимента уровень АФК возрастал, достигая максимальных значений через сутки после инокуляции фитопатогеном.

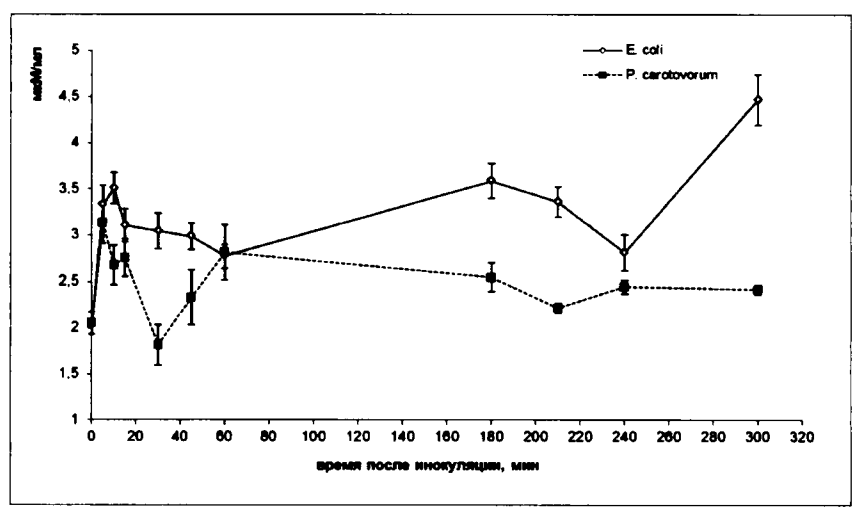


Рисунок 1 - Образование АФК корнями проростков редиса при воздействии патогена человека *E.coli* и фитопатогена *P.carotovorum* на раннем этапе взаимодействия

Через 24-28 часов наблюдалась противоположная динамика (рис. 2). Флуктуации количества АФК, образующиеся в ответ на инокуляцию *E. coli*,

постепенно затухали, и наблюдалась тенденция к снижению содержания этой молекулы в среде. В то же время, амплитуда колебаний концентрации сигнальной молекулы при контакте корней редиса с *P.carotovorum*, увеличивается. Это явление может быть связано с началом поражения растительных тканей пектолитическими ферментами микроорганизма и, следовательно, развитием заболевания.

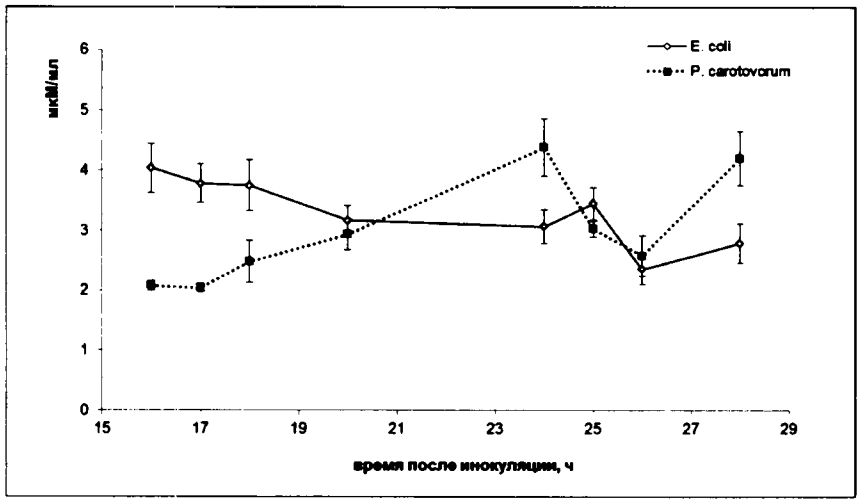


Рисунок 2 - Образование АФК корнями проростков редиса при воздействии патогена человека *E.coli* и фитопатогена *P.carotovorum* на поздних стадиях взаимодействия

В результате проведенных исследований обнаружено, что первый подъем уровня АФК приходится на первые минуты после взаимодействия растения и микроорганизма и соответствует, вероятно, PAMP-индуцированному распознаванию. При этом, в ответ на *E.coli* он был более протяженным по времени (60 мин). Вторая волна окислительного «взрыва» была сильнее выражена при взаимодействии с условно-патогенной бактерией. Количество АФК, индуцируемое *P.carotovorum* на протяжении последующих пяти часов после первого «всплеска» было практически неизменным. Это может быть связано с блокированием защитных реакций эффекторами фитопатогенной энтеробактерии, тогда как патоген человека, используемый в настоящем исследовании, скорее всего не способен супрессировать иммунный ответ, формирующийся в корневой системе растения.

Литература

1. Boller, T. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors / T. Boller, G.A. Felix // Annual Review of Plant Biology. – 2009. - V. 60. – P. 379-406.
2. Daudi, A. The Apoplastic Oxidative Burst Peroxidase in *Arabidopsis* is a Major Component of Pattern-Triggered Immunity / A. Daudi, Z. Cheng, J. A. O'Brien et al. // Plant Cell. – 2012. – V. 24, № 1. – P. 275–287.
3. O'Brien, J. A Peroxidase-Dependent Apoplastic Oxidative Burst in Cultured *Arabidopsis* Cells Functions in MAMP-Elicited Defense / J.A. O'Brien., A. Daudi, P. Finch et al. // Plant Physiology. – 2012. – V. 158. – P. 2013-2027.
4. Tanaka, A. Reactive Oxygen Species Play a Role in Regulating a Fungus-Perennial Ryegrass Mutualistic Interaction / A. Tanaka, M.J. Christensen, D. Takemoto et al. // Plant Cell. – 2006. – V 18. – P. 1052-1066.
5. Tsuda, K. Comparing Signaling Mechanisms Engaged in Pattern-Triggered and Effector-Triggered Immunity / K. Tsuda, F. Katagiri // Current Opinion in Plant Biology. – 2010. - V 13. – P. 459–465.
6. Venisse, J.S. Evidence for the Involvment of an Oxidative Stress in the Initiation Infection of Pear by *Erwinia amylovora* / J.S. Venisse, G. Gullner, M.N. Brissel // Plant Physiology. – 2001. – V. 125. – P. 2164-172.

Для заметок

Стендовые доклады

Влияние красного света на активность ауксинов, гиббереллинов и абсцизинов у изогенных по генам ее линий сои

В.Ф. Тимошенко, В.В. Жмурко, А.А. Кубась,

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, г. Харьков, Украина

Реакция на соотношение темного и светлого периода суток (фотопериода) является жизненно важной для растений и находится под контролем генетического аппарата и нескольких регуляторных систем - фитохромной, трофической и фитогормональной. Взаимодействие этих систем обеспечивает контроль и регуляцию всех ростовых и структурных процессов, связанных с размножением и развитием растений [2-6].

Для углубления существующих представлений о механизмах инициации цветения большой интерес представляет изучение взаимосвязи фитохромной и фитогормональной регуляторных систем. Известно, что фитохромная система является одной из важных в рецепции и трансдукции фотопериодического сигнала. Она контролирует активность генов, связанных с переходом растений к цветению [6].

Положение о роли фитогормонов в инициации цветения сформулировано в гормональной теории развития Чайлахяном [3]. По этой теории в благоприятных фотопериодических условиях в листьях образуется индуцирующий цветение стимул – «флориген». Предполагалось, что он представляет собой бикомпонентный комплекс, состоящий из гиббереллина и «антезина». Было показано, что гиббереллины инициируют цветение на коротком дне некоторых видов длиннодневных растений, но не вызывают его на длинном дне у короткодневных. Кроме того, природа «антезина» до сих пор остается невыясненной [4,5].

Нами ранее показано, что в регуляции перехода к цветению фотопериодически чувствительных видов решающую роль играет не специфическая функция какого-либо одного из известных фитогормонов, а их система. Она представляет собой тот регуляторный комплекс, который обусловливает координацию процессов роста и развития растений в пространстве и во времени [1].

Вероятно, что система фитохромов, как один из основных рецепторов и трансдукторов фотопериодического сигнала, может реализовать эффекты на рост и развитие растений посредством изменения в системе фитогормональной регуляции. Однако влияние активации фитохромов на функционирование фитогормональной системы изучено недостаточно.

Целью нашей работы было изучение отдельных аспектов этой проблемы. В задачу исследований входило изучение влияния красного света (КС, 660нм) на активность ауксинов (ИУК), гиббереллинов (ГК) и абсцизовой кислоты (АБК) в листьях изогенных линий сои с разной фотопериодической чувствительностью и ее связь с ростом и развитием растений.

В опытах использованы короткодневная (КД) линия (генотип, *E1E2E3*) и фотопериодически нейтральная (ФПН) линия (генотип, *e1e2e3*) сои сорта Clark. Растения выращивали в вегетационной камере кафедры физиологии и биохимии растений Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина в почвенной культуре, в трехкратной биологической повторности (по три 2-литровых пластиковых сосуда на вариант, по 10 растений в сосуде). Температура в опыте 24/20 ^{0}С (день/ночь), освещенность – 18 кЛк, фотопериод 16 часов. В фазе 2-х настоящих листьев растения в трех сосудах облучали КС в конце светлого периода в течение 30 мин (опыт), а растения в других трех сосудах служили контролем. Для облучения использовали светодиодную матрицу, включающую 20 светодиодов с максимумом излучения 660нм.

Фитогормоны определяли в полностью сформированных вторых от верхушки листьев. Пробы для анализов отбирали в начале фотопериода и в его средине – в 9 и 13 часов соответственно.

Активность ИУК определяли по приросту отрезков колеоптилей мягкой озимой пшеницы сорта Альянс, ГК – по приросту гипокотилей гороха сорта Харьковский эталонный, АБК – по ингибированию прорастания семян горчицы белой (*Sinapis alba* L).

Исследования показали, что активность ИУК у облученной КС КД линии как в 9, так и в 13 часов была выше, чем в контроле. У ФПН линии влияния КС на активность ИУК нами не выявлено (рис.1).

Активность ГК у облученных растений КД линии в 9 часов была выше, чем у контрольных растений, а в !3 часов наблюдалась аналогичная тенденция. У ФПН линии активность этого фитогормона в 9 часов также была выше у облученных КС растений, а 13 часов она была такой же как и у контрольных растений (рис.2).

Активность АБК у КД линии под влиянием облучения КС снижалась в 9 часов, а в 13 часов возрастала практически до уровня активности в контроле (рис.3). У ФПН линии в 9 часов под влиянием КС активность АБК повышалась. В 13 часов достоверных различий в активности гормона между облученными и контрольными растениями нами не выявлено (рис.3).

Рисунок 1 - Влияние КС на активность ИУК в листьях КД и ФПН линий сои. * Различия достоверны при P< 0,05.

Рисунок 2 - Влияние КС на активность ГК в листьях КД и ФПН линий сои. * Различия достоверны при P< 0,05.

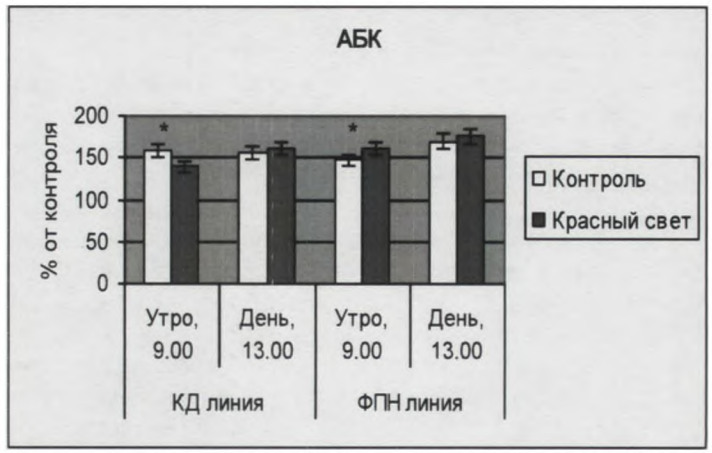


Рисунок 3 - Влияние КС на АБК в листьях КД и ФПН линий сои. * Различия достоверны при P< 0,05.

Сопоставление данных по активности фитогормонов с изменениями в росте растений показало, что у КД линии уже на седьмые сутки после начала облучения масса растений была достоверно выше, чем масса контрольных, а спустя месяц после проведения эксперимента превосходство опытных растений КД линии над контрольными по биомассе составляло 32%. Это, по-видимому, связано с повышением активности ИУК и ГК на фоне снижения активности АБК под влиянием облучения КС.

У ФНР линии достоверных различий в массе облученных и необлученных растений не обнаружено ни на седьмые сутки опыта, ни спустя 30 дней после окончания облучения. Отсутствие ростовой реакции на облучение КС у ФПН линии сои может быть связано с тем, что изменения в активности ИУК после облучения были слабо выраженными, а когда в утренние часы активность ГК увеличивалась, одновременно возрастала и активность ингибирующей рост АБК. Это может быть подтверждением положения о том, что физиологический и морфологический эффект фитогормонов зависит не от уровня активности какого - то одного из них, а от функционирования гормонов как комплементарной системы регуляции роста и развития растений [1].

Результаты показали также, что скорость перехода исследованных линий от ювенильной фазы онтогенеза в генеративную практически не

изменялась под влияние облучения КС. Так, облученные растения КД линии зацвели на 2 суток, а ФПН линии – на сутки позже, чем контрольные.

Таким образом, полученные результаты показали, что активация системы фитохромов вызывает изменения в активности исследованных фитогормонов в листьях, а также в интенсивности ростовых процессов у растений КД линии сои, в то время как подобные изменения у растений ФПН линий сои практически не выражены. Влияния активации фитохромов на темпы развития исследованных линий нами не выявлено. Полученные данные позволяют предположить, что фитохромные эффекты у сои могут реализоваться посредством изменения функционирования фитогормональной системы регуляции роста и развития растений.

Литература

1. Жмурко В.В. Фотоперіодизм рослин: фізіолого-біохімічні та генетичні аспекти. – Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку. – К.: Логос, 2009. – С.537-564.

2. Цыбулько В.С. Метаболические закономерности фотопериодизма растений. – Киев: Аграрна наука, 1998. – 187 с.

3. Чайлахян М.Х. Регуляция цветения высших растений. – М.: Наука, 1982. – 558 с.

4. Corbesiert L.,Coupland G. The quest for florigen: a review of recent progress //J. Exp. Botany. – 2007. – V. 57, N13. – P.3395-3403

5. Matsoukas I. G., Massiah A. J., Thomas B. Florigenic and Antflorigenic Signaling in Plants // Plant Cell Physiol. – 2012. – Vol.53, N11. – P. 1827–1842.

6. Weller J. L., Murfet I. C., Reid, J. B. Pea mutants with reduced sensitivity to far-red light define an important role for phytochrome A in day-length detection // Plant Physiol. – 1997. – Vol.114. – P. 1225-1236.

Для заметок

Действие дефицита воды на физиологические процессы сортов пшеницы Росинка и Омская 23

Н.П. Широкова

Омский государственный педагогический университет, г. Омск

Проблема регуляции физиолого-биохимических процессов в стрессовых условиях среды остается одной из важнейших в современной физиологии [2, 4, 10]. До настоящего времени не удалось создать целостную физиолого-генетическую модель признака засухоустойчивости, основанную на понимании биологических реакций растений, адекватно отражающих процессы адаптации и формирования урожая в условиях длительного обезвоживания тканей.

Исследования проводили в условиях вегетационных опытов на яровой мягкой пшенице (*Triticum aestivum* L.) сортов Росинка и Омская 23. Исследуемые растения выращивали в сосудах объемом 4 кг почвы. Влажность почвы при посеве наклюнувшимися семенами составляла 80% от полной влагоемкости (ПВ) почвы. Заданную по вариантам влажность почвы создавали к началу фазы трубкования и далее поддерживали на уровне 60 и 30% от ПВ путем полива по массе.

В процессе исследований определяли показатели ростовых процессов: длину побега, сырую и сухую массу, площадь листьев [1]; исследовали общее содержание воды. Определение содержания абсцизовой кислоты (АБК) и цитокининов проводили иммуноферментным методом [5, 6]. Растительные образцы отбирали в основные фазы онтогенеза. Все эксперименты поставлены в четырех-пяти биологических и четырех аналитических повторностях.

Математическую обработку данных проводили с помощью методов вариационной статистики, используя программу Microsoft Excel. В таблицах и на гистограммах приведены средние арифметические значения и их среднеквадратичные ошибки. Оценку достоверности результатов проводили на основе критерия Стьюдента, при уровне вероятности не менее 95%.

В наших исследованиях на начальном этапе водного дефицита содержание воды в растениях у обоих сортов пшеницы не менялось. В дальнейшем в ходе онтогенеза уровень воды постепенно снижался у обоих сортов пшеницы, в большей степени – у растений сорта Омская 23 (табл. 1).

Таблица 1 – Содержание общей воды в растениях пшеницы сортов Омская 23 и Росинка на разном фоне водоснабжения

Сорт растений	Вариант	Содержание воды в растениях, %	
		День водного дефицита	
		2-й	8-й
Омская 23	60% от ПВ	83±0,00	72±0,35
	30% от ПВ	83±0,25	43±1,43***
Росинка	60% от ПВ	83±0,88	72±0,85
	30% от ПВ	82±0,48	68±0,71**

Примечание: ** – различия достоверны при p=0,01; *** – различия достоверны при p=0,001

В условиях недостаточного водоснабжения ростовые показатели растений сорта Омская 23 были значительно меньше контрольных. На второй день водного дефицита наблюдалось резкое уменьшение длины побега и площади листовой поверхности (рис. 1). После семи дней водного дефицита площадь листьев сократилась более значительно. В большей степени данные изменения происходили у пшеницы сорта Омская 23.

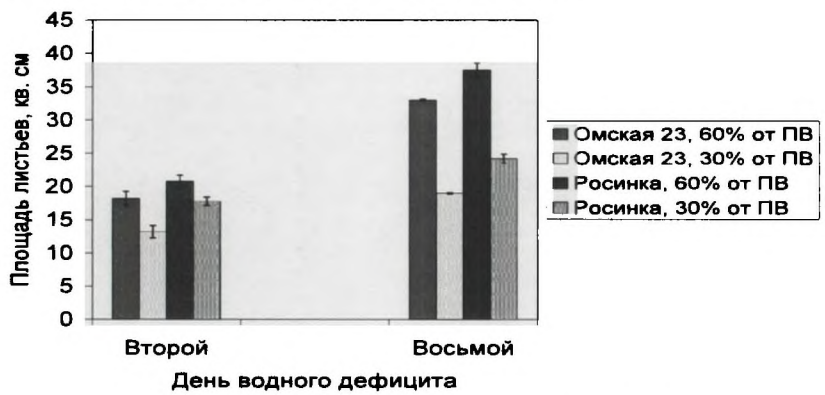


Рисунок 1 – Влияние водного дефицита на площадь листьев сортов пшеницы Росинка и Омская 23

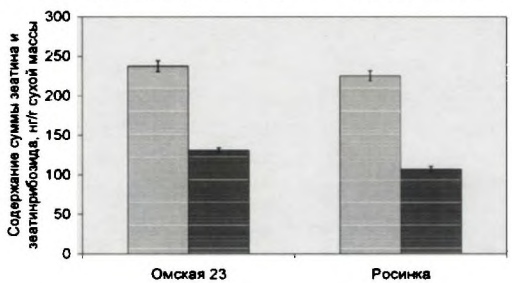
В этом же эксперименте в условиях низкого водообеспечения у исследуемых сортов пшеницы снизилось и количество зерна в колосе, уменьшилась его масса. Более значительное снижение наблюдалось у сорта Омская 23 (табл. 2), что также дает основание говорить о меньшей засухоустойчивости сорта Омская 23.

Таблица 2 – Влияние водного дефицита на продуктивность пшеницы сортов Росинка и Омская 23

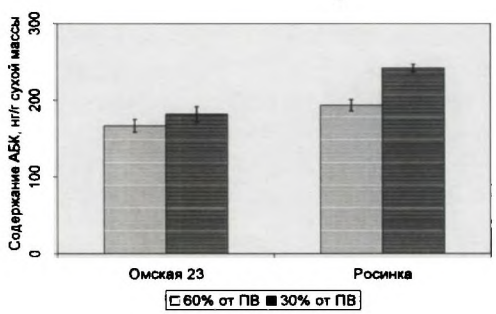
Вариант	Омская 23		Росинка	
	Кол-во зерна в колосе, шт.	Масса зерна колоса, г	Кол-во зерна в колосе, шт.	Масса зерна колоса, г
60% от ПВ	14±0,18	0,26±0,015	12±0,54	0,18±0,007
30% от ПВ	10±0,15***	0,18±0,004**	9±0,21**	0,16±0,008

Примечание: ** – различия достоверны при p=0,01; *** – различия достоверны при p=0,001

Фитогормоны, являясь важными эндогенными регуляторами жизнедеятельности растений, исполняют роль трансдукторов сигналов внешней среды [3, 7, 8]. Поэтому важно иметь картину баланса основных фитогормонов при водном дефиците у исследуемых сортов пшеницы.



а



б

Рисунок 2 – Влияние водного дефицита на содержание зеатина и его рибозида (а) и абсцизовой кислоты (б) в листьях пшеницы сортов Омская 23 и Росинка

В наших исследованиях в условиях достаточного водоснабжения в листьях трех верхних ярусов пшеницы сорта Росинка абсцизовой кислоты содержалось больше, чем в листьях сорта Омская 23. В условиях водного дефицита в листьях обоих сортов пшеницы происходило резкое снижение уровня зеатина и возрастало содержание абсцизовой кислоты (рис. 2а, б). При этом в листьях пшеницы устойчивого сорта Росинка увеличение содержания АБК было более значительным (на 25%) по сравнению с сортом Омская 23 (на 9%), менее устойчивым к засухе. Изучив изменение содержания эндогенного зеатина и АБК в листьях исследуемых сортов пшеницы, можно говорить о важной роли фитогормонов в регуляции устойчивости пшеницы к засухе.

Литература

1. Аникиев В.В., Кутузов Ф.Ф. Новый способ определения площади листовой поверхности у злаков // Физиология растений. - 1961. - Т. 8, В. 3. - С. 375-377.
2. Гончарова Э.А. Водный статус культурных растений и его диагностика. СПб.: ВИР, 2005. - 112 с.
3. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф. Взаимодействие фоторегуляторных систем роста и фотосинтеза растений // Физиология растений. - 1998. - Т. 45., В. 6. - С. 925.
4. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. М.: Дрофа, 2010. - 638 с.
5. Кудоярова Г.Р. Уровень фитогормонов в растении: способы регуляции, биологическая зависимость // Экологические аспекты регуляции роста продуктивности растений: Материалы научной конференции. Ярославль, 1991. - С. 158-169.
6. Кудоярова Г.Р. Иммунохимические исследования гормональной системы растений: регуляция роста и ответы на внешние воздействия // Автореф. дис. докт. биол. наук., Санкт-Петербург, 1996. - 48 с.
7. Кузнецов Вл.В. Общие системы устойчивости и трансдукция стрессорного сигнала при адаптации растений к абиотическим факторам // Вестник Нижегородского гос. ун-та им. Н.И. Лобачевского. Сер. Биол. Материалы выездной сессии ОФР РАН по пробл. биоэлектрогенеза и адаптации у растений, 2001. - С. 65-69.
8. Романов Г.А. Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. - 2009. - Т. 56, № 2. - С. 295-319.
9. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. Санкт-Петербург, 2002. - 244 с.

Изучение особенностей механизмов устойчивости кормовых культур к недостатку кислорода

С.А. Войцековская[1], Т.П. Астафурова[2], Г.С. Верхотурова[3], Г.В. Боровикова[3], В.М. Постовалова[3], А.А. Буренина[3]

[1]Томский государственный педагогический университет, г. Томск
[2]Томский государственный университет, г. Томск
[3]НИИ биологии и биофизики ТГУ, г. Томск

Живые организмы постоянно испытывают на себе влияние различных факторов окружающей среды. Растения, в силу своего прикрепленного образа жизни, особенно подвержены этим воздействиям. Одним из широко распространенных неблагоприятных факторов является кислородная недостаточность, которая наблюдается при затоплении растений. Постоянное или временное переувлажнение характерно для многих регионов Земли. При недостатке кислорода ограничивается жизнедеятельность представителей дикой флоры, и создаются трудности для возделывания сельскохозяйственных культур [1, 2]. Изучение путей адаптации растений к кислородной недостаточности представляет большой интерес и имеет значительную практическую ценность с точки зрения познания теоретических основ устойчивости растений; для разработки способов выращивания растений на затопляемых почвах; введения в культуру устойчивых к дефициту кислорода сельскохозяйственных растений, имеющих ценные пищевые, кормовые, технические или лекарственные свойства; создания растений, более толерантных к анаэробному стрессу, используя биотехнологические достижения в области генной и клеточной инженерии.

В настоящее время сформулировано представление, что адаптация растений к условиям гипо- и аноксии реализуется двумя способами: путем избегания анаэробиоза благодаря дальнему транспорту кислорода ("кажущаяся" толерантность) и в ходе биохимической адаптации ("истинная" толерантность) [2]. Установлено, что метаболическая адаптация растений к анаэробному стрессу реализуется на молекулярном уровне благодаря коренной перестройке белкового, энергетического и углеводного обмена [1 – 3].

При изучении действия гипобарической гипоксии показано, что эти изменения происходят не только в гетеротрофных органах, но затрагивают и ассимилирующий аппарат. Метаболические взаимоотношения фотосинтеза и дыхания в этих условиях носят компенсаторный характер [4], связаны с усилением определенных анаплеротических реакций [5] и зависят от степени сформированности фотосинтетического аппарата [6].

Реакции темнового дыхательного метаболизма в зеленых листьях в условиях модифицированной воздушной среды или затопления корневой системы растений имеют свои особенности, связанные с адаптивными изменениями их активности. Показано, что у представителей одного рода амарант есть видовые особенности усиления тех или иных реакций [7], отмечается выраженная зависимость устойчивости от специфичности сформированных антиоксидантных систем [8].

Целью данного исследования являлось изучение активности алкогольдегидрогеназы разной коферментной специфичности, как в гетеротрофных органах, так и в зеленых листьях заведомо толерантных к гипоксии овсянице луговой и костреце безостом при длительном затоплении корневой системы.

Растения выращивали в условиях вегетационного опыта при естественном освещении. Контрольные – при оптимальной увлажненности почвы в течение всего вегетационного периода, а опытным создавали затопление корневой системы, когда вода постоянно находилась над поверхностью почвы. С целью изучения особенностей развития в условиях корневой гипоксии оценивали биохимические показатели растения после длительного 2-х месячного затопления.

Гомогенизацию растительных тканей производили при пониженной температуре в среде следующего состава: трис-HCl буфер (50 мМ, pH 7,8), аскорбат натрия (5 мМ), цистеин (3 мМ), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (1 мМ) и ДТТ (5 мМ). Гомогенат центрифугировали на холоду при 20 000 g в течение 20 мин (центрифуга К-24, Германия). Активность ферментов измеряли в супернатанте спектрофотометрически при 340 нм (Shimadzu UV-1650 pc UV-spectrophotometer, Shimadzu Corp., Япония) в окислительно-восстановительных превращениях НАД или НАДН [8].

Показателем, определяющим реакцию растений на действие абиотических факторов, как правило, является протекание гликолиза. В условиях недостатка кислорода хотя и неспецифической реакцией, но, тем не менее, основной надо считать активность алкогольдегидрогеназы. Согласно данных таблицы 1 после длительного периода затопления в корнях отмечается повышенная активность как НАД- так и НАДН-алкогольдегидрогеназы у обоих изучаемых видов растений. В корнях костреца это увеличение составляет 25 – 50 %, в тоже время у овсяницы повышение составляет 4 – 6 раз. При этом возрастание характерно как для фермента, окисляющего этанол, так и НАДН-алкогольдегидрогеназы,

катализирующей образование этанола (табл. 1). Не менее интересны изменения, происходящие в ассимилирующих органах (табл. 2).

Таблица 1 – Активность анаэробных дегидрогеназ в гетеротрофных органах костреца и овсяницы при длительной корневой гипоксии, мЕ/мг белка

Условия опыта	НАД-алкогольдегидрогеназа	НАДН-алкогольдегидрогеназа
Кострец		
Контроль	84,72 ± 7,6	1215,9 ± 112,5
Гипоксия	107,19 ± 7,3	2601,6± 118,3
Овсяница		
Контроль	9,67 ± 0,35	76,57 ± 4,07
Гипоксия	67,94 ± 1,50	311,68 ± 0,40
Примечание: все различия между контролем и опытом достоверны при $P \leq 0,05$		

Таблица 2 – Активность ферментов дыхательного обмена в листьях костреца и овсяницы при нормальной аэрации и в условиях затопления, мЕ/мг белка

Условия опыта	НАД-алкогольдегидрогеназа	НАДН-алкогольдегидрогеназа
Кострец		
Контроль	37,82 ± 3,20	61,57 ± 0,37
Гипоксия	77,23 ± 10,50	267,28 ± 34,70
Овсяница		
Контроль	58,50 ± 23,80	66,07 ± 12,97
Гипоксия	134,98 ± 34,0	39,19 ± 3,70
Примечание: все различия между контролем и опытом достоверны при $P \leq 0,05$		

В зеленых листьях костреца активность алкогольдегидрогеназ в опыте при корневой гипоксии нарастает. Одновременно в листьях овсяницы (табл. 2) возрастает активность только НАД-алкогольдегидрогеназы, а работа фермента с НАДН, то есть переработка ацетальдегида, снижена. Значит, в листьях костреца идет активная детоксикация этанола с помощью алкогольдегидрогеназы, работающей в прямой и обратной реакциях. У овсяницы способность перерабатывать токсические продукты уменьшена за счет сниженной активности НАДН-алкогольдегидрогеназы, когда меньше образуется НАД, который необходим для поддержания гликолиза. С другой стороны, возможно, что таким путем в зеленых листьях овсяницы создается пул неиспользованного эндогенного НАДН, который необходим для дальнейшего метаболизма. Поскольку растения не страдают от избытка эндогенного этанола, вполне закономерно предполагать, что существуют пути переключения реакций с образования этанола на синтез других соединений [3]. Кроме того недоокисленная из-за гипоксических условий глюкоза может в зеленых листьях поступать в хлоропласт, окисляться по пентозофосфатному пути или гликолизу до 3-фосфоглицериновой кислоты, таким образом, осуществляя взаимодействие метаболических путей в органеллах клетки на уровне промежуточных продуктов.

Таким образом, судя по активности алкогольдегидрогеназы различной коферментной специфичности можно констатировать у этих двух видов кормовых злаков существование особенностей в приспособительных реакциях к недостатку кислорода.

Литература

1. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2002. 244 с.
2. Vartapetian B.B., Sachs M.M., Fagerstedt K.V. Plant Anaerobic Stress. II. Strategy of Avoidance of Anaerobiosis and Other Aspects of Plant Life under Hypoxia and Anoxia // Plant Stress. - 2008. - V. 2, № 1. - P. 1–19.
3. Семихатова О.А., Чиркова Т.В. Физиология дыхания растений. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2001. - 224 с.
4. Астафурова Т.П., Вайшля О.Б., Зайцева Т.А., Лаптева Т.А., Чиркова Т.В. Особенности дыхательного метаболизма в листьях гороха при гипобарической гипоксии // Физиология растений. - 1993. - Т. 40, № 4. - С. 656–661.
5. Верхотурова Г.С., Вайшля О.Б., Боровикова Г.В., Астафурова Т.П. Функционирование метаболических этапов дыхания в проростках хлорофилльного мутанта гороха при гипобарической гипоксии // Физиология и биохимия культ. растений. - 2009. - Т. 41, № 4. - С. 297–303.
6. Астафурова Т.П., Зайцева Т.А., Зотикова А.П., Рябчук Ю.А. Формирование пигментного аппарата в проростках ячменя в условиях гипобарической гипоксии // Физиология растений. - 1996. - Т. 43, № 6. - С. 900–905.
7. Астафурова Т.П., Войцековская С.А., Верхотурова Г.С. Исследование путей адаптации растений к гипобарической гипоксии // Вестник ТГУ. - 2007. - № 1. - С. 67–74.
8. Войцековская С.А., Сотникова Н.В., Верхотурова Г.С., Зайцева Т.А., Боровикова Г.В., Астафурова Т.П. Особенности метаболической адаптации у растений амаранта в условиях гипобарической гипоксии // Сельскохозяйственная биология. - 2010. - № 5. - С. 106–111.

Красный свет и его роль в криопротекции

Т.П. Якушенкова, Д.Ю. Юнусов

Казанский Приволжский Федеральный университет, г. Казань

Введение

Известно, что действие света распространяется на множественные системы контроля роста и развития растений. В этом случае проявляется регуляторная роль света, не связанная с запасанием световой энергии. Фоторегуляторные рецепторы взаимодействуют с другими соединениями клетки – трансформаторами и трансдукторами светового сигнала, входящими в систему фоторегуляции. Изменение состояния рецепторов, поглотивших свет и остальных компонентов системы приводит к активации различных путей метаболизма. До настоящего времени нет ясности о регуляторном влиянии качества света на устойчивость растений, в частности к низким температурам. Все это явилось основанием для проведения нами работы в этой области. Целью нашего исследования явилось изучение анатомического строения корней, содержание пролина и свободных сахаров у различных по устойчивости сортах озимой пшеницы

Методы

Объектом исследования служила проростки озимой пшеницы различных по устойчивости к различным стрессам двух сортов озимой пшеницы: Мироновская 808 – устойчивый сорт, Немчиновская 24 менее устойчивый, выращенные на водопроводной воде в трех светоизолированных блоках. Первый - белый свет(источник освещения люминисцентные лампы ЛДС-40) второй- синий свет (источник освещения люминисцентные лампы ЛГ-40, область пропускания 420-460 нм), третий блок – красный свет (источник освещениялюминисцентные лампы ЛК-40 , область пропускания 620-640 нм) при 12 часовом фотопериоде. Возраст исследуемых проростков 7-9 дней. Для исследования анатомии корней использовали семи суточные проростки сорта Немчиновская 24, зафиксированные в фиксаторе Чемберлена. Дальнейшая работа по приготовлению препаратов проводилась согласно методике [1]. Готовые препараты изучали с использованием светового микроскопа МБИ-3.Содержание свободного пролина определяли спектрофотометрически по методу [2]. Определение количества растворимых сахаров проводили антронным методом [3]. Биологическая повторность – десятикратная, аналитическая трех, четырехкратная. При оценке различий между вариантами использовался критерий Стьюдента, считая достоверными различия при уровне доверительной вероятности 0.95.

Результаты

При исследовании микротомных срезов корней семисуточных проростков пшеницы в зоне всасывания установлено,что красный свет способствовал образованию боковых корней и лигнификации ксилемы у проростков. У проростков, выращиваемых на синем и белом свету, боковые корни не были обнаружены. По-видимому, красный свет ускоряет морфогенез корней. Такое действие красного света может быть опосредовано повышением активности связанной формы ИУК. Высокое накопление цитокининов и низкая активность ИУК на синем свету тормозит образование боковых корней. Обнаруженная на ранней стадии нами лигнификация ксилемы у проростков с красного света может свидетельствовать об укреплении клеточных стенок, способствуя тем самым защите клеток в случае образования льда в межклетниках [4]. Установлено, что на степень морозоустойчивости растений большое влияние оказывают сахара. Влияние сахаров на повышение морозоустойчивости растений многостороннее. Накопление сахаров предохраняет от замерзания большой объем внутриклеточной воды, заметно уменьшает количество образующегося льда. Сахара защищают белковые соединения от коагуляции [5]. Наибольшее накопление растворимых сахаров наблюдали у растений, выращиваемых на красном свету, а наименьшее было у проростков с синего света. Также было установлено, что накопление свободных сахаров зависит от сорта. Более устойчивый сорт - Мироновская 808 накапливал большее количество сахаров, чем менее устойчивый Немчиновская 24.

В последнее время многими исследователями изучается физиологическая роль пролина [6], [7]. Содержание свободного пролина многократно возрастает в условиях стресса, инициирующего понижение водного потенциала. Не вызывает сомнения, что свободный пролин обладает полифункциональным биологическим эффектом, который проявляется не только в осморегуляторной и протекторной функциях, но также и в антиоксидантной, энергетической и других, обеспечивающих поддержание клеточного гомеостаза и его переход в новое адаптивное состояние [8]. Красный свет в большей мере вызывал увеличение накопления свободного пролина, чем синий участок спектра. Контрольные растения (белый свет) накапливали наименьшее количество свободного пролина.

Заключение

Таким образом, нами было установлено, что красный участок спектра ускоряет морфогенез корней у семи суточных проростков,

способствует лигнификации ксилемы. Под действием красного света наблюдается увеличение в содержании свободных сахаров и пролина, что может быть полезно при действии на растения неблагоприятных условий среды, пониженных температур.

Литература

1. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. - М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
2. Bates L.S et al. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stressed Studies // Plant Soil. - 1973. - V.39. - P.205-207.
3. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений. - Л.:Колос, 1972. – 456 с.
4. Chalker -Scott L. Enviromental significance of anthoceanin in plants stress responses // Photochemistri and Phoobiologi. - 1999. - V.70,№1. - P.1-9.
5. Колупаев Ю.Е., Трунова Т.И. Особенности метаболизма и защитные функции углеводов растений в условиях стресса // Физиология и биохимия растений. - 1992. - Т.24, №6. - С.523-533.
6. Ибрагимова С.С., Колодежная Я.С. и др. Частичная супрессия гена пролиндегидрогеназы увеличивает устойчивость растений к различным видам абиотического стресса // Физиология растений. - 2012. - Т.59, №1.- С.99-107.
7. Гомаа А.М., Ралдугина Г.Н., Бурмистрова Н.А. , Радионов Н.В., Вл.В. Кузнецов Стрессорный ответ трансгенных растений рапса с геном osmyb4 транс-факторного белка риса на действие низкой положительной температуры // Физиология растений. - 2012.- Т.59, №1.- С.118-128.
8. Кунезнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. - 1999. - Т.46. - С.321-336.

Для заметок

Микробиологическая характеристика водных ресурсов минерализованных озер степного Алтая

Т.М. Тронова, О.В. Арсеньева, Н.Г. Клопотова

Томский НИИ курортологии и физиотерапии, г. Томск

Рекреационная и лечебная ценность минерализованных озер степного Алтая выявила необходимость комплексного физико-химического и микробиологического исследования стабильности состояния грязевых месторождений при увеличении курортно-рекреационной нагрузки и активности биологических процессов.

Объектами исследований явились минерализованные озера Алтайского края, представляющие сырьевую лечебную базу для курортологической отрасли региона [1]. Из общего числа исследуемых водоемов наиболее значительны и перспективны озера: Кучукское (181,0 км^2) и Кулундинское (740,0 км^2) Благовещенского района, Большое (66,6 км^2) и Малое (35,2 км^2) Яровое Славгородского района, Мормышанское (Сульфатное) (5,9 км^2) Романовского района. Рапа озер характеризуется двумя основными типами ионно-солевого состава: сульфатно-хлоридная магниево-натриевая и гидрокарбонатно-хлоридная натриевая щелочной реакции среды с повышенным содержанием биологически активных компонентов и значительной активностью микрофлоры.

Микробиологические исследования включали определение санитарно-микробиологических показателей и экологической ситуации в водоемах. Активность микробного ценоза характеризовалась содержанием сапрофитных микроорганизмов и физиологических групп бактерий, участвующих в минерализации белковых, азотистых веществ отмершего планктона, в разложении легкоокисляемых и сложных органических веществ и в круговороте соединений серы. Экспериментально определяли антимикробный эффект рапы озер Кучукское и Малое Яровое в отношении штаммов условно-патогенных микроорганизмов.

Наиболее разнообразная группа микрофлоры, выявленная в озерах, относится к сапрофитным видам микроорганизмов как автохтонного, так и аллохтонного характера, участвующих в круговороте веществ водоемов. Численность сапрофитных аэробов колеблется в данных озерах, причем их содержание увеличено при активной жизнедеятельности жаброногого рачка Artemia Salina, поставляющего при отмирании массу легкоусвояемого органического вещества. Так, при биомассе рачка в озере Кулундинском 2,3-9,0 г/м^3, в озере Большом Яровом 5,3-38,2 г/м^3 [2], количество сапрофитных микроорганизмов достигает соответственно 28 и 41 тыс. микробных клеток на см^3 и способствует самоочищению озер.

Сапрофитная микрофлора представлена, в частности, гнилостными и аммонифицирующими группами бактерий, причем в минерализованных озерах Алтая преобладают процессы аммонификации с выделением аммиака. Содержание бактерий колеблется от 10 до 10^3 микробных клеток на см^3. Среди аммонифицирующих бактерий идентифицированы спороносные и бесспоровые аэробные, факультативно аэробные и анаэробные формы родов *Bacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina* и других.

В рапе интенсивно протекают процессы разложения азотсодержащих соединений сложного нефтяного ряда, углеводородов с участием денитрифицирующих микроорганизмов. Их деятельность поддерживает баланс углекислоты, свободного азота, гидрокарбонат-ионов в соленых озерах. Активность денитрификаторов преобладает в Большом и Малом Яровом, Кучукское, интенсивность развития бактерий 4-5 баллов (по 5-ти бальной системе).

Наиболее существенным признаком биологической активности исследуемых озер является процесс биохимической сульфатредукции, осуществляемый сульфатредуцирующими микроорганизмами при восстановлении сульфатов до сероводорода в присутствии органического вещества. Процесс сульфатредукции отмечен во всех исследуемых водоемах, но активность бактерий в водной массе составляет 3-4 балла в отличие от донных осадков с активностью 4-5 баллов, что связано с анаэробными условиями среды обитания и концентрацией органических веществ. По мнению ряда авторов в минерализованных озерах преобладают галофильные представители сульфатредуцирующих бактерий, обитающих в широких пределах солевой концентрации [3; 4], что характерно для исследуемых озер.

Использование минерализованных сульфидных озер в курортно-рекреационных целях требует самого пристального внимания за их санитарно-микробиологическим состоянием, тем более, что в последнее время выявлено техногенное и антропогенное загрязнение эксплуатируемых и перспективных месторождений, вызывающее глубокие и необратимые процессы ухудшения бальнеологических показателей озер [2].

Санитарно-микробиологические показатели и экологическая ситуация определены согласно СаНПиН 2.1.5.980-00 и методическим рекомендациям №96/1996[5,6]. Анализ рапы, проведенный нами, показал соответствие нормативам показателей общего микробного числа, количества

общих колиформных бактерий, отсутствие патогенных колиформ и синегнойной палочки во всех водоемах, кроме показателей колиформ в летний сезон значительной антропогенной нагрузки на озере Большое Яровое. В целом экологическая ситуация на озерах удовлетворительная, присутствие некондиционных проб не превышает пяти процентов. Следует обратить особое внимание на озеро Большое Яровое и Кучукское и на экологическую обстановку выделенных участков эксплуатации водоемов в рекреационных целях.

Для подтверждения биологической активности рапы озер Малое Яровое и Кучукское дополнительно к исследованиям физико-химического состава и микробного ценоза были проведены эксперименты по выявлению антимикробной активности в отношении штаммов условно-патогенных культур *Esherichia coli* №739, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus* № 209, Proteus vulgaris. Результаты оценивались по диаметру стерильной зоны лизиса, выраженной в отношении ЕД пенициллина [7]. Эксперимент показал среднюю степень выраженности антимикробного эффекта в отношении грамположительных культур стафилококков с зоной лизиса от 0,8 до 10 мм, в соответствии с ЕД дозами пенициллина от 7,6 до 15,2 единиц и отсутствие активности в отношении кишечной палочки и протея вульгарного рапы озер Малое Яровое и Кучукское.

Таким образом, исследования показали активность микробиологических процессов рапы высокоминерализованных водоемов Алтая по преобразованию органических веществ и минеральных соединений и обогащению рапы бальнеологически активными веществами.

Санитарно-микробиологическое состояние рапы озер, в основном, соответствует нормативным требованиям для курортно-рекреационного использования, но принимая во внимание увеличивающуюся антропогенную нагрузку на водоемы, необходим строгий контроль за экологическим благополучием рекреационных озер.

Литература

1. Курортно-рекреационный потенциал Западной Сибири./Под ред Е. Ф. Левицкого, В. Б. Адилова. –Томск, 2002. – 227 с.

2. Оценка современного экологического состояния озер Алтайского края по биогеохимическим критериям [Электронный журнал. Исследовано в России]. –Леонова Г. А., 2008. – 20 с.

3. Новожилова М. И., Фролова Л. Ф. Микрофлора лечебных грязей Казахстана. –Алма-Ата: Наука, 1975. – 181 с.

4. Леонов А. В., Чичерина О. В. Сульфатредукция в водоемах//Водные ресурсы: Наука 2008. – том 35. -№4.-С. 417-434.

СаНПиН 2.1.5.980-00. Гигиенические требования к охране поверхностных вод.М., 2000. -23 с.

5. Методические рекомендации по микробиологическому исследованию лечебных минеральных вод/Сост. К. А. Максимович, С. И. Николенко. Одесса, 1984. – 22 с.

6. Требования к горно-санитарной охране месторождений минеральных вод и лечебных грязей. Методические рекомендации МЗ РФ №96/1996/Сост. В. Б. Адилов, А. В. Дубовской и др. М., 1997. – 19 с.

Для заметок

О возможности совместного использования микроорганизмов и микроэлементов для регулирования роста и развития саженцев винограда

С.Г. Великсар, Н.Б. Леманова, С.И. Тома, В.Д. Балан

Институт генетики и физиологии растений Академии наук РМ, г. Кишинэу, Молдова

Введение

Успешное развитие отрасли многолетних насаждений (садоводство, виноградарство) невозможно без питомниководства и производства высококачественных саженцев высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным условиям окружающей среды сортов. Современные технологии производства посадочного материала должны быть дополнены новыми звеньями, новыми процессами, которые будут способствовать значительному улучшению качества и количества посадочного материала. Для этого важны два момента: обеспечить формирующимся саженцам оптимальный режим питания без применения высоких доз удобрения, влагу и защиту от вредителей и болезней.

Наиболее перспективным направлением в совершенствовании существующих технологий в питомниководстве и улучшении качества посадочного материала является на наш взгляд комплексное использование микроэлементов и биотехнологических продуктов.

Основная задача представленных результатов трехлетних исследований: показать возможность использования комплекса микроэлементов Микроком-В, разработанного специально для применения в виноградарстве, а также продуктов жизнедеятельности определенных микроорганизмов с целью повышения качества и количества посадочного материала и снижения химической нагрузки на окружающую среду.

Материалы и методы

Исследования были проведены в 2010-2012 годах. Объектом исследований служили семена 3 сортов винограда: районированные сорта Молдова и Кеща и новый гибридный сорт, полученный от скрещивания сортов Молдова х Мадлен Анжевин, а также укорененные саженцы. Семена перед посевом замачивали на 3 часа в суспензии микроорганизмов. Контролем служили семена, замоченные в воде. Суспензии 2 штаммов бактерий *Azotobacter chroococcum* и *Pseudomonas fluorescens*, выращенных на жидкой питательной среде в течение 24 часов при 27˚С, вносили в почву при высадке семян или посадке саженцев в почву. Для некорневой подкормки саженцев в процессе вегетации использовали метаболиты - продукты микроорганизмов, полученные в результате центрифугирования концентрированных суспензий при 8000 об / мин в течение 20 минут. Растения обрабатывали метаболитами микроорганизмов отдельно и вместе с комплексом микроэлементов Микроком-В в половинной дозе трехкратно. Учет степени прорастания семян проводили в динамике в течение 2 месяцев.

Анализ полученных результатов

Виноград размножают главным образом вегетативным путем. Но иногда для этого используют и семена, особенно в селекции, при создании новых сортов. Семена винограда, как и многие другие многолетние растения, имеют низкую энергию прорастания. Для улучшения прорастания и последующего роста сеянцев требуется разработка новых методов подготовки. Известно, что создание так называемых микробных биотехнологий является одним из основных направлений современного сельского хозяйства [1-3]. Созданы различные полифункциональные композиции для применения в растениеводстве [4-5]. В то же время практически отсутствуют данные о применении микроорганизмов в питомниководстве.

Мы изучили влияние суспензии двух штаммов микроорганизмов *Azotobacter chroococcum* и *Pseudomonas fluorescens* на прорастание семян трех сортов винограда - два районированных сорта Молдова и Кеша и гибридный сорт Молдова х Мадлен Анжевин. Данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют о существенном влиянии как комплекса микроэлементов, так и микроорганизмов на степень прорастания семян. Для гибридного сорта наилучший результат был получен после обработки семян суспензией *Pseudomonas fluorescens* (285, 4% по сравнению с контролем и 108,3% по сравнению с вариантом с замачивания семян раствором микроэлементов Микроком-В). Прорастание семян районированных сортов происходило интенсивнее под влиянием штамма *Azotobacter chroococcum* (сорт Молдова) или *Azotobacter chroococcum+ Pseudomonas fluorescens* (сорт Кеша).

Сеянцы в вариантах с микроорганизмами отличались от контрольных более интенсивным ростом на протяжении всего периода вегетации. В конце вегетации средняя длина побегов сеянцев варианта с *Pseudomonas fluorescens* была 72,9 см, что составляет 215,7% по сравнению с контрольным вариантом. Диаметр основного побега составил 180,0% по сравнению с контролем. Такое интенсивное развитие сеянцев свидетельствует о более высокой жизнеспособности посадочного материала. Механизм действия данных штаммов микроорганизмов можно объяснить тем, что бактерии образуют в ризосфере благоприятный микробиологический фон, который

инактивирует развитие патогенных грибов, синтезирует биологически активные вещества, ускоряет прорастание семян.

Таблица 1 - Влияние суспензии микроорганизмов и комплекса микроэлементов на прорастание семян винограда

Варианты/сорта	Гибрид Молдова х Мадлен Анжевин			Молдова		
	Прорастание семян, %	Средняя длина побега,см	Диаметр побега, см	Прорастание семян, %	Средняя длина побега, см	Диаметр побега, см
Контроль	26	33,8	0,10	3,3	29,0	0,2
Обработка семян комп-лексом Микроком-В	68,5	35,8	0,12	7,1	25,8	0,23
Обработка семян *Pseudomonas fluorescens*	74,2	72,9	0,18	8,6	37,2	0,27
Обработка семян *Azotobacter chroococcum*	71,4	42,1	0,15	16,6	25,8	0,30

Таблица 2 - Влияние суспензии микроорганизмов и комплекса микроэлементов на рост и развитие саженцев винограда, сорт Презентабельный, вегетационный комплекс, 06.08.2012

	Средняя длина корней, см	Средняя длина побегов, см	% по сравнению с контролем	
			корни	побеги
Контроль	246.75±53.87	26.62±2.98	100	100
Суспензия микроорганизмов *Pseudomonas fl.+Azotobacter ch.* в почву	448.5±59.43	33.00±4.23	181.94	123.96
Суспензия микроор. *Pseudomonas fl.+Azotobacter ch.* в почву + Микроком В 0,5 дозы некорнев.	358.12±30.26	34.12±2.67	145.13	128.17
Некорневая подк. метаболитами микрорган. *Pseudomonas auref.+ Azotobacter ch.*	387.5±47.88	41.12±7.39	157.04	154.47
Некорневая подк. метаболитами микрорган. *Pseudomonas auref.+ Azotobacter ch.* .+ Микроком В 0,5	459.62±24.22	35.06±4.17	186.26	131.70

Основные показатели качества саженцев – это развитие корневой системы, рост и вызревание однолетних побегов. Мы исследовали влияние микроорганизмов и микроэлементов на развитие укорененных саженцев винограда в контролируемых условиях в вегетационном комплексе и в виноградном питомнике (сорт винограда Презентабельный). Суспензия двух штаммов микроорганизмов была внесена в почву при высадке саженцев, а метаболиты микроорганизмов и комплекс микроэлементов применяли в виде некорневой подкормки трижды с интервалом в 3 недели.

Анализ полученных данных (таблица 2) показывает, что во всех вариантах с применением микроорганизмов и микроэлементов рост побегов и корней саженцев винограда был более интенсивным по сравнению с контрольными растениями. При этом, наиболее выражен ростостимулирующий эффект суспензии и метаболитов микроорганизмов на развитии корневой системы. Совместное использование сниженных доз комплекса микроэлементов и метаболитов микроорганизмов в наибольшей степени стимулировано рост и развитие корневой системы (186.26 % по сравнению с растениями контрольного варианта). Важно также то, что на этих саженцах более интенсивно развиваются мелкие питающие корни. Надземная часть саженцев во всех вариантах, где
были использованы корневые и некорневые подкормки, была развита лучше, чем в контрольном варианте. Наибольший прирост побегов отмечен при некорневой подкормке растений метаболитами микроорганизмов отдельно и совместно с микроэлементами.

Заключение

Бактеризация семян винограда суспензией микроорганизмов *Pseudomonas fluorescens* (для гибридных семян, полученных в результате скрещивания) и *Azotobacter chroococcum* (для семян стандартных сортов) способствует повышению энергии прорастания семян, усилению роста и развития сеянцев.

Установлена возможность совместного применения суспензии или метаболитов сапрофитных микроорганизмов и комплекса микроэлементов для улучшения роста и развития саженцев винограда. Внесение в почву суспензий микроорганизмов и некорневая подкормка саженцев метаболитами микроорганизмов и микроэлементами положительно влияет на рост корней и побегов, что очень ценно для повышения количества и качества посадочного материала.

Использование метаболитов микроорганизмов дает возможность в два раза снизить суммарное количество микроэлементов в комплексе

Микроком В при выращивании саженцев, что снижает возможное загрязнение окружающей среды за счет снижения количества применяемых химических удобрений

Литература

1. Salantur A., Ozturk A., Akten S. Growth and yield response of spring wheat to inoculation with rhizobacteria // Plant Soil and Environment. – 2006. – V. 52, № 3. – P. 111-118.
2. Lütfi Pırlak and Murat Köse. Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Yield and Some Fruit Properties of Strawberry // Journal of Plant Nutrition. - 2009. – V. 232, № 7. – P. 1173 - 1184.
3. Кириченко Е., Титова Л., Коць С. Эффективность бактеризации семян пшеницы яровой новым штаммом *Azotobacter chroococcum* E79 // Ştiinţa agricola. - 2010. - №1. – P. 21-24.
4. Анисимова О.С., Бойкова И.В. Новые биопрепараты для защиты растений в защищеннов грунте // ИБ ВПРС МОББ. – 2009. – Т.40. – С. 124-125.
5. Филипчук О.Д. Фитосанитарная оптимизация агроценоза // ИБ ВПРС МОББ. – 2009. - №39. – С.227.

Для заметок

Особенности аккумуляции наночастиц платины органами проростков пшеницы и гороха в зависимости от специфики субстрата

Т.П. Астафурова, Г.В. Боровикова, А.П. Зотикова, Г.С. Верхотурова, В.М. Постовалова
Томский государственный университет, г. Томск

В настоящее время установлено, что наночувствительность растений зависит от их способности поглощать и аккумулировать наночастицы разных форм и размеров, разной активности и концентрации [1, 2]. И если поглощение наночастиц (в частности оксида меди), как показано в недавних исследованиях для растений риса, в ранний период развития связано с первоначальным резервированием их в корнях, затем, по сосудам ксилемы, с последующим распределением в разных органах растений, то на завершающей стадии развития наночастицы концентрируются в семенах будущего урожая [3]. Поэтому вопрос о токсичности наночастиц вызывает особую тревогу и обеспокоенность, так как именно растения являются основанием «пищевой пирамиды» на нашей планете, и изучение их круговорота в природе, сохранение оптимальной экологии полноценной «пищевой цепочки», включая человека, является актуальной задачей современной науки [4].

Цель данной работы – количественно оценить аккумуляционные возможности корневой системы и надземной части у 10-дневных проростков пшеницы и гороха из разных субстратов – дисперсной системы (ДС), содержащей наночастицы в концентрации 10 мг/л, и из почвенного субстрата (при поливе ДС), с одновременным морфометрическим анализом влияния наночастиц на их рост и развитие.

Объектами исследования служили растения: пшеница мягкая яровая, *Triticum aestivum* L., сорт Новосибирская 29 и горох посевной, *Pisum sativum* L., сорт Ямальский. Для каждого вида закладывали 4 повторности: для пшеницы каждая по 25 штук семян и для гороха – по 15 штук. Семена предварительно проращивали течение 2 – 3 дней по стандартной методике, смачивая дистиллированной водой (контроль) или ДС наночастиц платины (опыт). Для водных культур контрольные образцы семян раскладывали на вегетационные сосуды с дистиллированной водой объемом 500 мл, а опытные образцы – на сосуды, заполненные ДС наночастиц платины в тех же объемах. Для почвенных культур проросшие семена помещали в сосуды с грунтом «Гарант», объемом 500 мл, содержащим стандартный набор макро и микроэлементов, и поливали дистиллированной водой (контроль) или ДС (опыт). В конечном итоге объем растворов составлял 500 мл. Контрольные и опытные культуры выращивали в климатической камере при постоянной температуре 23 – 24^0 С, освещенности 40 Вт/м^2.и длительности фотопериода 12 часов. Рост и развитие 10-дневных растений пшеницы и гороха на разных субстратах в присутствии наночастиц платины оценивали по морфометрическим (длина корней, высота проростков) и весовым показателям (общая масса растений, масса корней и надземной части в одном сосуде).

Наночастицы металлической платины сферической формы диаметром от 1,5 до 25 нм, размером Δ_{50}=5 нм и удельной поверхностью 30 м^2/г получали методами лазерной абляции в дистиллированной воде из брусков платины высокой степени чистоты (99,97%). Стабильность наночастиц в наноразмерном состоянии сохранялась в течение 40 дней [5]. Содержание наночастиц определяли в гомогенатах корней и надземной части растений методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica 8.

Как показали масс-спектрометрические исследования проб биологического материала, содержание наночастиц в корнях и надземной части контрольных растений находилось на пределе обнаружения метода. Количественное определение наночастиц у 10-дневных проростков пшеницы и гороха показало, что их накопление как в водных, так и почвенных культурах распределяется неравномерно: в основном они аккумулируются корнями, в меньшей степени – надземной частью проростков (табл. 1). Накопление наночастиц в корнях растений пшеницы и гороха водной культуры намного больше, чем у проростков почвенной культуры. Если разница в аккумуляции наночастиц в корнях и надземной части почвенной культуры у растений пшеницы составила 8-кратное увеличение и почти 4-кратное – у проростков гороха, то у растений водной культуры накопление наночастиц в корнях этих растений почти в 100 раз превышало их количество в стеблях и листьях. По-видимому, большое значение в формировании такого резкого концентрационного градиента наночастиц имеет узел кущения, который, как известно, находится на границе корень – стебель и. выполняет функции мощного физиологического барьера. Использование водной культуры как модельного инструмента позволяет оценить не только адаптационные резервы растущего организма, но и ту уникальную роль, которую играет узел кущения в развитии растений в условиях стресса. В данном случае наряду с другими возможными регуляторными механизмами,

в том числе и гормональными, он способствует значительному ограничению поступления наночастиц в вегетирующую часть растений в ранний период их развития.

Таблица 1 – Количество аккумулированных наночастиц платины (мкг/г сырой ткани) в корнях и надземной части растений

Вид растения	Водные культуры		Почвенные культуры	
	Корни	Надземная часть	Корни	Надземная часть
Пшеница	42,96 ± 8,69	0,44 ± 0,08	0,81 ± 1,16	0,10 ± 0,02
Горох	35,76 ±7,15	0,29 ± 0,06	1,38 ± 0,27	0,36 ± 0,07

Значительное накопление наночастиц в корнях проростков пшеницы водной культуры сопровождалось увеличением длины корней и их общей массы, что свидетельствует о стимулировании метаболических и ростовых процессов (табл. 2). Меньшее накопление наночастиц платины в зеленых органах этих же проростков, хотя и способствовало повышению их общей массы, но интенсивность ростовых процессов не отличалась от контроля (табл. 2).

Таблица 2 – Ростовые и весовые параметры растений в условиях культивации на дисперсной среде и почвенном субстрате

Вид растения	Вариант опыта	Длина корня, см	Высота проростка, см	Общая масса растений в сосуде, мг	
				Корневая система	Надземная часть
Водная культура					
Пшеница	Контроль	6,7 ± 0,28	16,3 ± 0,85	531,8 ± 26.1	1958,2 ± 53,6
	Pt	*9,2 ± 0,72	17,9 ± 0,87	*692,3 ± 29,3	*2209,5 ± 64,5
Горох	Контроль	5,5 ± 0,23	5,00 ± 0,22	2216,2 ± 71,4	1993,6 ± 61,6
	Pt	*10,9 ± 0,88	*8,00 ± 0,46	*3826,4 ± 126,7	*2817,4 ± 119,8
Почвенная культура					
Пшеница	Контроль	13,8 ± 1,18	25,0 ± 2,1	1159,2 ± 32,4	4274,8 ± 60,2
	Pt	14,1 ± 1,32	24,4 ± 1,9	1273,1 ± 34,7	4247,5 ± 61,4
Горох	Контроль	9,0 ± 0,62	9,1 ± 0,85	1627,8 ± 42,4	4505,3 ± 65,3
	Pt	9,7 ± 0,92	8,2 ± 0,67	*1833,5 ± 51,2	*4225,6 ± 58,8

Примечание: знаком * отмечены достоверные различия при $p<0,05$

У 10-дневных растений водной культуры гороха высокая разница в распределении наночастиц не отразилась на активности ростовых процессов в этих органах: в корнях и зеленой части растений гороха в равной степени отмечалось увеличение и длины корней, и высоты проростков, и общей массы растений (табл. 2).

У проростков пшеницы, выращенных на почвенном субстрате, несмотря на присутствие наночастиц и в корнях (в большей степени), и в надземной части, не наблюдалось изменений ни ростовых, ни весовых параметров по сравнению с контролем (табл. 2). Аналогичное распределение наночастиц наблюдалось и у растений гороха, но в концентрационном накоплении оно несколько выше, чем у растений пшеницы. Аккумулированные наночастицы не повлияли на величину роста корней и проростков почвенной культуры гороха, но способствовали развитию более мощной корневой системы, однако увеличение массы корней сопровождалось одновременным снижением прироста массы надземной части (табл. 2).

Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что абсорбция наночастиц зависит от структуры субстрата: она минимальна в почве, несколько возрастает в песке и в большей степени проявляется в водных растворах [1]. Действительно, корни водных культур находятся в постоянном контакте с дисперсной системой, и доступность наночастиц максимальна. Значительно меньшее всасывание наночастиц в почвенные культуры связано, вероятно, не только с тем, что дисперсная система поступала дозировано, но и с тем, что наночастицы платины, несмотря на их высокую каталитическую активность, находятся в конкурентных отношениях с разнообразными питательными компонентами почвы, которые активно всасываются и усваиваются организмом: почвенные культуры пшеницы и гороха растут и набирают массу почти в 2 раза активнее, чем проростки водных культур (табл. 2).

На основании полученных данных можно отметить, что процессы всасывания и накопления наночастиц платины в проростках пшеницы и гороха протекают наиболее интенсивно из дисперсной среды, чем из почвы. Корневая система в большей степени, особенно, у водных культур, аккумулирует наночастицы, чем листья и стебель. Но сравнивая особенности их накопления, можно отметить, что у пшеницы водной культуры в большей степени выражена аккумулирующая способность, чем у растений гороха, а пшеница почвенной культуры, наоборот, с меньшей интенсивностью накапливала наночастицы платины, чем проростки гороха на этом же субстрате.

Морфометрические данные свидетельствуют о неоднозначности влияния концентрационного накопления наночастиц на процессы роста и развития. У водных культур пшеницы и гороха значительное накопление способствовало стимулированию роста корней и надземной части. Почвенная культура пшеницы по морфометрическим показателям оказалась индифферентной к накопленному уровню наночастиц, а у растений гороха, выращенных на почвенном субстрате, наблюдалось ингибирование прироста общей массы проростков, но стимулирование прироста общей массы корней.

Таким образом, полученные данные позволяют говорить о специфике поглощения и аккумуляции наночастиц платины на уровне субстрата, вида и органов растений, а также о некоторых особенностях их концентрационного влияния на ростовые процессы в проростках пшеницы и гороха.

Литература

1. Zhu H., Han J., Xiao J.Q, Jin Y. Uptake, translocation and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants // J. Environ. Monitoring. - 2008.- № 10. - P. 713–717.

2. Ma Singmao, Geiser-Lee Jane, Deng Yang, Kolmakov Andrei. Interaction between engineered nanoparticles (ENP_S) // Science of the total environment. – 2010. - № 408. – P. 3053–3061.

3. Wang Zhenyu, Xie Xiaoyan, Zhao Jian et al. Xylem- and Phloem-Based Transport of CuO Nanoparticles in Maize (Zea mays L.) // Environ. Sci. Technol. – 2012. - № 46 (8). - P. 4434–4441.

4. Моргалёв Ю.Н., Хоч Н.С., Моргалёва Т.Г. и др. Биотестирование наноматериалов: о возможности транслокации наночастиц в пищевые сети // Российские нанотехнологии. - 2010. - Т. 5, № 11–12. - С. 131–135.

5. Светличный В.А., Изаак Т.И., Бабкина О.В., Шабалина А.В. Синтез наночастиц металлов при лазерной абляции твердых тел в жидкостях наносекундным излучением 2-й гармоники Nd-YAG лазера // Известия ВУЗов. Физика. - 2009. - Т. 52, № 12/2. - С. 110–115.

Для заметок

Особенности морфогенных процессов трансгенных растений табака под действием верапамила на ранних этапах онтогенеза

Е.С. Гвоздева[1], Е.Д. Данилова[1], Л.В. Коломейчук[1], Е.В. Дейнеко[1,2], Р.А. Карначук[1]

[1]Томский государственный университет, г. Томск
[2]Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

По современным представлениям восприятие и передача сигналов окружающей среды и проявление ответной реакции в растительных организмах реализуются через системы многочисленных рецепторов и вторичных посредников [1, 2]. В качестве мессенджеров при передаче сигналов наряду с фитогормонами выступают ионы Ca^{2+}, т.к. являются одними из наиболее важных элементов в системе внутриклеточной сигнализации и необходимы на всех этапах онтогенеза растительного организма [1, 3]. Это объясняется тем, что концентрационный градиент ионов кальция между внутриклеточным и внеклеточным содержимым составляет 3-4 порядка и превышает градиенты других ионов.

Показано, что ионы Ca^{2+}, в качестве вторичного посредника, участвуют в регуляции процессов роста и дифференцировки, фотоморфогенеза и эмбриогенеза растений [4], реакции гравитропизма и фототропизма [5], рецепции красного и синего света [6, 7], в адаптации растительных организмов к различным стрессовым воздействиям [8], является основным элементом в трансдукции гормональных сигналов: гиббереллловой, абсцизовой, индолилуксусной кислот и цитокининов [9-11], а также прямо или косвенно влияют на активность транскрипционных факторов и экспрессию генов [12].

Генетическая трансформация растений позволяет целенаправленно модифицировать растительные геномы путем переноса целевых генов, определяющих те или иные хозяйственно-ценные признаки, однако интеграция в геном фрагментов экзогенной ДНК в некоторых случаях может влиять и на экспрессию множества других генов, контролирующих рост и развитие растений. Это мало изученная область физиологии, поэтому исследование морфогенеза трансгенных растений позволяет понять, как изменяются основные ростовые реакции в ответ на действие внешних факторов.

Представляло интерес проанализировать возможные изменения в функционировании сигнальных систем у генетически модифицированных растений, поскольку Т-ДНК-инсерции могут быть интегрированы в районы расположения генов, контролирующих эти сложные физиологические процессы.

В качестве объектов исследования были взяты растения табака *Nicotiana tabacum* L. sv. Petit Havana исходной родительской линии SR1 (контроль) и трех трансгенных моноинсерционных линий IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3, полученных методом агробактериальной трансформации растений табака линии SR1 с применением генетической конструкции, включающей ген интерлейкина-18 человека (*IL*-18), маркерный ген *npt*II и репортерный ген *uidA* в плазмиде pBi101-IL18 [13].

Растения трансгенных линий гомозиготны. Линии IL18№7 и IL18№28 отличаются друг от друга локусом встройки генетической конструкции. Линия IL18№7 представлена потомками T_2, полученными от самоопыления исходного растения и последовательного отбора канамицин-устойчивых растений на селективной среде. T_2-растения линии IL18№7 обозначены как IL18№7-1 и IL18№7-11, а линии IL18№28 – как IL18№28-3.

В задачи исследования входило изучить влияние различных концентраций верапамила на скотоморфогенез проростков *Nicotiana tabacum* L. исходной линии SR1 и линий трансгенного типа IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3.

Растения выращивали на безгормональной агаризованной среде MS [14] в темноте на протяжении 7 суток без и с добавлением 0,1; 0,25, 0,5 мМ верапамила.

Верапамил относится к группе блокаторов "медленных" внешних Ca^{2+}-каналов, локализованных на плазматической мембране, широко используется для изучения механизма регуляции кальциевой сигнальной системы в клетках растений [5, 15]. Верапамил уменьшает концентрацию ионов Ca^{2+} в цитоплазме.

После фиксации проростков табака в 70 % этаноле определяли площадь семядольных листьев с помощью микроскопа "БИОЛАМ" Р2У42 (150×) окулярного и объективного микрометров, длину гипокотилей и корней измеряли под бинокулярной лупой БМ-51-2 (8,75×).

Ростовые параметры определяли для 200 растений в каждом варианте. Статистическую обработку и построение диаграмм проводили с помощью электронных таблиц «MS Excel 2003» и прикладного пакета StatSoft, вычисляя среднее арифметическое (X) анализируемых параметров, стандартное отклонение (y), стандартную ошибку (SE) и двухсторонний интервал (d) для средних значений всех исследованных переменных. Выборки имели нормальное распределение, для определения

достоверности данных использовали параметрический критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p<0,05$. На диаграммах представлены данные в виде средних арифметических с доверительными интервалами.

В контрольном варианте без верапамила относительно исходной линии SR1 длина гипокотиля была меньше у проростков трансгенных линий: IL18№7-1 и IL18№ 7-11 - в 1,1 раза, а IL18№28-3 – в 1,4 раза (Рис. 1а). Площадь семядолей и длина корня проростков табака линии IL18№28-3 не отличалась от таковых параметров родительской линии SR1, тогда как у линий IL18№7-1 и IL18№7-11 эти показатели были меньше в 1,3 раза (Рис. 1б, в).

Внесение верапамила в концентрации 0,1 мМ практически не повлияло на рост гипокотиля и семядольных листьев, но оказало ингибирующее действие на удлинение корня у всех исследуемых линий табака. Наиболее чувствительной оказалась линия IL18№28-3, у проростков зафиксировали уменьшение длины корня в 1,33 раза (для сравнения: у SR1 – в 1,28 раз, у IL18№7-1 и IL18№7-11 – в 1,26 раз). Отмеченные отличия в чувствительности разных частей проростков табака к верапамилу можно объяснить неравномерным распределением Ca^{2+} в растении: как правило, в корневой системе его меньше, чем в надземной части [16].

Верапамил в концентрации 0,25 мМ тормозил рост гипокотиля как у трансгенных проростков табака, так и у нетрансгенных. Наиболее сильно данный эффект проявился у линий IL18№7-1 и IL18№ 7-11 - в 1,64 раза (у линии IL18№28-3 – в 1,57 раз, у линии SR1 – в 1,45 раз). Также отмечали ингибирование роста корня у всех исследуемых линий, но наиболее чувствительной оказалась развивающаяся корневая система линии SR1 (снижение роста - в 1,7 раза). Данная концентрация верапамила способствовала увеличению площади семядолей у всех четырех линий линии. Максимальные значения площади были определены у линий IL18№7-1 и IL18№7-11.

Увеличение концентрации верапамила в питательной среде до 0,5 мМ еще сильнее угнетало рост гипокотиля и корня всех линий, но в этом случае наибольшее ингибирующее действие наблюдали у трансгенных проростков линий IL18№7-1 и IL18№ 7-11. Повышение концентрации верапамила отразилось и на приросте площади семядолей: относительно контрольных вариантов (без верапамила) отмечали прирост площади семядольных листьев у линий IL18№7-1 и IL18№7-11 и SR1 (хотя и не такой активный, как с 0,25 мМ верапамила), но у линии IL18№28-3 рост уменьшился на 6,4 % от контрольной величины.

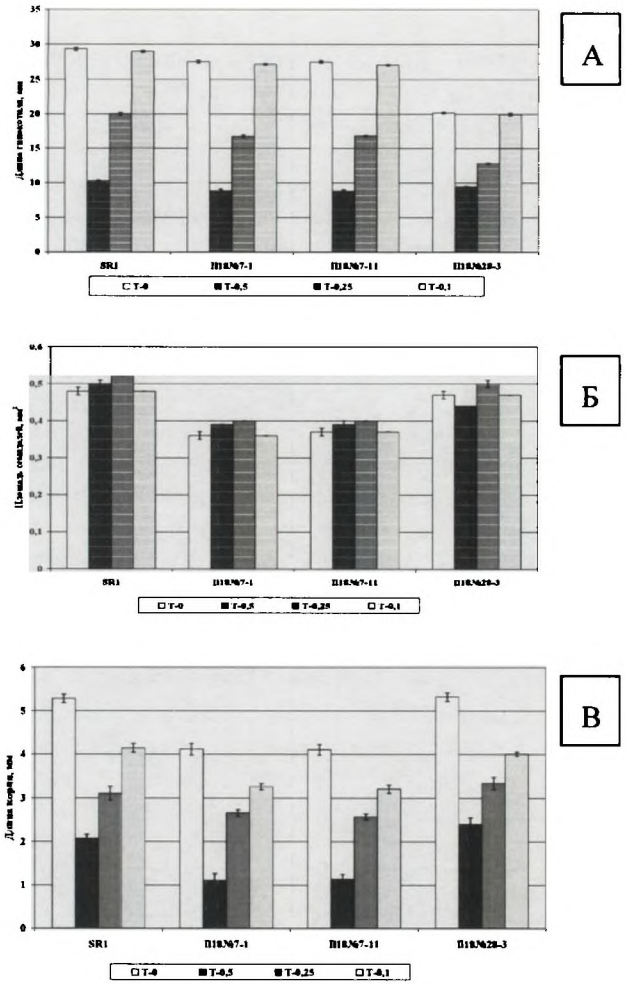


Рисунок 1 - Длина гипокотиля (А), площадь семядольных листьев (Б) и длина корня (В) 7-дневных проростков табака исходной родительской SR1 и трансгенных IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3 линий, выращенных в условиях темноты без верапамила (Т-0) и с добавлением верапамила в концентрации 0,1 (Т-0,1), 0,25 (Т-0,25) и 0,5 (Т-0,5) мМ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у исследуемых линий трансгенных растений табака может быть нарушено функционирование Ca^{2+}-сигнальной системы, регулирующей рост на ранней стадии скотоморфогенеза.

Необходимо отметить сходство по площади семядольных листьев, длине гипокотиля и корня внутри каждой независимой линии IL18№7-1 и IL18№7-11, что позволяет говорить об отсутствии сомаклональной вариабельности у исследуемых трансгенных растений табака.

Выявленные отличительные особенности скотоморфогенеза трансгенных линий IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3 под влиянием верапамила предположительно можно объяснить несколькими причинами.

Во-первых, это может быть связано с возможностью изменения экспрессии собственных генов проростков табака. Подобные изменения происходят в результате интеграции трансгена в район расположения собственных генов растения-хозяина, что приводит к нарушению согласованной координации отработанных механизмов и, как следствие, к разнообразным изменениям физиологических функций генетически модифицированных растений [17.].

Во-вторых, может быть сопряжено с изменением фитогормонального статуса (в предыдущих исследованиях нами было показано, что на ранних стадиях онтогенеза этиолированные проростки исходной линии SR1 и трансгенной линии IL18№7-1 существенно отличаются по количественному содержанию рибозид зеатина, индолилуксусной и абсцизовой кислот [18, 19]).

Литература

1. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. - 294 с.
2. Генетика развития растений /Л.А. Лутова, Т.А. Ежова, И.Е. Додуева, М.А. Осипова; ред. С.Г. Инге-Вечтомов. – 2-е изд. перераб. и доп. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. – 432 с.
3. Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система у растений // Физиология растений. - 2005. - Т. 52. № 2. - С. 282-305.
4. Медведев С.С. Полярность и эмбриогенез растений // Эмбриология цветковых растений. Т. 2 / Под ред. Т.Б. Батыгиной. СПб.: Мир и семья. 1997. - С. 594-601.
5. Мешкаускас А., Максимов Г. Участие кальциевых каналов в фитохром-зависимой регуляции гравитропической реакции // Физиология растений. - 2001. - Т. 48. №2. - С. 268-275.
6. Shacklock P.S., Read N.D., Trewavas A.J. Cytolic Free Calcium Mediates Red Light Induced Photomorphogenesis // Nature. - 1992. - V. 358. - P. 153-155.
7. Baum G., Long J.C., Jenkins G.I., Trewavas A.J. Stimulation of the Blue Light Receptor NPH1 Causes a Transient Increase in Cytosolic Ca^{2+} // Proc. Natl. Acad. Sci USA. - 1999. - Vol. 96. - P. 13554-13559.
8. Knight H. Calcium Signalling during Abiotic Stress in Plants // Int. Rev. Cytol. - 2000. - V. 195. - P. 269-234.
9. Gilroy S.G., Jones R.L. Gibberellic Acid and Abscisic Acid Coordinately Regulate Cytoplasmic Calcium and Secretory Activity in Barley Aleurone Protoplasts // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1992. - V. 89. - P. 3591-3595.
10. Медведев С.С., Батов А.Ю., Мошков А.В., Маркова И.В. Роль ионных каналов в трансдукции ауксинового сигнала // Физиология растений. - 1999. - Т. 46. № 5. - С. 620-625.
11. Romanov G.A., Kieber J.J., Schmulling T. A Rapid Cytokinin Response Assay in Rapid Amaranthus Seedlings Test // Plant Growth Regul. - 2000. - V. 32. - P. 337-344.
12. Kim M.C., Chung W.S., Yun D.-J., Cho M.J. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants // Molecular Plant. - 2009. - Vol. 2. - P. 13-21.
13. Турчинович А.А., Загорская А.А., Филипенко М.Л., Сенников С.Н., Козлов В.А., Шумный В.К., Дейнеко Е.В. Получение трансгенных растений табака – продуцентов интерлейкина-18 человека // Доклады РАН. - 2004. - Т. 395. - С. 704-707.
14. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. //Physiology Plant. - 1962. - V. 15. - P. 473–497.
15. Budagovskaya N.V., Guliaev V.I. Effect of calcium channel blocker on growth dynamics of plants // Plant Nutrition: Food Security and Sustainability of Agro-Ecosystems. / Horst W.J., Schenk M.K., Bürkert A., Claassen ... Wittenmayer L. (Eds). Academic Publishers, The Netherlands, 2001. - P. 204-205.
16. Trewavas A.J., Malho R. Signalling in plant cells: the big network. // Curr. Opin. Plant Biol. - 1998. - V. 1. - P. 428-433.
17. Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Шумный В.К. Т-ДНК-индуцированные мутации у трансгенных растений. // Генетика. - 2007. - Т. 43. №1. - С. 5-17.
18. Гвоздева Е.С., Карначук Р.А., Дейнеко Е.В. Фотоморфогенез трансгенных растений табака на ранних этапах онтогенеза // Ноосферные знания и технологии: Сб. трудов / Под ред. Проф. Г.В. Майера. Томск: Изд-во НЛТ, 2006. - Вып. 2. - С. 47-50.
19. Карначук Р.А., Гвоздева Е.С., Ефимова М.В. Световая регуляция морфогенеза растений табака, трансформированных геном интерлейкина-18 человека // Физиология растений. - 2008. - Т. 55. № 4. - С. 560-564

Получение клеточной суспензионной культуры трансгенного табака *Nicotiana tabacum* L., содержащего ген *uidA*, для создания на ее основе биопродуцентов рекомбинантных белков

Е.С. Гвоздева[1], М.В. Дочупайлова[1], Е.В. Дейнеко[1,2]

[1]Томский государственный университет, г. Томск
[2]Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

К настоящему времени разработаны технологии получения генетически модифицированных (трансгенных) растений, в геном которых встроены гены, кодирующие различные белки для медицинских целей, в том числе и белки человека. Такие технологии основаны на прямом или векторном переносе целевых генов в ядерный геном растения. За последнее десятилетие получены десятки видов трансгенных растений, в геном которых перенесены гены антигенов различных возбудителей инфекционных заболеваний, разнообразных терапевтических белков, моноклонаных антител [1-3]. Однако относительно невысокий уровень накопления целевых белков (менее 1 % от общего растворимого белка – ОРБ) в тканях генетически модифицированных растений, а также длительность процесса получения трансгенных растений, высокая трудоемкость, ограничивающая объем анализируемого материала, длительность контакта растительного материала с антибиотиком в процессе культивирования на канамицин-содержащей среде, в результате чего отмечают развитие канамицин-устойчивых трансформантов, получение гетерозиготных растений-регенерантов, послужили отправной точкой для разработки новых систем экспрессии рекомбинантных белков.

В качестве таких альтернативных систем экспрессии рассматриваются внеядерные геномы (пластомы) хлоропластов растений, ряска (*Lemna minor*, *Lemna gibba*), мох (*Physcomitrella patens*), некоторые виды водорослей (*Chlamydomonas reinhardtii, Phaeodactylum tricornutum, Tetraselmis suecica* и *Odontella aurita*), а также клетки генетически модифицированных растений, культивируемые в суспензионной культуре [4].

Суспензионные клеточные культуры на основе генетически модифицированных растений привлекают внимание исследователей как перспективные потенциальные системы для наработки фармацевтических белков. Такие культуры могут быть получены из рыхлых каллусных тканей, индуцированных из генетически модифицированных эксплантов, либо на основе кокультивирования клеточной суспензии и *A. tumefaciens* [5, 6]. После оценки ростовых характеристик и отбора клеточных линий по способности накапливать рекомбинантные белки, могут быть отобраны перспективные линии для культивирования в биореакторах.

Разрабатываются клеточные линии для наработки рекомбинантных белков для коммерческих целей на основе клеточных культур моркови и риса (например, компания «Protalix» Израиль) [2]. Широко используются для этих целей клеточные культуры табака [6, 7]. В 2006 году в США фирме «Dow AgroSciences» была выдана лицензия на способ получения вакцины против возбудителя болезни Ньюкасла (псевдочума, азиатская чума кур) на основе суспензионной клеточной культуры табака [2]. Привлекательной особенностью клеточных культур как системы экспрессии для наработки рекомбинантных белков по сравнению с использованием для этого целых растений является то, что клеточные культуры можно унифицировать по ростовым характеристикам, размерам и типам клеток. Более того, клетки выращиваются в строго контролируемых условиях, при которых скорость накопления продукта не будет меняться от пассажа к пассажу, что является более технологичным и экологически безопасным процессом. Выращивание *in vitro* трансгенных клеточных культур также имеет еще ряд преимуществ перед другими способами экспрессии чужеродных генов: для этого не требуется сложного оборудования; не зависит от сезонности работ, а масштабы культивирования гарантируют доступность рекомбинантного препарата в количествах, достаточных для клинических испытаний и терапевтического использования.

Одним из наиболее эффективных методов, позволяющих проводить проверку новых генетических конструкций и регуляторных элементов, анализ экспрессии гетерологичных генов без создания трансгенных организмов, является Agrobacterium-опосредованная транзиентная экспрессия [8].

Цель исследования – разработка более быстрого и эффективного способа получения трансформированной клеточной культуры *N. tabacum* L. с высоким уровнем экспрессии репортерного гена *uidA*, кодирующего фермент β-глюкуронидазу.

Первоначально получали экспланты из стерильных пробирочных растений табака *N. tabacum* L. (линия SR1), выращенных *in vitro* на свету в течение 28 суток из простерилизованных семян на агаризованной безгормональной питательной среде МС [9]. Рассеченные листовые сегменты небольших размеров переносили их на агаризованную питательную среду МС с добавлением гормонов 2,4-D (2 мг/л) и кинетина (0,2 мг/л) и инкубировали в темноте в течение 3-4 недель до образования каллуса.

Для трансформации каллусной ткани использовали ночную суспензионную культуру агробактерии *A. tumefaciens*, содержащей бинарный вектор pBI121 с *uidA*-геном (Рис. 1), выращенную на среде YEP с добавлением антибиотиков (рифампицин – 500 мг/л, канамицин – 500 мг/л) [10].

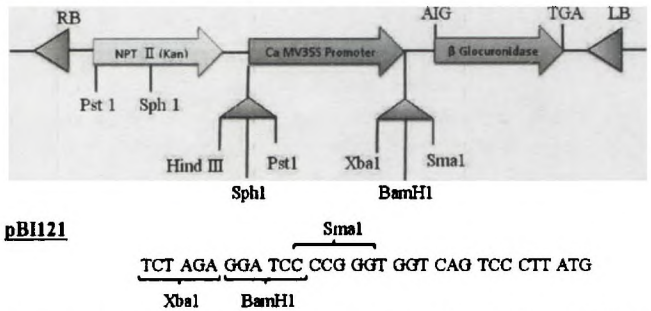


Рисунок 1 – Вектор pBI 121 со встроенной одной копией гена *uidA* (β-глюкуронидазы) в связке с геном-репортером по канамицин-устойчивости *npt* II [11]

После агробактериальной трансформации каллусную ткань табака культивировали на агаризованной питательной среде МС с 2,4-D (2 мг/л) и кинетином (0,2 мг/л) и антибиотиками – цефотаксимом (500 мг/л) и канамицином (200 мг/л) – для подавления роста агробактерий и отбора трансформированных каллусов [12]. Проверку трансформации каллусной ткани проводили методом гистохимического выявления GUS-активности [13]. Затем из наиболее активнорастущих трансформированных каллусов (показавших высокую GUS-активность) получали суспензионные культуры, состоящие из преимущественно одиночных клеток или мелких клеточных агрегатов. Перевод каллусных культур в суспензионные был обусловлен тем, что при таком режиме культивирования 1) происходит интенсификация ростовых процессов (длительность пассажа составляет 15-16 дней), 2) проще выявлять линии клеточных культур, отличающихся разным уровнем экспрессии гена *uidA*, (что может быть связано с различным местом встройки в растительном геноме [14]), 3) быстрое получение биомассы растительных клеток суспензионных культур позволяет использовать крупномасштабное промышленное оборудование (ферментеры) для культивирования.

При пересадках суспензионных культур постоянно вели поддерживающий отбор по признаку «темп роста», визуально отбирая для дальнейшего культивирования колбы с лучшим ростом и уровнем транзиентной экспрессии фермента β-глюкуронидазы [13].

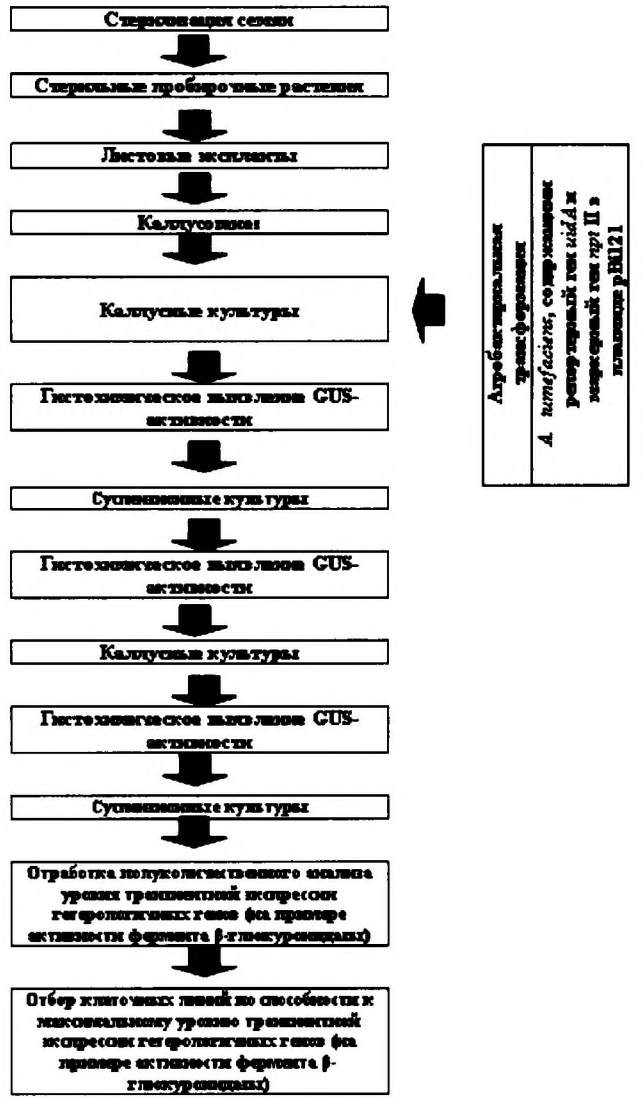


Рисунок 2 – Общая схема получения клеточной суспензионной культуры трансгенного табака *N. tabacum* L., содержащего ген *uidA*, для создания на ее основе биопродуцентов рекомбинантных белков

После этого небольшие аликвоты наиболее активнорастущих суспензионных культур высевали в чашки Петри на селективную агаризованную питательную среду МС с добавлением фитогормонов и антибиотиков (как описано выше) для получения микро-каллусов. Через 4-8 недель из активнорастущих микро-каллусов (наиболее крупных по размеру, что свидетельствовало о более высокой скорости роста) вновь получали суспензионные культуры, в которых в дальнейшем с помощью гистохимического окрашивания выявляли уровень транзиентной экспрессии гетерологичных генов. На основании результатов полуколичественного анализа GUS-активности проводили отбор клеточных линий по способности к максимальному уровню экспрессии фермента β-глюкуронидазы – на рисунке 2 приведена общая схема получения трансформированной суспензионной клеточной культуры табака.

Таким образом, был разработан протокол получения трансгенной суспензионной культуры табака *N. tabacum* L. для создания на ее основе биопродуцентов рекомбинантных белков со значительным уменьшением трудоемкости и с упрощением технологии получения трансформированного клеточного материала растений (исключая процедуры обработки, инкубирования, проверки на вставку Т-ДНК и др.).

Литература

1. Rybiski E.P. Plant-produced vaccines: promise and reality // Drug Discovery Today. - 2008. - V. 13. - P. 894-901.
2. Yusibov V., Rabindran S. Resent progress in the development of plant-derived vaccines // Expert Reviews of Vaccines. - 2008. - V. 7. - P. 1173-1183.
3. Sourrouille C., Marshall B., Lienard D., Faye L. From Neanderthal to Nanobiotech: From Plant Potions to Pharming with Plant Factories. In Book: Methods in Molecular Biology: Recombinant Proteins From Plants / Ed. by Faye L. and Gomord V. Humana Press, a part of Springer Science+Buisness Media, 2009. - P. 1-23.
4. Дейнеко Е.В. Генетически модифицированные растения – продуценты рекомбинантных белков медицинского назначения // Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2012. - № 18(2). - С. 41-51.
5. Hellwig S., Drossard J., Fisher R. Plant cell culture for the production of recombinant proteins // Nat Biotechnol. - 2004. - V. 22. - P. 1415-1422.
6. Martinez C.A., Guilietti A.M., Talou R. Research advances in plant-made flavivirus antigens // Biotechnology Advances. - 2012. Doi:10.1016/j.biotechadv.2012.03.004.
7. Lienard D., Tran Ding O., van Oort M. Suspension-culture BY-2 tobacco cells produce and mature immunologically active house dust mite allergens // Plant Biotechnol J. - 2007. - V. 5. - P. 93-108.
8. Sheludko Y.V. Agrobacterium-Mediated Transient Expression as an Approach to Production of Recombinant Proteins in Plants // Recent Patents on Biotechnology. - 2008. - V. 2. - P. 198-208.
9. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture //Physiol Plant. - 1962. - Vol. 15. № 13. - P. 473-497.
10. Гвоздева Е.С., Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Сидорчук Ю.В., Уварова Е.А., Пермякова Н.В. Практикум по генетической инженерии и молекулярной биологии растений. Томск: ТГУ, 2012. - 96 с. + 8 вклеек.
11. Шумный В. К. Генная и хромосомная инженерия для растений // Вестник Российской Академии наук. - 2001. - Т. 71, № 8. - С. 725-732.
12. Гвоздева Е.С., Дейнеко Е.В. Заявка РФ № 2012135316 от 16.08.2012 г. на изобретение «Способ получения клеточной суспензионной культуры трансгенного табака *Nicotiana tabacum* L., содержащего ген *uidA*».
13. Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. Gus fusions β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // EMBO J. - 1987. – V. 6. – P. 3301-3307.
14. Карначук Р.А., Дорофеев В.Ю., Гвоздева Е.С., Медведева Ю.В., Ефимова М.В., Чурин А.А., Глухова Л.Б. Создание клеточной культуры трансгенного табака с геном интерлейкина-18 человека как продуцента белков медицинского назначения // Вестник Томского государственного университета. – 2007. – № 1. - С. 75-86.

Для заметок

Получение новых высокопродуктивных линий княжика сибирского *Atragene speciosa* Weinm. в культуре in vitro

Ю.В. Медведева, В.Ю. Дорофеев, С.В. Песяк, Р.А. Карначук
Томский государственный университет, г. Томск

В народной медицине Востока для лечения широкого спектра заболеваний издавна используется княжик сибирский (*Atragene speciosa* Weinm.), сем. Ranunculaceae. Современные исследования показали перспективность использования княжика сибирского в качестве источника фитопрепарата ноотропного действия, обладающего выраженным противоишемическим, анксиолитическим и антистрессорным действием [1]. Использование природных источников сырья *A. speciosa* Weinm. затруднено тем, что они малочисленны, имеют ограниченные ареалы, а биологическая особенность вида не позволяет успешно его интродуцировать. Одним из актуальных направлений в фармакологическом производстве лекарственных веществ является использование биотехнологических методов для получения ценных метаболитов лекарственных растений.

Ранее были получены каллусные и суспензионные культуры клеток *A. speciosa* Weinm., в которых наблюдали образование фенолоспиртов, флавоноидов и сапонинов, сопоставимое с таковым в интактных растениях [2 - 4]. Нами разработаны оптимальные условия для индукции каллусообразования и культивирования каллусных тканей, изучено влияние жасмоновой кислоты, 24-эпибрассинолида, гуминовых кислот и препарата «Силк», а также селективного света на рост и содержание биологически активных веществ (БАВ) в культуре княжика сибирского *in vitro* [3]. При цитогенетическом анализе обнаружена генетическая изменчивость клеток *in vitro*: выделено несколько типов каллуса с различным уровнем полиплоидии и анеуплоидии, что, предположительно, могло являться основой для формирования стабильных линий каллусных клеток с разными ростовыми характеристиками и уровнем содержания БАВ [5].

Целью работы было получение новых линий княжика сибирского, изучение их биосинтетических свойств и продуктивности биомассы.

Методом отбора сомаклональных вариантов и выращивания на средах различного гормонального состава получено 14 линий каллусных культур *A. speciosa* Weinm. Линии 1а, 1р, 2б, 2В, 3а, Ia, Iб, II, III и V культивировали на среде Мурасиге – Скуга (МС) с добавлением сахарозы в концентрации 30 г/л и следующим гормональным составом: НУК (0,5 мг/л) и БАП (0,2 мг/л). Линии Iб-В и IIб получены из линий Iб и II, линии V(D) и 3а(D) получены путем культивирования исходных линий на среде МС с добавлением 2,4–Д (0,8 мг/л) и БАП (0,5 мг/л).

Каллусные культуры княжика были преимущественно желтого цвета – от темного до светлого, а сухая масса составляла от 4 до 10 % от сырой массы клеток. Сухая масса с 1 л питательной среды за 30 суток культивирования на агаризованной среде для разных линий княжика составляла от 14 до 22 г. Индекс роста также варьировал незначительно и не превышал 2,5 - 3.

Поскольку известно, что за антиоксидантную активность фармакологичеки активной фракции *A. speciosa* Weinm. отвечают фенолоспирты, то продуктивность БАВ полученных линий оценивали, преимущественно, по их содержанию в конце субкультивирования. При определении суммы фенолоспиртов обнаружили различия в их содержании в клетках разных линий княжика сибирского. Каллусы, у которых оптимальное время субкультивирования не превышало 30 - 40 суток, накапливали большее количество фенолоспиртов, суммарное содержание которых достигало 6 - 8 %, что в несколько раз превышало содержание в листьях интактного растения (3,25 %). Светло - окрашенные сильно обводненные каллусы с высокой жизнеспособностью, способные к продолжительному росту в течение 90 суток субкультивирования, как правило, характеризовались меньшим содержанием фенолоспиртов 1,5 - 3,5 %. Выход фенолоспиртов также значительно варьировал для разных линий и составлял от 0,22 до 1,75 г/л питательной среды. При этом выход фенолоспиртов в большей степени определялся их концентрацией в сухой массе культуры.

Использование разработанного ранее способа выращивания суспензионных культур *A. speciosa* Weinm. показало, что при переходе к периодическому культивированию в жидкой среде происходила интенсификация ростовых процессов, при этом сохранялся, а в ряде случаев увеличивался биосинтетический потенциал. Культуры княжика на жидких питательных средах были склонны к образованию многоклеточных агрегатов, выращивание в виде отдельных клеток было менее успешно. В литературе также встречаются данные, что суспензионные культуры ряда растений оказываются малопригодны для использования в крупномасштабном производстве: одиночные клетки и мелкие агрегаты легко гибнут при выращивании в ферментерах из-за низкой устойчивости к механическому перемешиванию. Отмечено также влияние формирования и размера клеточных агрегатов на синтез в культуре биологически активных веществ. Поэтому для некоторых растений более технологичным и менее трудоемким

является выращивание культуры в жидкой питательной среде глубинным способом в виде многоклеточных агрегатов [6, 7].

A. speciosa Weinm. линии V(D) с максимальным индексом роста, выходом биомассы и высокой продуктивностью фенолоспиртов 1 г/л питательной среды, была использована для получения глубинной культуры на жидкой питательной среде МС. Максимальное накопление сухой массы 24 г/л питательной среды происходило к 4 субкультивированию, и в течение последующих 10 субкультивирований оставалось практически без изменений, что незначительно превышает максимальный выход таковой на твердых питательных средах (22 г/л). Однако, скорость накопления биомассы суспензионной культуры возрастает, что позволяет сократить время культивирования до 14 суток. Получение биомассы сопровождалось контролем содержания фенолоспиртов. Было показано, что в клетках глубинной культуры *A. speciosa* Weinm. по мере культивирования происходило увеличение содержания фенолоспиртов. Максимальное накопление фенолоспиртов наблюдалось в конце 10 – 15 субкультивирований и составляло 2 - 2,6 % от сухой массы с выходом 0,5 г/л питательной среды.

Таким образом, были получены несколько линий каллусной культуры княжика сибирского *in vitro*, которые отличались морфологическими признаками, жизнеспособностью, ростовой активностью, а также содержанием фенолоспиртов. Наиболее продуктивные из них накапливали в несколько раз больше фенолоспиртов, чем интактные растения. Наибольшим содержанием фенолоспиртов отличались линии, культивируемые на питательной среде МС с добавлением 2,4–Д в определенной концентрации. Практический результат проведенных исследований дает возможность использования полученных линий клеточной культуры *A. speciosa* Weinm. в опытно-промышленном культивировании с максимальным выходом биомассы и БАВ для изучения фармакологической активности выделенных фракций с целью создания на их основе препарата с адаптогенным и ноотропным действием.

Исследование выполнено при поддержке НИР Госзадания Минобрнауки России (номер госрегистрации темы 01201256295).

Литература

1. Шилова И.В., Краснов Е.А., Андреева Т.И., Карначук Р.А., Суслов Н.И. Исследование химического состава надземных частей *Atragene sibirica* L. и ее культуры ткани // Материалы Всероссийского совещания, посвященного 120-летию Томского государственного университета «Физиология и биотехнология растений». - Томск: Изд-во Томского государственного университета. - 1998. - С. 79 - 81.

2. Карначук Р.А., Е.А. Краснов, В.Ю. Дорофеев, И.В. Шилова Клеточная культура княжика сибирского – перспективный источник лекарственных средств // Биотехнология на рубеже двух тысячелетий: Материалы Международной научной конференции (г. Саранск, 12 - 15 сентября 2001 г.). - Саранск: Изд-во Мордовского университета. - 2001. - С.182 - 183.

3. Карначук Р.А., Дорофеев В.Ю., Гвоздева Е.С., Головацкая И.Ф., Чурин А.А., Суслов Н.И., Медведева Ю.В. Влияние физиологически активных соединений на рост и уровень тритерпеновых сапонинов и флавоноидов клеточной культуры *Atragene speciosa* Weinm. // Вестник Томского государственного университета. Биология, № 3(4). - Томск: Томский государственный университет, 2008. - С. 48 - 54.

4. Карначук Р.А., Дорофеев В.Ю., Медведева Ю.В., Дубина В.Б., Суслов Н.И., Чурин А.А. Клеточная культура *Atragene speciosa* Weinm. – возможный продуцент биологически активных веществ ноотропного и адаптогенного действия // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 1. - Москва: Изд-во «Радиотехника», 2011. - С. 31 - 37.

5. Дорофеев В.Ю., Карначук Р.А., Пулькина С.В., Комлева Е.В., Дубина В.Б., Медведева Ю.В. Культура княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) *in vitro*: цитогенетический анализ и образование тритерпеновых гликозидов и флавоноидов // Вестник Томского государственного университета, 3(7). - Томск: Томский государственный университет, 2009. - С. 37 - 41.

6. Мирюта Н.Ю., Аль-Аммури Ю., Ревякина О.Ю., Можилевская Л.П., Кунах В.А. Изменчивость параметров продуктивности при поверхностном и глубинном выращивании каллусных тканей раувольфии змеиной – продуцента индолиновых алкалоидов // Биотехнология, 2006. - № 4. - С. 64 – 73.

7. Fu Chun-xiang, Zhao De-xiu, Huang Yan, Ma Feng-shan. Cellular aggregate size as the critical factor for flavonoid production by suspension cultures of Saussurea medusa // Biotechnology Letters. – Springer. – 2005 (27). – p. 91 – 95.

Для заметок

Роль темнового дыхания в продукционном процессе

Т.И. Голованова, А.Ф. Валиулина

Сибирский федеральный университет, г. Красноярск

Темновому дыханию в продукционном процессе уделяют большое внимание. Это обусловлено тем, что произошло изменение оценки самой продуктивности растений, вместо количественной ее характеристики возникла необходимость учитывать эффективность продукционного процесса растений. Необходимо выяснить: какова роль дыхания в формировании биомассы растения и как оно связано с другими элементами продукционного процесса, и в частности, с фотосинтезом [1, 2, 3]. Одной из задач является детальное рассмотрение взаимосвязи темнового дыхания и фотосинтеза: оценить количественное соотношение этих процессов. Однако количественная взаимосвязь этих процессов на начальных этапах онтогенеза растений изучена недостаточно. С этой целью проведены исследования с растениями гороха, одни из которых были выращены на непрерывном освещении, другие – на фотопериоде, который составлял 14 часов.

На начальных этапах онтогенеза питание проростков носит гетеротрофный характер. Оно осуществляется за счет мобилизации запасных соединений. Энергетические и пластические потребности роста организма в первую неделю обеспечиваются исключительно дыханием, поэтому неслучайно, что у 5-6 – дневных проростков доля дыхания от фотосинтеза высока и составляла на фотопериоде 82%, а на непрерывном освещении – 66%. На фотопериоде у гороха отмечается некоторое увеличение отношения дыхания к дыханию роста (R/P_g). Это, возможно, связано с большей долей гетеротрофных тканей у растений, выращенных на фотопериоде, о чем свидетельствует и увеличение доли дыхания поддержания в общем дыхании на фотопериоде и уменьшение отношения дыхания роста к дыханию поддержания, а также на величину R/P_g влияет и длительность светового периода. Следовательно, соотношение R/P_g, как отмечает Т.К.Головко и Е.В.Гармаш [4], отражает не только соотношение составляющих углеродного баланса и направленность метаболизма, но и служит сигналом для включения механизмов адаптивных перестроек, обеспечивающих максимально возможную в конкретных условиях эффективность роста растений.

Были рассчитаны коэффициенты дыхания роста ($к$) и накопления ($с$), соотношение дыхания роста и поддержания (R_g/R_m) для надземной части, корневой системы и целого растения, выращенного при непрерывном освещении и на фотопериоде.

Количество ассимилятов, поступающие в корни (Т), рассчитывали исходя из суточного прироста биомассы корневой системы.

Полученные данные позволили рассчитать соотношение между дыхательными затратами и интенсивностью поступления ассимилятов в корневую систему растений, выращенных на непрерывном освещении и фотопериоде, эта величина составляла 0,62 и 0,58, соответственно.

По полученным данным было определено процентное распределение CO_2 между корневой системой и надземной частью растения для непрерывного освещения и фотопериода. При этом за 100% принимали значения истинного фотосинтеза для целого растения гороха. Показано, что длительность светового периода оказывало существенное влияние на усвоение и перераспределение CO_2 (рис.1).

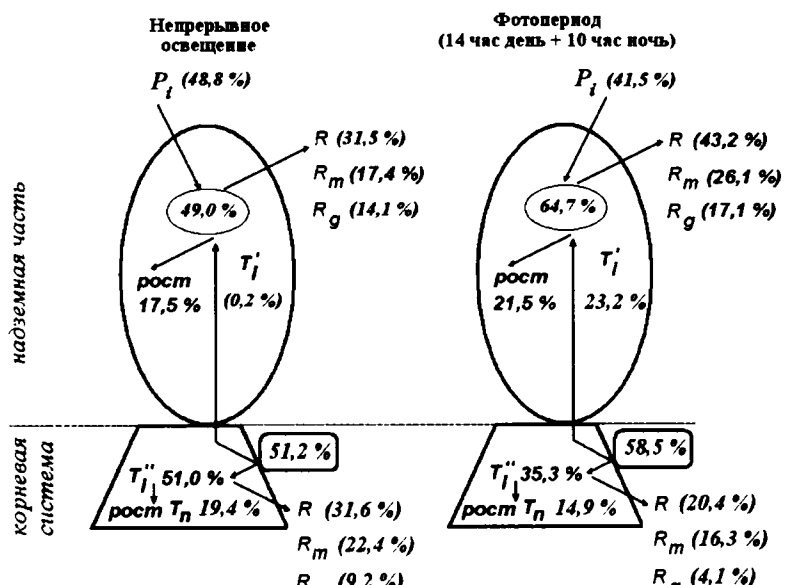


Рисунок 1 - Процентное распределение CO_2 у 5-6 – дневных проростков гороха, выращенных в условиях светокультуры.

Обозначения: R – дыхание, R_m- дыхание поддержания, R_g - дыхание роста, P_i – истинный фотосинтез, T_i – истинный транспорт CO_2 в корневую систему, T_n – видимый транспорт CO_2 в корневую систему

Достоверные различия между видимым фотосинтезом у растений, выросших на фотопериоде и на непрерывном освещении, говорят о более интенсивном использовании запасных питательных веществ горошины растениями, выросшими на фотопериоде. Величина коэффициента дыхания роста у растений, выросших на фотопериоде, была в 1,22 раза выше по сравнению с растениями, выросшими на непрерывном освещении.

Таким образом, фотосинтез и дыхание - это процессы обеспечивающие материально-техническую основу жизнедеятельности растений, они способны поставлять необходимые для роста и поддержания растительных клеток АТФ, НАФД(Ф)Н и метаболиты, эти процессы тесно взаимодействуют. Дыхание – это процесс, связанный с различными сторонами жизнедеятельности растений и центральное звено общего метаболизма. Дыханию для нормального функционирования требуются: ассимиляты, которые могут поступать из запасных питательных тканей растений, а также ассимиляты, которые образуются в процессе фотосинтеза.

Литература

1. Голик К.Н. Темновое дыхание растений.- Киев: Наукова думка, 1990. - 137 с.
2. Семихатова О.А., Чиркова Т.В. Физиология дыхания растений: учеб. Пособие.- СПб.:Изд-во С. – Петерб. ун – та, 2001. - 220 с.
3. Усманов И.Ю., Рахманкулова З.Ф., Кулагин А.Ю. Экологическая физиология растений. - М.: Логос, 2001. - 221 с.
4. Головко Т.К., Гармаш Е.В. CO_2 – газообмен и рост *Rhaponticum carthamoides (Willd.) Iljin* в условиях подзоны средней тайги // Физиология растений. - 1997. - Т. 44, № 6. - С. 864-872.

Для заметок

Регулятор роста и развития растений мелафен предотвращает дисфункцию митохондрий проростков гороха в условиях недостаточного увлажнения

Жигачева И.В.[1], Бурлакова Е.Б[1], Генерозова И.П.[2], Шугаев А.Г.[2],Фаттахов С.Г.[3]

[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, г. Москва

[2]Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва

[3]Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова РАН Казанского Научного центра, г. Казань

Одним из основных экологических факторов, ограничивающих расширение ареала и продуктивности сельскохозяйственных культур, является осмотический стресс, обусловленный засухой. В настоящее время накоплено много данных, показывающих, что даже слабый водный дефицит влияет на обмен веществ, а следовательно, на рост и развитие растений. Растения, перенесшие только однократную сильную кратковременную засуху, так и не возвращаются к нормальному обмену веществ.

Водный дефицит модифицирует клеточные мембраны, влияя на их функции и метаболизм клетки [1]. При этом изменяется жирнокислотный состав липидов мембран: увеличивается относительное содержание насыщенных жирных кислот и снижается содержание ненасыщенных жирных кислот. Это, возможно, приводит изменению белок-липидных взаимодействий и, как следствие, к изменению активности ферментов, ассоциированных с мембранами, прежде всего ферментов, входящих в состав электрон-транспортных цепей митохондрий и хлоропластов. Энергетический обмен играет важную роль в адаптивных реакциях организма. При этом митохондрии играют ключевую роль в энергетических, окислительно-восстановительных и метаболических процессах клетки [2].

Известно, что регуляторы роста и развития растений повышают устойчивость растений к биотическому и абиотическом стрессу, в том числе и к водному дефициту [3]. Одним из таких регуляторов роста является мелафен, который представляет меламиновую соль бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты [4].

В связи с этим цель нашей работы состояла в выяснении влияния недостаточного увлажнения и мелафена на жирнокислотный (ЖК) состав липидов мембран митохондрий 5-дневных проростков гороха (Pisum sativum) и биоэнергетические характеристики этих органелл.

Семена гороха промывали водой с мылом и 0,01% раствором $KMnO_4$. Контрольную группу семян замачивали в воде, а опытную группу – в 2×10^{-12}М растворе мелафена. Длительность замачивания – 1 час. Затем семена переносили в закрытые кюветы с периодически увлажняемой фильтровальной бумагой, где они находились в течение 1 суток. Спустя 1 сутки половину семян контрольной группы и половину семян, обработанных мелафеном, на 2 суток переносили в открытые кюветы на сухую фильтровальную бумагу. Вторая половина семян контрольной группы оставалась в закрытых кюветах с периодически увлажняемой фильтровальной бумагой, где они находились в течение 5 суток. Спустя двое суток «засухи» семена переносили в закрытые кюветы с периодически увлажняемой фильтровальной бумагой, где они находились в течение последующих 2 суток. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков гороха.

Выделение митохондрий из этиолированных проростков гороха проводили методом дифференциального центрифугирования [5].

Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом (полярограф LP-7) (Чехия) с использованием кислородного электрода типа Кларка. Среда инкубации содержала: 0.4 М сахарозу, 20 мМ HEPES- трис-буфер (pH 7.2), 5 мМ KH_2PO_4, 4 мМ $MgCl_2$, 0.1% БСА (28°С). Скорости дыхания выражали в нг.атом O_2/мин мг белка

Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) получали кислотным метанолизом суммарной фракции липидов мембран митохондрий [6] или с помощью одностадийного метилирования жирных кислот, исключающего экстракцию липидов [7].

Количественный анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили на хроматографе "Кристалл 2000М" (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой SPB–1 (50 м х 0,32 мм, слой неполярной фазы 0,25 мкм).

Уровень ПОЛ оценивали флуоресцентным методом [8] (Результаты выражали в относительных единицах флуоресценции пересчитанных на мг белка).

Недостаточное увлажнение приводило к 3-х кратному увеличению содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах митохондрий проростков гороха. Обработка семян 2 х 10^{-12} М раствором

мелафена уменьшала содержание продуктов ПОЛ до контрольных величин. Недостаточное увлажнение вызывало изменение жирнокислотного состава мембран митохондрий проростков гороха. При этом происходило увеличение содержания насыщенных жирных кислот и снижалось – ненасыщенных жирных кислот. При этом содержание линолевой кислоты снижалось на 11%, линоленовой - на 19%. Содержание стеариновой кислоты возрастало на 41%, что вело к снижению соотношения C_{18} ненасыщенных жирных кислот к стеариновой кислоте с 16,61±0,30 до 10,59±0,20 в мембранах митохондрий. Изменение содержания жирных кислот с 18 углеродными атомами в условиях водного дефицита наблюдались в мембранах митохондрий кукурузы, клеток картофеля, мембранах из листьев Arabidopsis thaliana и абрикоса [9-12]. При этом авторы отмечали значительное снижение содержания линолевой, линоленовой кислот и увеличение содержания стеариновой кислоты в мембранах. Значительные изменения наблюдались и в относительном содержании жирных кислот с 20 углеродными атомами Пул 20:2 ω6 снижался в 2,7 раза, 20:1 ω 9 – в 1,4 раза и 20:1 ω7 – в 1,3. В то же время содержание эйкозановой кислоты (20:0) возрастало более чем в 2 раза. В результате было отмечено снижение соотношения пула ненасыщенных жирных кислот с 20 углеродными атомами (20:1ω7+ 20:1 ω 9+(20:2 ω6) ×2) к эйкозановой кислоте 3,65±0,03 до 1,20±0,16. Эти изменения, возможно, приводили к изменению липид-белковых взаимодействий, а, следовательно, и активности связанных с мембранами ферментов, что имело следствием снижение максимальных скоростей окисления NAD-зависимых субстратов. Скорости окисления глутамата+малат в присутствии разобщителя (FCCP) падали с 70,0±4,6 до 48,9±3,2 нг атом кислорода/мг белка х мин и величина дыхательного контроля по Чансу снижалась с 2,27±0,01 до 1,70±0,02.

Замачивание семян в 2×10^{-12}М растворе мелафена предотвращало изменения биоэнергетических характеристик митохондрий: эффективность окислительного фосфорилирования и скорости окисления NAD-зависимых субстратов в присутствии ADP или FCCP не отличались от контрольных значений Описанные изменения в энергетике митохондрий, по-видимому, связаны с физико-химическим состоянием мембран этих органелл. Действительно, обработка мелафеном, защищая ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав липидов мембран от перекисного окисления, предотвращала изменения в жирнокислотном составе мембран, проростков выращенных в условиях недостаточного увлажнения. На основании приведенных данных можно предположить, что рост содержания ненасыщенных жирных кислот, в частности C_{18} и C_{20} кислот, в мембранах растительных тканей приводит к повышению устойчивости растений к недостаточному увлажнению. Действительно, между коэффициентом ненасыщенности C_{18} жирных кислот в мембранах митохондрий ($\sum$ненасыщенные $C_{18\ \text{жирные кислоты}}/C_{18:0}$) и максимальными скоростями окисления NAD-зависимых субстратов наблюдается корреляция с коэффициентом корреляции r =0,76489. Возможно, это связано, главным образом, с содержанием линолевой кислоты – одной из основных жирных кислот, входящих в состав кардиолипина [13]. Между коэффициентом ненасыщенности C_{20} кислот в мембранах митохондрий и максимальными скоростями окисления NAD-зависимых субстратов наблюдается еще более тесная корреляция (r =0,96370).

Антистрессорные свойства препаратов отражались и на физиологических показателях. Обработка семян гороха мелафеном приводила к четырехкратной стимуляции роста корней в условиях недостаточного увлажнения. При этом в 3,5 раза увеличивалась длина побегов проростков.

Исходя из наших данных, можно предположить, что устойчивость к водному стрессу определяется антиоксидантной системой клетки, обеспечивающей защиту ненасыщенных жирных кислот с очень длинной цепью и ненасыщенных жирных кислот, содержащих 18 углеродных атомов, от окислительной модификации, обусловленной активацией свободно-радикальных процессов [13].

Литература

1. Kizis D., Lumbreras V., Pages M. // FEBS Lett. - 2001. - V. 498. - P. 187-189.
2. Atkin O. K , D. Macherel // Annals of Botany. – 2009. - V.103 (4). - P. 581-597.
3. Жирмунская Н.М., Шаповалов А.А. // Агрохимия. - 1987. - Т.5. – С. 102-119.
4. Фаттахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. // Материалы 13 Международной конференции по химии фосфора. СПб., 2002. - С. 80.
5. Попов В.Н., Руге Э.К., Старков А.А.. // Биохимия. - 2003. - Т. 68. - С. 910-916.
6. Carreau J.P., Dubacq J.P. // J. Chromatogr. - 1979. - V. 151б. - P. 384–390.
7. Wang J., Sunwoo H, Cherian G., Sim I.S. // Science. - 2000. - V. 79. - P. 1168-1171.
8. Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. // Ann. Biochem. - 1973. - V. 52. - P. 1–9.
9. Junior R.R.M., Oliveira M.S.C., Baccache M.A., de Paula F.M.. // Brazilian Arch. Biol. and Technol. - 2008. - V. 5. - P. 361-367.
10. Макаренко С.П., Константинов Ю.М., Хотимченко С.В., Коненкина Т.А., Арзиев А.С. // Физиология растений. - 2003. - Т. 50. - С. 487–492.

11. Gigon A., Matos A.R., Laffray D., Fodil Y.Z., Thi Anh-Thu Pham // Ann. Bot. - 2004. - V. 94. - P. 345–351.
12. Leone A., Costa A., Grillo S., Tucci M., Horvarth I., Vigh L. // Plant Cell Environ. - 1996. - V. 19. - P. 1103–1109.
13. Paradies G., Petrosillo G., Pistolese M., Venosa N., Federici A., Ruggiero F.M. // Circulation Research. – 2004. - V. 94. - P. 53-59.

Для заметок

Регуляция роста оздоровленных растений картофеля сортов, районированных в Сибири в условиях in vitro и гидропоники для усиления их продукционного процесса

В.Ю. Дорофеев, И.Ф. Головацкая, Ю.В. Медведева, П.Е. Никифоров, Р.А. Карначук

Томский государственный университет, г. Томск

Картофель нуждается в периодическом оздоровлении от вирусных и других инфекций, значительно снижающих урожай. Основным способом оздоровления растений картофеля – является метод апикальных меристем и дальнейшее получение из них клонов, размножаемых в пробирках с целью дальнейшего их культивирования в условиях гидропоники для образования безвирусных миниклубней – семенного материала первой репродукции. Скорость роста картофеля на разных этапах можно регулировать как селективным светом, так и экзогенными регуляторами роста растений.

Известно применение экзогенной жасмоновой кислоты (JA) для образования и формирования клубней картофеля. JA. Ранее нами было показано, что у всех обработанных JA растений картофеля раннеспелого сорта Жуковский в условиях короткого дня формировалось вдвое больше клубней на гидропонной установке «Картофельное дерево» (КД-10). Образование значительного количества клубней у обработанных вариантов растений картофеля требовало больше времени для дальнейшего роста клубней. Применение JA в условиях гидропоники можно использовать для повышения продуктивности семенного оздоровленного картофеля ранних сортов.

Скорость роста микроклонов растений картофеля можно регулировать светом. Изучены ростовые характеристики и содержание фотосинтетических пигментов (хлорофилл a и b, каротиноиды) в листьях верхних ярусов микроклонов картофеля нематодоустойчивых сортов Крепыш и Red Scarlet *in vitro* через 28 суток культивирования на свету разного спектрального состава. Растения культивировали на белом свету люминесцентных ламп при досветке красным (λ_{max} 620-680 нм) и синим (λ_{max} 430-480) светом одной и той же интенсивности. Показано, что сухая масса микроклонов растений картофеля сортов Крепыш и Red Scarlet, экспонированных в режиме досветки на синем свету, достоверно превышала этот показатель в вариантах на красном свету. Досветка синим светом сокращала длину междоузлий и, как следствие, длину растений картофеля сорта Крепыш *in vitro*, в то время как на красном свету побеги удлинялись. Синий свет также способствовал большему накоплению хлорофиллов a и б, а также каротиноидов, по сравнению с вариантами на красном свету и контролем на белом свету.

Показана эффективность применения досветки красным светом растений картофеля фитофтороустойчивого сорта Луговской *in vitro*, при действии которого наблюдали наибольший прирост сухой массы побега, увеличение площади листовой поверхности, объема корневой системы и содержания фотосинтетических пигментов.

Специфическое действие света разного спектрального состава на морфогенез растений картофеля необходимо учитывать для оптимизации режима их культивирования. Результаты проведенных исследований могут быть применимы в оптимизации режима культивирования микроклонов картофеля *in vitro*, а также в условиях гидропонного культивирования с целью успешной адаптации растений *in vivo*, сокращения вегетационного периода и усиления продукционного процесса для получения максимального выхода оздоровленных миниклубней. Получение миниклубней является первоначальным и необходимым звеном в семеноводстве картофеля для получения высоких урожаев.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 11-04-98090-р_сибирь_а), Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе СТАРТ-10 (№9933р/11524 от 11.01.2012) и Госзадания Минобрнауки России (номер госрегистрации темы 01201256295).

Для заметок

Регуляция селеном биохимического состава растений *Lactuca sativa* L. при коррекции солнечного излучения

И.Ф. Головацкая, А.В. Крахалева, Ю.М. Кулагина

Томский государственный университет, г. Томск

Селен относится к эссенциальным микроэлементам, необходимым для нормальной жизнедеятельности человека и животных. Особое значение имеет его каталитическая функция в организме. Селен входит в состав ряда ферментов (например, глютатионпероксидазы) и принимает участие в поддержании перекисного гомеостаза, предупреждая развитие большого числа заболеваний человека. Исследования последних лет показали, что селен является микроэлементом и для растений, ему принадлежит важная роль в усилении адаптивного потенциала растений [1, 2]. В процессе метаболизма селена происходит его восстановление из неорганических соединений в органические через ряд форм. Благодаря этому существенное значение для жизнедеятельности растений может иметь форма селенового удобрения. Однако вопрос о механизме действия селена в регуляции метаболизма, морфогенеза и продуктивности растений остается недостаточно изученным. А поскольку жизнедеятельность растений зависит от спектрального состава света [3], то профессором Р.А Карначук была высказана идея о возможном участии селена в светозависимых реакциях растений. В связи с этим целью нашей работы было исследование влияния селенита и селената натрия на биохимический состав растений *Lactuca sativa* L., выросших на свету разного спектрального состава.

В ходе нашего эксперимента растения *Lactuca sativa* L. антоциан-содержащего сорта Гурман выращивали в почвенной культуре под обычной полиэтиленовой (БС) или светокорректирующей (СС) пленкой, отсекающей небольшую часть УФ-радиации и обогащающей спектр синим светом. Предпосевную обработку семян проводили селенитом и селенатом натрия («Sigma», США). Контролем служили растения, выросшие из обработанных водой семян. В середине и конце вегетативного этапа развития растений, соответственно на 25-е и 60-е сутки, определяли в них содержание фотосинтетических пигментов, первичных и вторичных метаболитов.

В процессе роста растений в разных условиях освещенности и минерального питания изменялся их биохимический состав. Прежде всего, модификация коснулась фотосинтетического аппарата, а именно, содержания фотосинтетических пигментов. Действие разных форм селена специфически изменило содержание зеленых и желтых пигментов фотосинтеза под БС. Селенит натрия увеличил содержание каротиноидов (Кар) и хлорофилла *a* (Хл *a*) в единице площади листа, тогда как селенат натрия снизил эти показатели, но увеличил уровень Хл *b*. Анализ динамики уровня фотосинтетических пигментов выявил защитную роль Кар под БС в присутствии селенит-иона.

Среди продуктов фотосинтеза выделяют редуцирующие сахара (РС). Их количество может характеризовать интенсивность синтетических процессов. Нами показано, что действие селена под БС увеличило уровень РС на 25 и 36%, соответственно при обработке селенит- и селенат-ионами, по сравнению с контрольными растениями. Это могло свидетельствовать о снятии селеном ингибирующего действия УФ-радиации на синтез углеводов. Коррекция солнечного излучения под СС повышала одинаково уровень РС у контрольных и обработанных селенитом растений (41–45%) и более значимо – у обработанных селенатом растений (54%) по отношению к контролю под БС. Эффект повышения фотосинтетической функции растений под СС можно также связать с уменьшением УФ-радиации. Однако роль селена снижалась относительно контроля под СС, что, вероятно, было обусловлено отвлечением метаболитов на другие процессы.

Нами получены данные о динамике РС в зависимости от физиологического состояния листьев (рис. 1а). У контрольных растений под БС более низкий уровень этой группы углеводов выявлен у молодых (15–20 ярус) и старых (3–7 ярус) листьев, тогда как у зрелых листьев происходил активный их синтез. Действие селенит- и селенат-ионов повышало уровень сахаров у молодых листьев и сохраняло его на высоком уровне в старых листьях. Такая реакция фотосинтетического аппарата свидетельствовала о повышении активности и продолжительности синтетических процессов, обусловленном введением селена в растения. Коррекция солнечного излучения под СС повысила уровень углеводов в контрольных растениях.

Содержание других метаболитов растений – белков – под действием селена на БС не изменилось. Коррекция солнечного излучения повышала эффективность селенит-иона в регуляции уровня белков в листьях салата, что могло быть обусловлено влиянием микроэлемента на синтез или стабилизацию белков.

Распределение белка в листьях разных ярусов контрольных растений под БС показало аналогичную редуцирующим сахарам закономерность (рис. 1а). Однако коррекция солнечного излучения существенно не изменило динамику белка. Действие селена повышало содержание белка в молодых (15–28 ярусы) и старых (3–7 ярусы) листьях, как на БС, так и на СС. Селенит-ион поддерживал уровень белка в старых листьях активнее, чем селенат-ион

и контроль, вероятно за счет своих свойств в регуляции ионного гомеостаза или скорости включения в метаболизм.

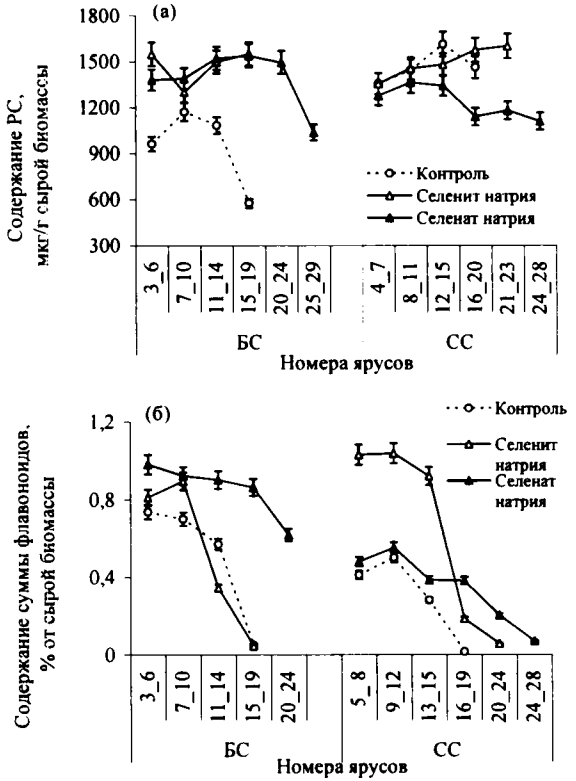


Рисунок 1 – Распределение содержания редуцирующих сахаров (РС) и суммы флавоноидов в листьях разных ярусов 60-дневных растений салата в зависимости от формы селена и качества света

Среди вторичных метаболитов существенное значение имеют флавоноиды (Фл). Под действием селената натрия их суммарное содержание в листьях 25-дневных растений на БС увеличивалось существеннее, чем под действием селенита натрия. Под СС отмечалось большее стимулирующее действие обеих форм ионов селена на накопление Фл растением. Исследование показало возрастную зависимость биосинтеза Фл в листьях (рис. 1б). В молодых листьях 60-дневных растений салата (17–28 ярусы) содержание Фл было ниже, чем в зрелых листьях (4–16 ярусы). Это свидетельствовало о том, что с завершением активного роста листа увеличивался синтез вторичных метаболитов.

Антоцианы (Ант), как представители флавоноидов, выполняют защитную функцию, предохраняя клетку от избыточного ультрафиолетового излучения. Предпосевная обработка селенитом натрия привела к увеличению содержания Ант в зрелых листьях по сравнению с контролем. В то же время обработка селенатом натрия уменьшила количество Ант в зрелых и молодых листьях. Под обычной пленкой (БС), нефильтрующей УФ-излучение, в растениях сформировался высокий уровень пигментов вакуолярного сока, выступающих в качестве энергетического щита для фотосинтетических пигментов. Добавление селена в растение через предпосевную обработку семян однозначно снизило содержание Ант в листьях, возможно, изменив окислительный гомеостаз клетки или синтез других соединений. Под светокорректирующей пленкой, удаляющей частично УФ-излучение и увеличивающей долю синего света (СС), в контроле снижался уровень Ант. Введение селена в форме селенит-иона еще больше снижало уровень Ант по сравнению с контролем. В то же время селенат-ион увеличивал уровень пигмента вакуолярного сока. Следовало ожидать, что уровень антиоксидантов различной природы строго регламентируется в клетке, поэтому на смену одних синтезируются другие.

На основе наших данных можно предположить, что различия в метаболизме растений *Lactuca sativa* L. разных световых вариантов были обусловлены разной скоростью поступления и усвоения ионов селена. Ранее нами было показано, что селективный свет меняет интенсивность поглощения селенита натрия [4]. Большую роль в поглощении веществ играют ростовые процессы, чем активнее растет орган, тем активнее поглощает. Поскольку регуляцию ростовых процессов осуществляют фитогормоны, то следует ожидать, что свет разного спектрального состава через изменение уровня эндогенных гормонов [3] влияет на донорно-акцепторные отношения между органами растения. Опираясь на данные о действии фитогормонов на селен-зависимый рост [7, 8], можно допустить, что влияние поглощенных и восстановленных ионов селена на рост происходит через регуляцию уровня фитогормонов или других биологически активных веществ.

Таким образом, результаты исследования показали, что предпосевная обработка семян раствором солей селена оказывала стимулирующее действие на размеры структурных элементов побега

растений *Lactuca sativa* L. Специфика действия различных ионов селена состояла в регуляции синтеза физиологически активных веществ. Эффективность воздействия селена напрямую зависела от формы, в которой он поступал в растение, и от спектрального состава света. Полученные данные необходимо учитывать при регулировании метаболизма и роста растений в процессе их обогащения селеном.

Исследования частично поддержаны ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (Госконтракт № П283) и Госзаданием Минобрнауки России ВУЗам (№ 01201256295).

Литература

1. Блинохватов А.Ф. Вихрева В.А., Хрянин В.Н. Селен – адаптоген и стимулятор роста и развития растений в биотехнологиях // Регуляторы роста растений в биотехнологиях: материалы VI Международной конференции. – М.: МСХА, 2001. - С. 82.

2. Барабой В.А. Селен: биологическая роль и антиоксидантная активность // Укр. біохім. журн. - 2004. - Т. 76, № 1. - С. 23–32.

3. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф. Гормональный статус, рост и фотосинтез растений, выращенных на свету разного спектрального состава // Физиология растений. - 1998. - Т. 45, вып. 6. - С. 925–934.

4. Головацкая И.Ф., Карначук Р.А., Кулагина Ю.М., Павлова Д.Г., Лаптев Н.И. Способ обогащения селеном овощей и злаков // Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам, Москва. 2012. Бюл. №15. Патент на изобретение №2451442 от 27.05.2012. Заявка №2010149934 от 07.12.2010 г.

5. Кулагина Ю.М., Головацкая И.Ф. Влияние селенита натрия на рост и развитие растений пшеницы в зависимости от способа обработки // Вестник ТГУ. Биология. - 2011. - № 2 (14). - С. 56–64.

6. Golovatskaya I.F., Krachaleva A.V. The role of different forms of selenium in regulating morphogenesis and content of biologically active substances of plants *Lactuca sativa* L. // Vestnik TGPU. - 2011, 8(110). - P. 85–88.

7. Пузина Т.И., Прудников П.С., Якушкина Н.И. Влияние селена на гормональный баланс и фотосинтетическую деятельность растений картофеля // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2005. - №6. - С. 7–9.

8. Golovatskaya I., Pavlova D., Kulagina Ju., Karnachuk R., Khripach V. The physiological action of brassinosteroids depends on concentration of selenium in the medium // 20th International conference on plant growth substances. Tarragona (Spain), 2010. PS05-38. - P. 88–89.

Для заметок

Содержание пигментов в листьях разных видов клевера, произрастающих в различных условиях влажности

В.Н. Крашенинников, В.Н. Хрянин

Пензенский государственный университет, г. Пенза

В результате негативной деятельности человека проблема сохранения биоразнообразия выходит на первый план. Поэтому изучение биохимических и физиологических особенностей растений в различных условиях обитания имеет большое значение. Растения рода клевера (Trifolium) являются важными составляющими биоценозов и являются ценными сельскохозяйственными культурами. Была поставлена задача исследовать некоторые физиологические особенности пяти видов клевера, произрастающих в различных условиях влажности Пензенской области (на водоразделе и в пойме). В качестве основного показателя для характеристики разных видов клевера использовали уровень содержания пигментов в листьях растений. Дело в том, что пигменты не только поглощают, передают энергию квантов света в реакционные центры и превращают в химическую энергию органических веществ, но и защищают клетку (в частности, каротиноиды) от образования активного кислорода и фотосинтетический аппарат от слишком высокой интенсивности света ультрафиолетовых лучей и других вредных факторов, которые могут его повредить. Для определения содержания пигментов были использованы листья среднего яруса растений с одного или нескольких рядом расположенных экземпляров в трех биологических повторностях. Определение содержания пигментов проводили на спектрофотометре Varian Cary 50 при длине волны для хлорофиллов – 670 нм (спирто-ацетоновая вытяжка), для каротинов – 440 нм (бензиновая вытяжка), для ксантофиллов – 440 нм (бензиновая вытяжка). В ходе определения содержания пигментов в листьях изучаемых видов было установлено, что у видов, приуроченных к более засушливым местам обитания, а именно, у к. пашенного, к. горного и к. альпийского в условиях дефицита влаги (водораздел) наблюдается увеличение содержания хлорофиллов в листьях на 19.0%; 6.7% и 4.3% соответственно). У более влаголюбивых видов - к. ползучего и к. лугового, напротив, в условиях недостатка влаги наблюдается снижение содержания хлорофиллов в листьях (на 19.9% и 7.4% соответственно). В целом, по абсолютным показателям содержания хлорофиллов в листьях изучаемые виды клевера отличаются не очень сильно. Наибольшее абсолютное содержание хлорофиллов в листьях отмечено у к. пашенного (3.142 мг*г$^{-1}$ сырого веса в пойме и 3.740 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе), а наименьшее - у к. ползучего (2.864 мг*г$^{-1}$ сырого веса в пойме и 2.295 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе). У остальных изучаемых видов содержание хлорофиллов в листьях примерно одинаково и составляет у к. горного – 2.879 мг*г$^{-1}$ сырого веса в пойме и 3.073 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе; у к. альпийского – 3.071 мг*г$^{-1}$ сырого веса в пойме и 3.218 мг*г' сырого веса на водоразделе; у к. лугового – 3.235 мг*г$^{-1}$ сырого веса в пойме и 2.996 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе (рис. 1). Относительно содержания ксантофиллов у представленных видов наблюдается несколько иная картина. У всех видов кроме к. горного наблюдается уменьшение содержания ксантофиллов в листьях растений, растущих в пойме относительно растений, растущих на водоразделе. Наибольшее содержание ксантофиллов в листьях наблюдается у к. пашенного (1.369 мг*г$^{-1}$ сырого веса в пойме и 1.109 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе). У остальных видов содержание ксантофиллов в листьях составляет: у к. горного – 1.040 мг*г$^{-1}$ сырого веса в пойме и 1.294 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе; у к. альпийского – 1.093 мг*г$^{-1}$ сырого веса в пойме и 0.949 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе; у к. ползучего – 1.130 мг*г$^{-1}$ сырого веса в пойме 1.052 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе; у к. лугового-1.148 мг*г$^{-1}$ сырого веса в пойме и 0.704 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе (рис. 2). Таким образом, можно отметить, что у к. лугового наблюдается наибольшее относительное уменьшение содержания ксантофиллов в листьях на водоразделе по сравнению с поймой (38.7%). У к. пашенного и к. альпийского это уменьшение занимает промежуточное положение (19.0% и 13.2% соответственно), у к. ползучего оно сравнительно невелико (6.9%). Для к. горного характерно не уменьшение, а увеличение содержания ксантофиллов в листьях у растений, собранных на водоразделе по сравнению с теми, которые собраны в пойме на 24.4%. В результате определения содержания каротинов в листьях растений было выяснено, что у к. пашенного данный показатель составляет 2.899 мг*г$^{-1}$ сырого веса в пойме и 2.397 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе; у к. горного – 1.802 мг*г$^{-1}$ сырого веса в пойме1.467 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе; у к. альпийского – 1.018 мг*г$^{-1}$ сырого веса в пойме и 0.903 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе; у к. ползучего – 1.919 мг*г$^{-1}$сырого веса в пойме и 0.845 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе; у к. лугового – 3.233 мг*г' сырого веса в пойме 2.247 мг*г$^{-1}$ сырого веса на водоразделе (рис. 3). Следует отметить, что наибольшее содержание каротинов в листьях характерно для к. лугового (в пойме) и для к. пашенного (на водоразделе), а наименьшее - для к. альпийского. У всех видов наблюдается уменьшение содержания каротинов в листьях растений, растущих на водоразделе по сравнению с растениями,

растущими в пойме. При этом наибольшее относительное снижение характерно для к. ползучего (55.0%), а наименьшее - для к. альпийского (16.5%) У остальных видов оно составляет: у к. пашенного - 18.4%; у к. горного - 18.6%; у к. лугового - 30.5%. Таким образом, полученные результаты показывают, что особых различий по содержанию хлорофиллов в листьях разных видов клевера, произрастающих в пойме и на водоразделе, не обнаруживается (исключение клевер пашенный). Что касается каротинидов, то их содержание значительно выше в листьях всех видов клевера, произрастающих в пойме, чем на водоразделе.

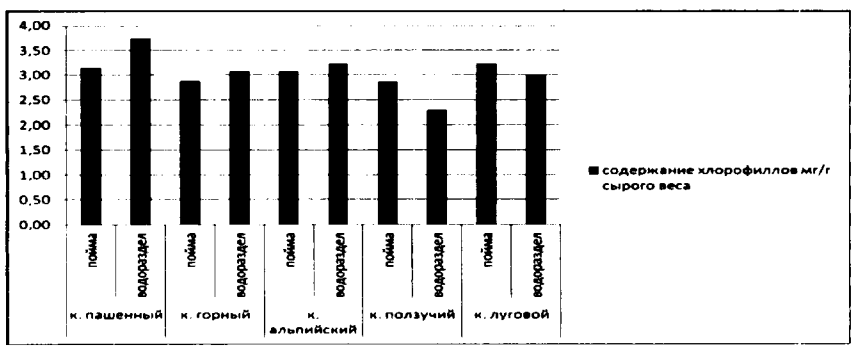


Рисунок 1 - Содержание хлорофиллов в листьях различных видов клевера в пойме и на водоразделе (среднее значение по трем биологическим повторностям)

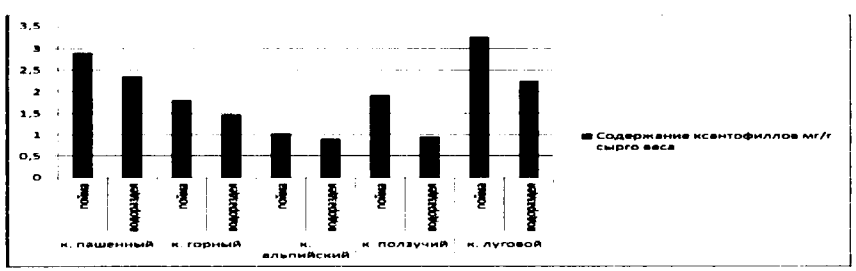


Рисунок 2 - Содержание ксантофиллов в листьях различных видов клевера в пойме и на водоразделе (среднее значение по трем биологическим повторностям)

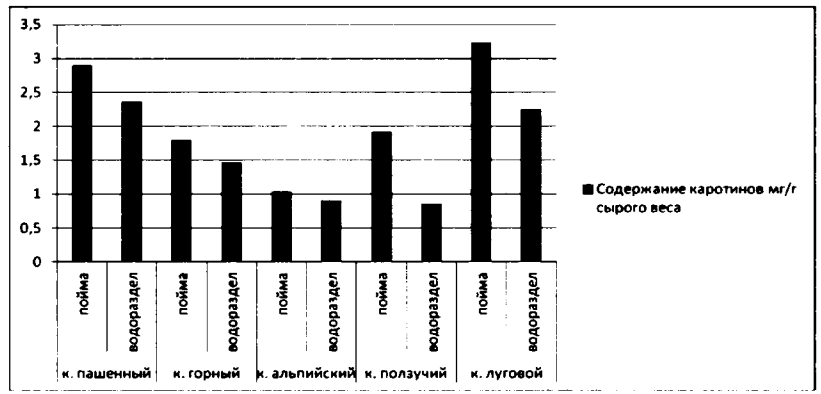


Рисунок 3 - Содержание каротинов в листьях различных видов клевера в пойме и на водоразделе (среднее значение по трем биологическим повторностям)

Для заметок

Физиологические показатели яровой пшеницы, структура урожая и урожайность при обработке семян препаратами из помета

А.В. Кравец

Сибирский научно исследовательский институт
сельского хозяйства и торфа Россельхозакадемии, г. Томск

В современном сельскохозяйственном производстве применение стимуляторов эффективно и оправдано, поскольку произведенные затраты окупаются. Использование стимуляторов из органического сырья актуально, так как такие продукты экологичны и достаточно дешевы. Птичий помет является возобновляемым органическим сырьем. Получение стимуляторов роста растений с высокой биологической активностью из помёта обусловлено наличием в нем макро-, микроэлементов, биологически активных веществ, в том числе гуминоподобных веществ, аминокислот и витаминов. Вместе с тем, не достаточно изучен механизм стимулирующей природы таких препаратов.

Цель данной работы заключается в оценке действия двух препаратов из помета на рост, развитие и показатели фотосинтетической деятельности яровой пшеницы в вегетационном и полевом опытах.

Препараты были получены щелочным гидролизом помета по способу Л.В. Касимовой [1] с аммиаком (аммонийный) и натриевой щелочью (натриевый). Исследуемые препараты представляют собой жидкости темно-коричневого цвета со специфическими запахами. Аммонийный стимулятор из помета имел концентрацию 2,4% сухой органической массы (ОМ), pH=7,0. Натриевый стимулятор из помета - 5,56% ОМ, pH = 13,0.

В работе исследован способ предпосевной обработки семян яровой пшеницы. Проведенные ранее лабораторные исследования позволили определить эффективные концентрации препаратов для обработки семян [2]. Концентрация натриевого препарата из помета для обработки семян составила 0,1% ОМ, аммонийного стимулятора - 0,05% ОМ.

Эффективность применения препаратов оценивали по результатам вегетационного и полевого опытов. В краткосрочном вегетационном опыте (21 день) проверили действие стимуляторов на рост и развитие яровой пшеницы сорта Новосибирская-29. Растения выращивали в почвенной культуре под люминесцентными лампами с интенсивностью света 40 Вт/м^2, продолжительность светопериода 12 часов, в 3-кратной повторности. Оценку влияния препарата отслеживали по нарастанию площади листовой поверхности и содержанию пигментов в листовом аппарате. Содержание пигментов определяли на 21 день в спиртовой вытяжке на спектрофотометре UV-1601 фирмы SHIMADZU (Япония), далее рассчитывали по формулам Вернона [3,4].

Был проведен полевой опыт на серой оподзоленной почве стационара «Лучаново» без минерального фона. Агрохимические свойства почвы имели следующие показатели: pH - 4,9, содержание гумуса 5,7%. Обеспеченность минеральным азотом и калием низкая, фосфором - средняя. Препарат применяли для предпосевной обработки семян яровой пшеницы сорта Иргина в дозе 10л/т семян. На контрольном варианте семена обрабатывали водой. Размещение делянок одноярусное, систематическое, повторность вариантов четырехкратная, размер делянки 30м^2[5]. Физиологические показатели вегетирующих растений измеряли по фазам вегетации. Полученные данные обрабатывали методом дисперсионного анализа с помощью пакета прикладных программ Snedekor [6].

Измерение высоты растений и площади ассимиляционного аппарата в вегетационном опыте проводили на 7, 14 и 21 день вегетации. Проведенные исследования показали, что в первые два срока измерений опытные растения были меньше контрольных. Так площадь ассимиляционной поверхности в опытных вариантах составила на 7-й день вегетации только 1,96-1,65см^2, тогда как в контроле 3,1 см^2. На 14 день вегетации показатели также отставали от контрольных. И только на 21 день вегетации показатели опытного варианта (аммонийный препарата) превысили контрольные (в контроле - 6,1см^2, в опыте - 8,1см^2). Определение площади листовой поверхности в вегетационном опыте позволяет говорить об увеличении ее под влияние аммонийного препарата из помета, тогда как натриевый препарат не оказывает такого влияния. Сухая масса листьев опытных вариантов незначительно отличается от контрольного варианта по трем срокам измерений. На 14 день вегетации чистая продуктивность фотосинтеза (ЧПФ) в опыте с аммонийным препаратом составила 2,96 мг/дм^2*сутки, тогда как в контроле только 2,39 мг/дм^2*сутки.

При определении содержания пигментов выяснилось, что обработка препаратами из помета увеличила содержание хлорофиллов a и b, каротиноидов. Оба препарата повысили содержание каротиноидов от 263 мкг/г сырой массы в контроле до 312-315 мкг/г в опытных вариантах. Аммонийный препарат повысил содержание суммы хлорофиллов от 1463 мкг/г в контроле до 1706 мкг/г. Натриевый препарат увеличил этот показатель до 2009 мкг/г сырой массы. То есть, можно констатировать положительное влияние двух препаратов из помета на физиологические показатели яровой пшеницы в условиях вегетационного опыта.

Обработка семян пшеницы препаратами из помета увеличила полевую всхожесть в варианте с аммонийным препаратом на 15,3%, натриевым препаратом на 4,2 % (всхожесть в контрольном варианте составила 65,3%).

Биометрические измерения растений в полевом опыте в фазу цветения показали, что при обработке семян натриевым препаратом увеличилась площадь листьев одного растения на 9,85 $см^2$, при обработке аммонийным препаратом – на 4,16 $см^2$ (площадь листьев в контрольном варианте составила 3,45$см^2$). Возросло количество листьев одного растения пшеницы в опытных вариантах: в контроле 3,45 штук, обработка аммонийным препаратом – 4,28 штук, обработка натриевым препаратом - 4,63 штук. По мнению ряда авторов [7,8] наиболее объективным показателем, связанным с продуктивностью растений, следует считать величину биомассы. Накопление биомассы в процессе вегетации в итоге отражается на величине биологической урожайности. По нашим данным увеличилась сухая масса 10 растений от 19,58г в контроле до 23,91г (аммонийный препарат) и 26,69г (натриевый препарат).

Интенсивность фотосинтеза зависит в первую очередь от количества пигментов в зеленом растении. Показатели содержания зеленых пигментов, измеренные в полевом опыте, незначительно превысили уровень контроля (2187мкг/г сырой массы) и составили 2216 мкг/г сырой массы в варианте с использованием натриевого препарата. Сумма хлорофиллов при воздействии аммонийного препарата была на уровне контроля. Содержание каротиноидов в опытных вариантах находилось на уровне контроля.

Абсолютные показатели содержания пигментов в вегетационном и полевом опытах различны. Это связано, прежде всего, с разным возрастом растений (в вегетационном опыте 21 день, в полевом опыте – 29 дней), с разницей в освещении (искусственное и естественная инсоляция), а также с сортовыми различиями яровой пшеницы.

Величина листовой поверхности служит важным показателем формирования высокого и качественного урожая зерна яровой пшеницы. Возросшие показатели проективного покрытия в разные фазы свидетельствуют о стимулирующем влиянии препаратов из помета. Так проективное покрытие в фазу кущения составило под действием аммонийного препарата 2,29 $м^2/м^2$, натриевого препарата – 2,54 $м^2/м^2$, тогда как в контроле было всего 1,72 $м^2/м^2$. В фазу цветения показатели опытных вариантов превышали контрольный вариант (контроль 2,99, аммонийный препарат – 3,36 $м^2/м^2$, натриевый препарата – 3,86 $м^2/м^2$). Несмотря на содержание пигментов на уровне контроля, возросшая площадь ассимиляционной поверхности в опытном варианте позволила увеличить массу снопа на 7-9% и повысить урожайность на 10-11%.

Чистая продуктивность фотосинтеза в опытных вариантах также превышала контрольный вариант. В фазу кущения ЧПФ в контрольном варианте составила 7,21 г/$м^2$*сутки, в варианте с использование аммонийного препарата – 9,3, натриевого 10,64 г/$м^2$*сутки. В фазу цветения эти показатели составили 24,19 г/$м^2$*сутки, 26,03 г/$м^2$*сутки и 26,42 г/$м^2$*сутки соответственно.

При анализе структуры урожая выяснилось, что обработка семян препаратами из помета увеличивает коэффициент продуктивной кустистости от 1,15 в контроле до 1,16 при обработке аммонийным препаратом и 1,20 при обработке натриевым препаратом. Возрастает число зерен в колосе от 22,6 штук в контроле до 26,6 и 26,9 штук в опытных вариантах соответственно. Такие изменения в показателях колоса позволили достоверно увеличить урожайность в опытных вариантах на 10 и 11% (27,68ц/га в контроле, 30,58 ц/га при обработке аммонийным препаратом и 30,71 ц/га при обработке натриевым препаратом).

Анализ качественных показателей зерна нового урожая показал, что натриевый препарат оставляет качество на уровне контроля, а аммонийный препарат увеличивает количество белка в зерне на 0,4%, количество клейковины на 0,8%.

Таким образом, аммонийный и натриевый препараты из помета положительно влияют на физиологические показатели, улучшают структуру урожая и увеличивают урожайность яровой пшеницы.

Литература

1. Патент 2213452 РФ, МКИ 7 AOI N 65/00. Способ получения стимулятора роста растений. Опубл. 10.10.03.

2. Касимова Л.В., Кравец А.В., Бобровская Д.Л., Сиротина Е.А., Семиошина Е.С., Хакимов И.Р. Стимулятор роста растений из помета //XII Межд. Науч.-практ. конф. «Аграрная наука – с-х производству Казахстана, Сибири и Монголии», т.1(растениеводство) Алматы: ТОО «Издательство «Бастау», 2009. – С. 115-117.

3. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев //Биохимические методы в физиологии растений /Под ред. О.А. Павлиновой. - М.: Наука. 1971. - С. 154-170.

4. Астафурова Т.П., Верхотурова Г.С., Зайцева А.П., Зотикова А.П., Собчак Р.О. Практикум по биохимии и физиологии растений. – Томск: Изд-во Томского ун-та, 2001. - 50с.

5. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1968. – 336с.
6. Сорокин О.Д. Прикладная статистика на компьютере. – Новосибирск, 2004. – 162с.
7. Андрианова Ю.Е., И.А Тарчевский. Хлорофилл и продуктивность растений. – М.: Наука, 2000. – 135с.
8. Ничипорович А.А. Теория фотосинтетической продуктивности растений // Итоги науки и техники. Физиология растений. - М.:ВИНИТИ, 1977. - Т.3. - С.11-54.

Для заметок

Влияние брассиностероидов на устойчивость растений рапса к засолению

А.В. Мануйлова, М.К. Малофий, И.С. Ковтун, М.В. Ефимова

Томский Государственный Университет, Томск

Более одной трети пахотных земель планеты в настоящее время засолено [1]. Причины засоления почв различны: начальное засоление материнской породы, использование соленой воды в аграрном производстве, низкий уровень осадков и высокая интенсивность испарения [2]. Последствия почвенного засоления проявляются в снижении продуктивности агро- и биоценозов, в падении биоразнообразия и экономических потерях для многих стран [3]. Одним из потенциальных способов защиты растений от хлоридного засоления может быть их обработка фитогормонами, среди которых наибольший интерес представляют брассиностероиды. Среди преимуществ брассиностероидов можно отметить их экологическую безопасность и способность вызывать эффекты в чрезвычайно низких концентрациях, по сравнению с другими гормонами. Вместе с тем, механизмы стресс-протекторного действия стероидных фитогормонов, остаются в настоящее время практически не изученными [4].

Исследования проводили на проростках рапса *Brassica napus* L. сорта Вестар. Изучали негативный эффект, вызываемый высокой концентрацией NaCl (175 мМ) на морфогенез и некоторые физиологические показатели проростков на белом свету. В качестве контроля использовали 7-суточные проростки, выращенные на дистиллированной воде. Ростовые показатели проростков (длина гипокотиля и корня), содержание фотосинтетических пигментов и пролина анализировали на 7 сутки от начала прорастания семян в условиях засоления. На основании ранее проведенных экспериментов нами выявлен гормон стероидной природы – эпибрассинолид (ЭБЛ) с высокой стресс-протекторной активностью при интенсивном засолении [5]. Протекторную роль гормона в концентрации 10^{-10} и 10^{-8} М оценивали по его способности снижать негативное влияние высокой концентрации NaCl на прорастание семян, накопление фотосинтетических пигментов, содержание пролина и развитие проростков рапса. Экстракцию и определение свободного пролина проводили по модифицированному методу Bates et al. [6, 7]. Уровень фотосинтетических пигментов (хлорофилл a и b) оценивали на спектрофотометре (Genesys 10, ThermoElectron, Германия). Концентрацию пигментов в спиртовой вытяжке рассчитывали согласно H.K. Lichtenthaler [8]. Длину гипокотилей и корней проростков рапса измеряли под лупой БМ-51-2 (КОМЗ, Россия). Эксперименты проводили не менее трех раз.

Наиболее губительный эффект NaCl оказывал на ранних этапах развития растений. Число проросших семян в присутствии 175 мМ NaCl не превышало 30 процентов от контроля. Засоление значительно подавляло рост зародышевого стебля (гипокотиля) и корня. Экзогенный ЭБЛ вне зависимости от концентрации значительно снижал негативный эффект засоления на прорастание семян и рост гипокотилей (рис. 1). Наибольшее защитное действие при засолении проявлял ЭБЛ в концентрации 10^{-8} М. В этом случае длина корня была в 4 раза больше по сравнению с длиной корня проростков, подвергнутых только засолению.

Содержание хлорофиллов при хлоридном засолении снижалось примерно в два раза (рис. 2). Высокая концентрация ЭБЛ (10^{-8} М) способствовала значительному повышению содержания пигментов и проявляла протекторный эффект при засолении, увеличивая уровень хлорофилла a.

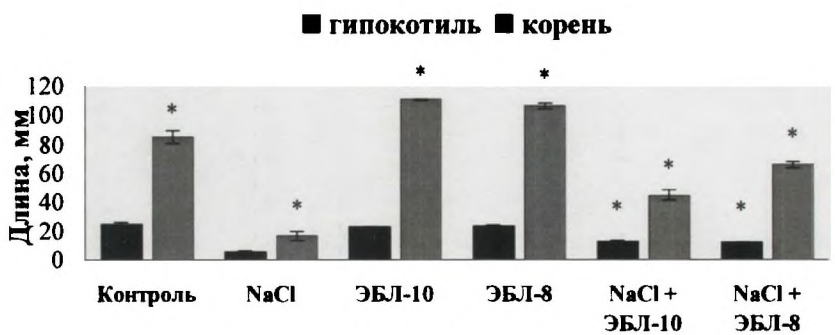


Рисунок 1 – Влияние экзогенного эпибрассинолида на ростовые показатели проростков рапса при засолении: ЭБЛ-10 и ЭБЛ-8 – эпибрассинолид в концентрации 10^{-10} М и 10^{-8} М соответственно

* – статистически значимые отличия от контроля ($p<0,05$)

Известно, что засоление вызывает водный дефицит у растений. При адаптации растений к нему ключевая роль принадлежит совместимым низкомолекулярным органическим осмолитам – аминокислотам, сахарам, сахаро-спиртам и бетаинам [9,10]. Аминокислота пролин является

универсальным совместимым осмолитом высших растений. Свободный пролин при стрессе обладает полифункциональным биологическим эффектом, который проявляется в осморегуляторной, антиоксидантной и энергетической функциях; помимо этого, пролин выступает в качестве химического шаперона [11].

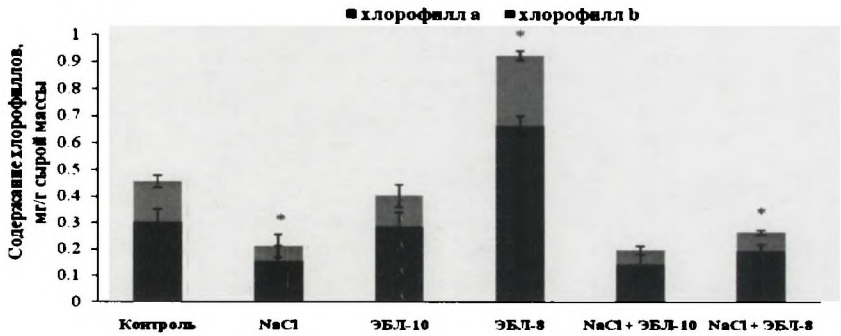


Рисунок 2 – Влияние экзогенного эпибрассинолида на уровень фотосинтетических пигментов при засолении: ЭБЛ-10 и ЭБЛ-8 – эпибрассинолид в концентрации 10^{-10} М и 10^{-8} М соответственно
* p<0,05

На рисунке 3 показано, что на хлоридное засоление проростки рапса отвечали 70-кратным увеличением содержания пролина. Значительное снижение уровня пролина вызывал экзогенный эпибрассинолид, который в 7-10 раз снижал NaCl-индуцированную аккумуляцию пролина; при этом наибольший эффект отмечен при высокой концентрации гормона (рис. 3).

При формировании защитных механизмов к хлоридному засолению эпибрассинолид одновременно повышал солеустойчивость проростков рапса и снижал уровень пролина. Возможно защитный эффект гормона реализуется через сохранение энергетических ресурсов растения, которые он бы мог потратить на синтез пролина.

Таким образом нами показано, что наряду с подавлением роста осевых органов, солевой стресс снижает уровень фотосинетических пигментов и повышает содержание пролина. Установлена высокая солезащитная активность эпибрассинолида на прорастание семян, рост проростков и накопление фотосинетических пигментов.

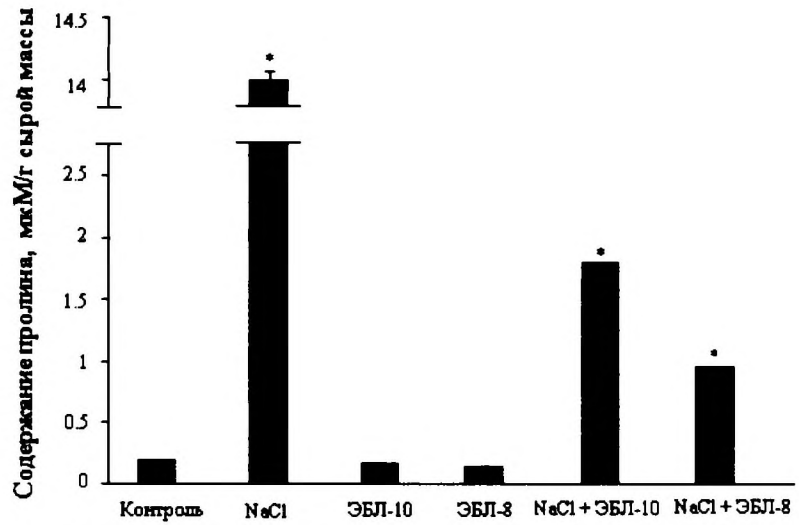


Рисунок 3 – Влияние экзогенного эпибрассинолида на содержание пролина при засолении: ЭБЛ-10 и ЭБЛ-8 – эпибрассинолид в концентрации 10^{-10} М и 10^{-8} М соответственно
* p<0,05

Исследования частично поддержаны РФФИ (12-04-31500 мол_а).

Литература

1. FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils / Rome, Italy: FAO Land and Plant Nutrition Management Service. 2005.
2. Shahid S.A., Rahman K. Soil salinity development, classification, assessment, and management in irrigated agriculture // Handbook of plant and crop stress. 3rd edition, Ed. M. Pessarakli. CRC Press Taylor & Francis Group, 2011. - P. 23–38.
3. KuznetsovVl.V., Shevyakova N.I. Polyamines and Plant Adaptation to Saline Environments / Desert Plants. - Heidelberg, Dordrecht, London, New York: Springer-Verlag, 2010. - P. 261–298.
4. Gomes M.M.A. Physiological effects related to brassinosteroid application in plants / Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone, S. Hayat, A. Ahmad. Eds. Springer Science +Business Media B.V., 2011. - P. 193–242.
5. Ефимова М.В., Хасан Ж., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Влияние брассиностероидов на прорастание семян и рост рапса на начальных этапах

онтогенеза при хлоридном засолении // Вестник РУДН, серия «Агрономия и животноводство». - 2012. - № 3. - С. 12–20.
6. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф., Ефимова М.В., Хрипач В.А. Действие эпибрассинолида на морфогенез и соотношение гормонов у проростков *Arabidopsis* на зеленом свету // Физиология растений. - 2002. - Т. 49. №4. - С. 591–595.
7. Ефимова М.В., Мануйлова А.В., Малофий М.К., Карташов А.В., Кузнецов Вл.В. Защитный эффект брассиностеродов на рост проростков рапса в условиях засоления // Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2013. №1(21). - В печати.
8. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods in Enzymology. - 1987. - № 148. - P. 350–382.
9. Радюкина Н.Л., Иванов Ю.В., Карташов А.В., Шевякова Н.И., Ракитин В.Ю., Хрянин В.Н., Кузнецов Вл.В. Изучение индуцибельных и конститутивных механизмов устойчивости к солевому стрессу у гравилата городского // Физиология растений. - 2007. - Т. 54. № 5. - С. 692–698.
10. Kuznetsov V.V., Shevyakova N.I. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides // Physiologia Plantarum. - 2006. - V. 100 (2). - P. 320–326.
11. Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. - 1999. - Т.46. № 2. - С. 321–336.

Для заметок

Влияние условий культивирования незрелых зародышей гороха в культуре in vitro

Сащенко М.Н.

Всероссийский НИИ сахарной свеклы им. А.Л. Мазлумова Россельхозакадемии, г. Воронеж

Введение

Проблемой любой селекционной программы является расширение диапазона генетической изменчивости с целью отбора или введения желаемых признаков для улучшения возделываемых сортов сельскохозяйственных культур. Половая гибридизация является одним из средств при создании генетического разнообразия исходного селекционного материала. Однако лишь ограниченное число межвидовых и межсортовых скрещиваний может привести к получению полноценных гибридных растений [1].

Для преодоления естественных барьеров несовместимости разработаны методы изолирования и выращивания в условиях in vitro зигот, незрелых зародышей и семяпочек, что позволило получить фертильные растения межвидовых и межродовых гибридов. Метод культуры незрелых зародышей используется тогда, когда невозможно эффективно получить определенную генетическую комбинацию желаемых признаков традиционными методами. В большинстве случаев барьер несовместимости при развитии гибридного зародыша возникает на средних и поздних стадиях эмбриогенеза. Обычно это проявляется в нарушении развития эндосперма или полном его отсутствии, что приводит к гибели зародышей. Специально подобранный состав компонентов питательных сред для культивирования незрелых зародышей предоставляет все необходимые вещества для нормального развития зародыша и, таким образом, заменяет эндосперм.

Цель исследований

Наиболее важным требованием при работе с изолированными зародышами является выбор подходящей питательной среды, поддерживающей их рост и развитие. Несмотря на то, что состав питательных сред варьирует в зависимости от вида культивируемых зародышей, очевидно, что чем моложе зародыш, тем выше требования к составу питательных сред.

Другой фактор, ограничивающий успех культивирования – это стадия развития зародыша, степень его дифференцировки в момент изоляции [2].

Цель исследований была направлена на разработку метода культивирования незрелых зародышей гороха, включающего основные этапы – стерилизация эксплантов, подбор состава питательной среды для получения регенерантов, определение оптимальных стадий развития зародыша для эксплантации.

Материалы и методы исследований

В работе использовались сорта и селекционный материал лаборатории селекции зернобобовых культур ВНИИСС. В качестве стерилизующего агента изучались хлор - и ртутьсодержащие вещества в различных концентрациях и экспозициях обработки. В работе использовали питательные среды с минеральной основой Мурасиге, Скуга (MS), содержащих витамины по Уайту, 100 мг/л мезоинозита, 30 г/л сахарозы и гормональный комплекс: бензиламинопурин (6-БАП), кинетин, гиббереллин (ГК), индолилуксусная кислота (ИУК), индолилмасляная кислота (ИМК), α-нафтилуксусная кислота (НУК). pH рабочей среды поддерживался на уровне 5,8-6,0. При разработке метода эмбриокультуры на питательные среды вводили семяпочки гороха на 3, 5, 8, 12 и более день развития.

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования по изучению стерилизующих агентов при введении незрелых зародышей гороха в культуру тканей показали, что изучаемые вещества отличаются своей активностью и действием на ткани эксплантов. Высокий стерилизующий эффект был отмечен при применении Ломаксхлора в концентрации 0,05% и времени экспозиции 60 минут. Стерильность эксплантов достигала 90%. Аномалий в развитии проростков не наблюдалось. Увеличение времени обработки семян изучаемым препаратом до 90 минут способствовало появлению ожегов 60-85% тканей. Состояние регенерантов было неудовлетворительным.

В связи с тем, что зародыши гороха имеют небольшие размеры и вычленение их без нанесения травм невозможно, введение в культуру производилось семязачатками. Проведенные исследования показали, что 3 – 5 дневные зародыши формировали до 3,8% нормально развитых проростков. Количество развитых проростков из 5 – 8 дневных зародышей составило 16,8%, из них нормально развитых – 10,5%. Частота регенерации из зародышей 8 – 12 дней после опыления была на уровне 33,4 %, из которых 26,9% нормально развитых. Максимальная частота регенерации (39,8%) была отмечена у зародышей старше 12 дневного возраста. Нормально развитые проростки формировались у 28,9 % зародышей. Развитие эксплантов шло быстро, через 14 – 20 дней проростки имели четко выраженный корень и стебель.

На среде без гормонов развитие зародышей не наблюдалось.

В основе всех методов культуры тканей лежит регулирование морфогенеза эксплантов с помощью экзогенных фитогормонов [3]. Поэтому следующей задачей наших исследований было определение оптимального гормонального комплекса питательной среды при разработке метода эмбриокультуры на горохе. Для этого в наших исследованиях были использованы различные сочетания и концентрации фитогормонов. В результате исследований было установлено, что наибольшая частота образования регенерантов (18,13%) наблюдалась на варианте № 1 питательной среды с добавлением 6 – БАП, Гк, Кн, ИМК по 0,1 мг / л. Регенеранты были нормально развиты, имели насыщенную окраску и характерные растению гороха признаки.

Полученный и размноженный в культуре in vitro селекционный материал необходимо укоренить для дальнейшего его использования в селекционном процессе. Проведенные исследования на горохе показали, что максимальное образование корней (42%) вызывала НУК в количестве 1,5 мг/л, среднее число корней было равно 2-3 штук, размер составлял 2-3 см. Высота растений колебалась от 3 до 5 см.

Выводы

Результаты проведенных исследований позволили разработать основные этапы культивирования незрелых зародышей гороха.

Показано, что наилучшим стерилизующим агентом при введении незрелых зародышей гороха является Ломаксхлор в концентрации 0,05 % и времени экспозиции 60 минут (стерильность до 90 %). Максимальной жизнеспособностью и склонностью к регенерации облададают незрелые зародыши в возрасте 8 дней. Для культивирования незрелых зародышей гороха необходимо использовать питательные среды, содержащие гормональный комплекс в составе 6 – БАП (0,1 – 0,2 мг / л), Гк (0,1 – 1,0 мг / л), Кн (0,1 мг / л), ИМК / ИУК по 0,1 мг / л. Для укоренения микроклонов гороха в культуре in vitro оптимальным фитогормоном является нафтилуксусная кислота в концентрации 1,5 мг/л.

Литература

1. Атанасов А.И. Биотехнология в растениеводстве. - Новосибирск: ИЦиГСО РАН, 1993. – 240 с.

2. Здруйковская–Рихтер А.И. Тканевые и клеточные культуры в селекции растений. - М.: Изд–во ВАСХНИЛ, 1979. – С. 57–70.

3. Кулаева О.Н. Цитокинины, их структуры и функция. - М.: Наука, 1973. – 264 с.

Для заметок

Влияние зелёного света на вегетативную стадию роста медицинских грибов *Lentinula edodes*

Л.Б. Глухова, Л.О. Соколянская, О.В. Карначук, Р.А. Карначук

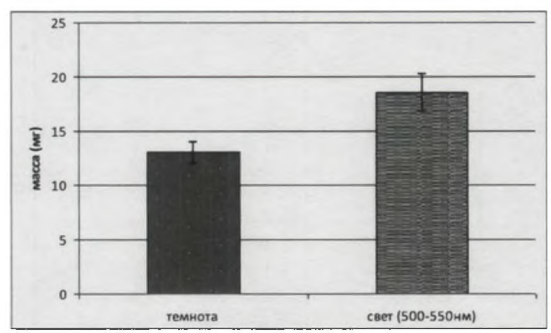
Томский государственный университет, г. Томск

Свет – один из важных факторов, который оказывает влияние на жизнедеятельность не только растений и животных, но и микроорганизмов, включая эукариотические грибы. Восприятие световых сигналов обусловлено присутствием фоторецепторов, воспринимающих определенную длину волны. В работах Р.А. Карначук с соавторами показана физиологическая роль зелёного света у растений [1 – 5]. У грибов выделяют три системы чувствительные к свету [6]. Фоторецепторами зеленого света могут быть родопсины, содержащие ретинальный хромофор, связанный с опсиновым апопротеином [7]. Гены опсинов были найдены у модельного аскомицета *Neurospora crassa*, однако их инактивация у нокаутных мутантов не приводила к выраженному фенотипу [8]. Эти гены также были обнаружены у базидиомицетов, но их функциональность остается невыясненной [9].

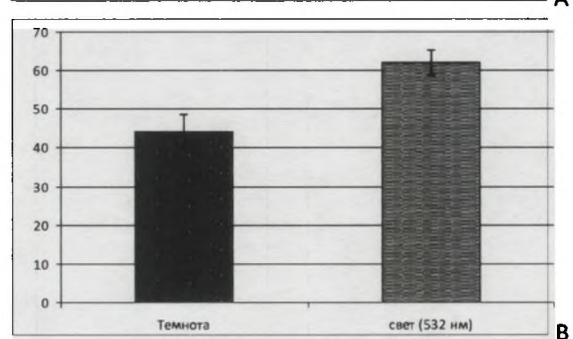
Цель данных исследований – изучение влияния зелёного света на вегетативную стадию роста медицинских грибов *Lentinula edodes* штамм W4. Мицелий выращивали в чашках Петри (диаметр 9см) на агаризованной среде Чапека. В работе использовали люминесцентные лампы (500 – 580 нм), световые диоды (500 - 550 нм) и лазер (532 нм). О действии света судили: 1. по скорости роста, 2. по накоплению воздушно-сухой биомассы. Облучение проводили в условиях различной интенсивности света: 0.44, 0.88, 1.77, 3.1 и 6.6 Вт/м^2 и временной экспозиции: 1, 5, 30 и 60 мин. Облучение проводили 1 раз в сутки после чего инкубировали мицелий в темноте. Действие зелёного света оценивали по отношению к контрольному мицелию, выращенному в темноте. Результаты экспериментов по измерению радиуса мицелия, облученного зелёным светом, не позволили выявить статистически значимых различий по сравнению с темновым контролем. Измерение биомассы воздушного мицелия показало, что кратковременное периодическое облучение зеленым светом оказывает стимулирующий эффект на рост мицелия. Наибольший выраженный эффект был отмечен при интенсивности света 1.77 Вт/м^2 и временной экспозиции 1 мин. Люминесцентные лампы характеризуются широким диапазоном излучения, включающим частично синюю область спектра. Для уточнения возможности влияния зеленого света использовали световые диоды и лазер с узкой полосой излучения. Эксперименты проводили по схеме аналогичной таковой с люминесцентными лампами. Интенсивность излучения составляла 0.04 Вт/м^2 и время экспозиции 1 мин. Измерение радиуса мицелия и определение удельной скорости роста показало стимулирующее влияние зеленого света по сравнению с контролем. Однако, облучение узким диапазоном спектра (532 нм) не оказывало статистически значимой стимуляции на скорость роста (Табл. 1). Накопление биомассы воздушного мицелия шло в 1.4 раза интенсивнее как при облучении широким, так и узким спектром зеленого света по сравнению с контролем (Рисунок 1) (p=0.01).

Таблица 1 – Удельная скорость роста мицелия *L.edodes* при облучении зеленым светом.

Интенсивность 0.04 Вт/м^2	контроль	1 мин
Световые диоды	0.357±0.005	0.374±0.002
Лазер	0.247±0.003	0.251±0.003



A



B

Рисунок 1 – Накопление биомассы воздушного мицелия при облучении: А – световыми диодами, В – лазером

Таким образом, зеленый свет при освещении люминесцентными лампами стимулирует накопление биомассы воздушного мицелия *L.edodes*. Стимуляция наиболее выражена при низкой интенсивности облучения (1.77 Вт/м^2) и кратковременной экспозиции (1 мин.). Облучение источниками зеленого света с узким диапазоном излучения (диоды, лазер) подтверждает, что эффект связан с действием определенной области спектра, близкой к 532 нм.

Литература

1. Карначук Р.А. Регуляторное влияние зеленого света на рост и фотосинтез листьев // Физиология растений. – 1987. - Т.34 – С.765.
2. Карначук Р.А. Гормональный баланс растений на свету разного спектрального состава / Карначук Р.А., Негрецкий В.А., Головацкая И.Ф. // Физиология растений. – 1990. - Т.37 – С.527.
3. Головацкая И.Ф. Влияние света на баланс фитогормонов и рост проростков овса / Головацкая И.Ф., Карначук Р.А., Никитина А.В., Пенкина Ю.В., Мусатеноко Л.И. // Физиология и биохимия культурных растений. – 2000. - Т.32 – С.453.
4. Головацкая И.Ф. Рост и гормональный баланс арабидопсиса на зеленом свету / Головацкая И.Ф., Карначук Р.А., Ефимова М.В. // Вестник Башкирского университета. - 2001. - № 2 – С.114.
5. Головацкая И.Ф. Роль криптохрома 1 и фитохрома А-Е в регуляции роста Арабидопсиса на зеленом свету / Головацкая И.Ф., Карначук Р.А., Ефимова М.В., Копылова Т.Н., Светличный В.А. // Вестник Томского государственного университета. – 2007. - Т.297 – С.184-187.
6. Purschwitz J., Muller S., Kastner Ch., Fischer R. Seeing the rainbow: light sensing in fungi // Curr. Opin. Microbiol. – 2006. – V.9. – P. 566-571.
7. Corrochano L., Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. Photochemical and Photobiological / Corrochano L // Sciences. – 2007. - V.6. - P. 725–736.
8. Bieszke J.A. A eukaryotic protein, NOP-1, binds retinal to form an archaeal rhodopsin-like photochemically reactive pigment / Bieszke, J.A., Spudich, E.N., Scott, K.L., Borkovich, K.A., and Spudich, J.L. // Biochemistry. – 1999. – V. 38. – P.14138–14145.
9. Brown L. S. Fungal rhodopsins and opsin-related proteins: eukaryotic homologues of bacteriorhodopsin with unknown functions // Photochem. Photobiol. Sci. - 2004 – №3. - P.555–565.

Для заметок

Влияние индолил-3-уксусной кислоты и мелатонина на ростовые процессы в растениях

Е.В. Соловьева, И.Ф. Головацкая

Томский государственный университет, г. Томск

Фитогормоны появились у многоклеточных растительных организмов в качестве специализированных регуляторных молекул для осуществления важнейших физиологических программ, требующих координированного функционирования удаленных друг от друга клеток, тканей и органов. Среди них только у одного вещества, индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), отмечено направленное полярное передвижение по тканям растительного организма. Поскольку градиенты концентрации ИУК являются основой для дифференциальной активности генома, то они действуют как мощнейший морфогенетический фактор у растений на уровне организма, сопровождая разные этапы его развития. Полярные потоки ауксина контролируют эмбриогенез, апикальное доминирование и формирование побегов, филлотаксис и опадение листьев, формирование сосудистой системы и боковых корней, тропизмы и цветение. ИУК регулирует рост растительных клеток. При этом, как и все фитогормоны, она имеет бимодальное влияние на рост растений, т. е. способствует росту при низких концентрациях и тормозит рост при высоких концентрациях. Профессором Р.А. Карначук [1] показано, что уровень эндогенной ИУК регулируется селективным светом и выступает одним из звеньев в цепи трансдукции светового сигнала.

Другим мало изученным в настоящее время соединением растений можно назвать мелатонин, имеющего одного и того же предшественника с ИУК. Как и у животных, предшественником этого соединения у растений является триптофан [2]. Мелатонин, синтезирующийся в одной с ИУК «метаболической вилке», возможно, выполняет аналогичные ауксину физиологические функции. Мелатонин был определен в наземных и подземных органах растений более чем у 100 видов. Содержание этого индоламина в растениях очень сильно варьирует: от 9,5 (*Asparagus officinalis*) до 5288,1 пг/г сырой массы (*Festuca aurundinacea*), что усложняет интерпретацию функций этого вещества в растении. С 1995 года начались исследования физиологической роли мелатонина в лекарственных и пищевых растениях [3, 4]. Было установлено его влияние на цветение *Chenopodium rubrum*, жизнеспособность клеток *Daucus carota* при холодовом стрессе, толерантность *Eichhornia crassipes* при воздействии токсичных органических веществ и тяжелых металлов. Кроме того, было показано повышение содержания мелатонина в растениях, подверженных воздействию высоких доз ультрафиолетового облучения [5].

В связи с тем, что роль мелатонина в растениях мало изучена, целью наших исследований было изучение влияния мелатонина и ауксина на ростовые процессы растений. Был исследован рост растяжением колеоптилей пшеницы, корней и побега растений арабидопсиса. В качестве объекта исследования служили колеоптили *Triticum vulgare* L. сорта Иргина. Отрезки колеоптилей, свободные от собственных ауксинов, инкубировали 18–20 часов в 2%-ном растворе сахарозы, содержащем различные концентрации гормонов ИУК и мелатонина. В конце эксперимента оценивали прирост отрезков по отношению к контролю (без добавления гормона). Нами проведены исследования также на 7-дневных проростках арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа Columbia дикого типа Col и его мутанта *axr1*, культивированных в стерильных условиях на белом свету люминесцентных ламп фирмы «Philips» с 14-ти часовым фотопериодом. Интенсивность светопотока составила 150 мкмоль квантов/м^{2}с. Мелатонин («Sigma» США) и ауксин («Sigma» США) добавляли в ½ агаризованную питательную среду MS в концентрациях 10^{-13}–10^{-6} М. Ростовые параметры были измерены с привлечением программы Moticam 2300 (Испания).

Известная функция ИУК растяжение клеток хорошо моделируется на отрезках колеоптилей злаков в зоне их растяжения, где клетки наиболее компетентны к ИУК. Анализ ростовых реакций колеоптилей в ответ на действие ИУК, показал, что гормон в диапазоне концентраций от 10^{-13} до 10^{-11} М не изменял их растяжение, тогда как в диапазоне концентраций от 10^{-10} до 10^{-6} М постепенно увеличивал их длину (рис. 1). Стимуляция растяжения клеток была максимальной при концентрации 10^{-7}–10^{-6} М ауксина и составила 30–40%. Действие мелатонина в исследуемом диапазоне концентраций достоверно не изменяло растяжение колеоптилей, что могло свидетельствовать о его инертности по отношению к росту клеток растяжением с помощью механизма закисления клеточных стенок, контролируемого ауксином.

Исследование совместного действия веществ на растяжение колеоптилей показало, что в присутствии мелатонина в концентрации 10^{-13} М низкие неактивные концентрации ИУК 10^{-13}–10^{-11} М не изменяли этот процесс. В то же время более активные концентрации ИУК в присутствии мелатонина стимулировали рост колеоптилей. При этом наиболее сильный эффект мелатонина на растяжение клеток был отмечен при концентрациях 10^{-7} и 10^{-6} М ИУК и составил 80%. При добавлении мелатонина в большей

концентрации 10^{-6} М активность ИУК в регулировании роста снижалась, в том числе и при ее высоких концентрациях 10^{-7}–10^{-6} М.

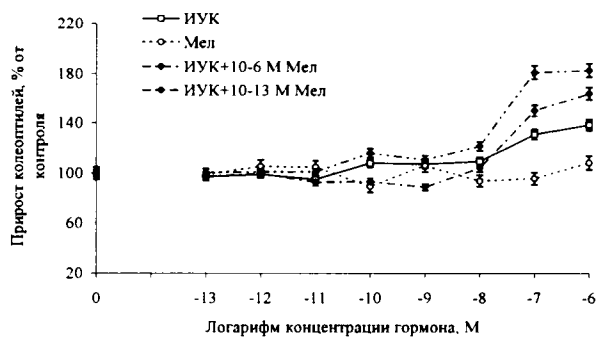


Рисунок 1 – Прирост отрезков колеоптилей пшеницы в зависимости от уровня ИУК, мелатонина (Мел) и их сочетания в питательной среде

Сравнение активности одной ИУК в процессах растяжения с активностью совместного действия веществ показало усиление эффекта ауксина под влиянием мелатонина. Полученные результаты, вероятно, свидетельствуют об изменении чувствительности колеоптилей к ИУК под влиянием мелатонина. Однако различия в действии низких и высоких концентраций мелатонина позволяет предполагать изменение не только взаимодействия ИУК с рецептором, но и ее транспорта или ионного окружения, поскольку мелатонин проявляет антиоксидантные свойства. Таким образом, показано совместное действие ИУК и мелатонина на растяжение клеток колеоптилей пшеницы, обусловленное различными механизмами действия каждого из гормонов.

В результате исследования роста проростков *A. thaliana* на белом свету были установлены различия в размерах корня и побега у разных линий. Нарушение полярного транспорта ИУК у мутанта *axr1* вызывало торможение роста корня относительно его нормального развития у дикого типа (данные не приведены). Длина гипокотиля мутанта также была меньше, чем у дикого типа. Вероятно, это было связано с дефицитом эндогенной ИУК в осевых органах проростков.

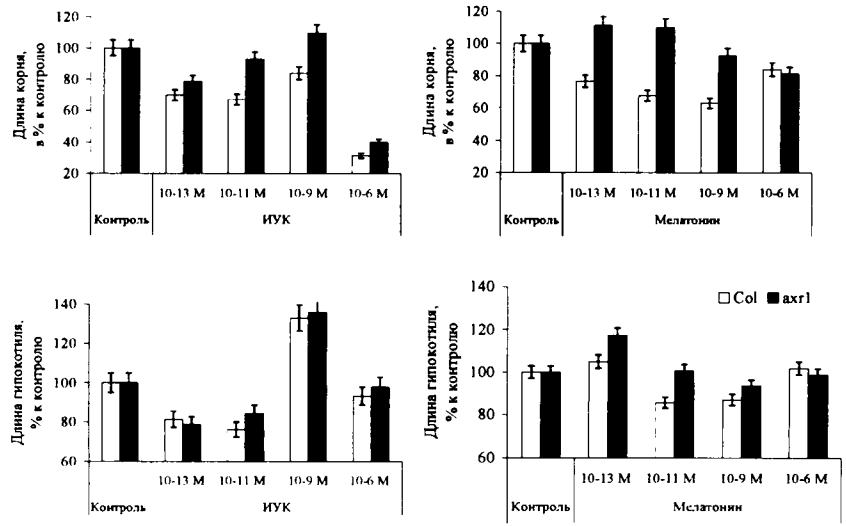


Рисунок 2 – Размеры корня и гипокотиля 7-дневных проростков арабидопсиса в зависимости от уровня ИУК и мелатонина в питательной среде на белом свету

Введение экзогенной ИУК исследуемых концентраций в питательную среду ингибировало растяжение корня проростков дикого типа. Наибольший ингибирующий эффект был отмечен при действии 10^{-6} М ИУК. Рост корня мутанта, вероятно, из-за недостатка собственного гормона активировался 10^{-9} М ИУК и слабее ингибировался другими концентрациями этого гормона по сравнению с исходной линией. Ростовая реакция гипокотилей у обеих линий *A. thaliana* на действие ИУК была одинаковой, что вероятно обусловлено жестким контролем корня над поступлением веществ в выше расположенные органы. При этом низкие и очень высокие концентрации тормозили растяжения гипокотиля. Оптимальной концентрацией для роста у Col и его мутанта *axr1* была ИУК в концентрации 10^{-9} М.

Присутствие мелатонина в питательной среде угнетало развитие корня дикого типа, тогда как ростовая реакция корня мутанта зависела от концентрации экзогенного вещества. Низкие концентрации мелатонина стимулировали растяжение корня, тогда как высокие ингибировали этот процесс. Оптимальной для роста корня была концентрация 10^{-13} М мелатонина. Реакция гипокотилей у проростков дикого типа на мелатонин

отличалась от реакции корня. Мелатонин оказывал меньшее ингибирующее действие на растяжение осевой части побега Col по сравнению с растяжением корня. У мутанта стимулирующий эффект 10^{-13} М мелатонина на рост гипокотиля сохранялся, тогда как другие концентрации не оказывали существенного влияния на рост гипокотиля.

Обобщая все выше сказанное можно отметить, что эндогенный уровень гормона ИУК влияет на эффективность действия мелатонина в регуляции роста органов арабидопсиса и колеоптилей пшеницы. Установлена органоспецифичность в реакции на экзогенные гормоны: корни более чувствительны к действию ИУК и мелатонина, чем гипокотили. В присутствие мелатонина повышалась активность ИУК на растяжение клеток колеоптилей пшеницы.

Исследования частично поддержаны государственным заданием ВУЗам на 2013 год (№ 01201256295).

Литература

1. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф. Гормональный статус, рост и фотосинтез растений, выращенных на свету разного спектрального состава // Физиология растений. - 1998. - Т. 45, вып. 6. С. 925–934.

2. Murch S.J, Campbell S.S, Saxena P.K. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin induced root organogenesis in vitro–cultured explants of St.John's wort (*Hypericum perforatum* L.) // J. Plant. - 2001. Vol. 37. - P. 786–793.

3. Hattori A., Migitaka H., Iigo M. et al. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates // Biochem. Mol. Biol. - 1995. - Vol. 35. - P. 627–634.

4. Chen G., Huo Y., Tan D.X., Liang Z., Zhang W., Zhang Y. Melatonin in chinese medicinal herbs // Life Sci. - 2003. - Vol. 73. - P. 19–26.

5. Kolar J, Machackova I. Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions // Pineal Res. - 2005. - N 39. - P. 333–341.

Для заметок

Влияние полициклических ароматических углеводородов на фотосистему II растений гороха

А.В. Ланкин[1], В.Д. Креславский[1,2], С.И. Аллахвердиев[1,2]

[1]Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
[2]Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино

В настоящее время исследованию процессов загрязнения окружающей среды различными поллютантами придаётся большое значение. Одни из наиболее распространённых и токсических загрязнителей – это полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Растения способны поглощать ПАУ как из атмосферы, так и из почвы, при этом они подвержены токсическому действию этих соединений. Это приводит к нарушению работы фотосинтетического аппарата (ФА), прежде всего фотосистемы II (ФСII), наиболее чувствительной к стрессовым факторам, которая поэтому может служить биоиндикатором действия ПАУ [1]. Действие ПАУ зависит от растворимости соединений, определяющей время достижения молекулярной мишени типа O_2-выделяющего комплекса ФСII, их химических свойств и способности связываться с потенциальной мишенью, такой как белок или мембрана. Показано, что влияние ПАУ зависит от типа соединения, от его концентрации и от продолжительности воздействия [1].

Тем не менее, механизмы подавления активности ФА и токсические эффекты ПАУ на растения неясны во многих деталях. В частности, не выяснены механизмы взаимодействия этих соединений с другими стрессовыми факторами, с различными компонентами ФА и механизмы передачи стрессового сигнала при действии ПАУ.

Повреждение ФСII было оценено путём измерения кривых индукции замедленной флуоресценции (ЗФл). Так же как и переменная флуоресценция, интенсивность ЗФл зависит от соотношения открытых (первичный акцептор ФСII Q_A окислен) и закрытых (Q_A восстановлен) реакционных центров (РЦ) ФСII. В отличие от переменной флуоресценции, миллисекундная ЗФл пропорциональна количеству открытых РЦ. Когда все центры закрыты, интенсивность ЗФл минимальна. Типичная кривая ЗФл Хл *a* характеризуется двумя фазами: быстрой, характеризуемой амплитудой I_1 и медленной, характеризуемой амплитудой I_m, которые разделены минимумом, обозначаемым как D.

Медленная компонента ЗФл возрастает с фотоиндуцированным развитием трансмембранного протонного градиента, который быстро индуцируется активацией ФСI и межсистемным электронным транспортом [2]. Тогда, амплитуда I_m относится к генерации протонного градиента (ΔpH). Когда транспорт электрона ФСII блокирован, например при внесении диурона, I_m, скорее всего, является результатом циклического транспорта электрона в ФСI.

В качестве объекта исследования использовали отделённые листья гороха (20-30 сут.) и препараты тилакоидных мембран из этих листьев. Использовали 2-, 3- и 4-ядерные соединения – нафталин, фенантрен и флуорантен, соответственно.

Предварительно исследовано изменение кривых индукции ЗФл после выдержки листьев в диуроне. Последний понижал как быструю, так и медленную компоненту кривых индукции ЗФл независимо от метода введения. Здесь медленная компонента I_m снижалась более значительно, чем быстрая компонента I_1. Кроме того, введение растворов шприцом давало более сильный эффект на ЗФл. Известно, что диурон подавляет электронный транспорт от Q_A к Q_B, следовательно снимает вклад от рекомбинации восстановленного вторичного акцептора Q_B^- и Q_B^{--}, с Z^+-компонентой ФСII, которая вносит вклад в миллисекундную ЗФл. Так как относительная амплитуда быстрой компоненты ЗФл $((I_1- D)/D)$ изменялась в меньшей степени при обработке диуроном, чем более медленная компонента $((I_m-D)/D)$, был сделан вывод, что быстрая компонента более связана с рекомбинацией Z^+ и Q_A^-, чем медленная.

После 2 ч выдержки листьев в растворах ПАУ мы не наблюдали каких-либо значительных изменений в параметрах кривых ЗФл, как с нафталином, так и с флуорантеном (табл. 1). Однако, когда вещества вводили под давлением с помощью 20 мл шприца, оба соединения (нафталин и флуорантен) влияли более значительно на параметры ЗФл, уменьшая оба отношения, исключая отношение $(I_1-D)/D$ для флуорантена.

После длительной выдержки в темноте мы наблюдали изменения в кривых ЗФл листьев при добавлении нафталина, которые были ещё более значительны при приложении давления (табл. 2). Также была тенденция к снижению при внесении флуорантена (Флу2). Под давлением снижение ЗФл (отношения $(I_m-D)/D$ и $(I_1-D)/D$) было более значительным как с нафталином, так и с флуорантеном. Однопроцентный ацетон воздействовал незначительно на кривые ЗФл. В случае использования более высокой концентрации флуорантена (отношение ацетон/вода – 1:24) действие флуорантена было значительным уже после одночасовой выдержки листьев в темноте.

При использовании препаратов тилакоидных мембран на кривых ЗФл обнаружена только быстрая компонента с максимумом 80 мс.

Изменения кривых ЗФл при внесении флуорантена были незначительны. Опыты с фенантреном показали несколько более сильные изменения кривых индукции. С нафталином обнаружено более значительное действие на кривые индукции ЗФл, оба соотношения (I_1-D)/D и I_2-D)/D) снизились почти до 0 при конечной концентрации 0,27 мМ. Действие самого ацетона (1%) на ЗФл было незначительно, но более высокая концентрация (4%) заметно воздействовала на параметры ЗФл.

Таблица 1 - Изменения параметров ЗФл отделённых листьев, выдержанных в присутствие ПАУ (флуорантен (Флу), нафталин (Наф)) в течение 2 ч. Контроль 1 – без давления и без ацетона. Контроль 2 – +ацетон (1%). Контроль 3 – +ацетон (1%) и давление; Флу2, Наф2 – ацетоновый (1%) раствор Флу и Наф, соответственно; Флу3, Наф3 – то же самое, но Флу и Наф введены под давлением. n = 10

Вариант	Отношение $(I_1$-D)/D	Отношение$(I_m$-)/D
Контроль1	0.42±0.17	2.1 ± 0.11
Контроль2	0.36±0.15	1.95 ± 0.12
Флу2	0.45±0.24	2.4±0.24
Контроль3	0.30± 0.09	1.8±0.17
Наф3	0.08± 0.06*	1.33 ± 0.15*
Флу3	0.26± 0,08	1.35 ± 0.13*

* – различия значительны (p<0.05)

Таблица 2 - Изменения параметров ЗФл отделённых листьев, выдержанных в растворах ПАУ в течение 18 часов. Символы 1,2,3 имеют тот же смысл, как в табл.1. Контроль 1 – без давления и без ацетона. Флу1 – +ацетон (0.5%). Остальные образцы – + ацетон (1%). n = 9

Вариант	Отношение $(I_1$-)/D	Отношение $(I_m$-D)/D
Контроль1	0.34±0.04	2.3±0.12
Флу1	0.16±0.05	1.85±0.17
Контроль2	0.28±0.1	2.2 ± 0,2
Флу2	0.2± 0.05	1.85 ± 0,15
Наф2	0.14± 0.035*	1.64± 0.13*
Контроль3	0.21± 0.04	1.7±0.2
Наф3	0.08± 0.035**	1.0± 0.15**
Флу3	0.12± 0.025**	1.14± 0.125**

*, ** – различия между контролем и опытом значительны (p< 0.05)

Известно, что значительное уменьшение ЗФл для быстрой компоненты (~0,1 с) отражает активность электронного транспорта в акцепторной части ФСII, а медленная компонента (~3-10 с), в свою очередь, отражает формирование протонного градиента в тилакоидных мембранах [3]. Длительное выдерживание листьев в темноте и использование высокого давления усиливает ингибирующий эффект. Это видно на примере с нафталином (табл. 1,2). Отношение (I_1-D)/D отражает скорость электронного транспорта на акцепторной стороне ФСII, который зависит от окислительно-восстановительного состояния Q_A, Q_B и пластохинонового пула PQ [3]. Мы наблюдаем снижение этого отношения с возрастанием концентрации нафталина и других ПАУ, скорее всего благодаря росту количества Q_B невосстанавливающих реакционных центров ФСII [4]. Это предполагает, что продукты трансформации ПАУ в результате метаболизации и фотомодификации, в частности, хиноны, могут влиять на ФСII и на электронный транспорт в ФСI. Отношение (I_m-D)/D отражает фотоиндуцированное образование протонного градиента в тилакоидных мембранах. Значительное снижение этой величины, показанное нами (табл. 1,2), означает снижение способности хлоропластов запасать энергию в виде ΔpH, что обычно одновременно связано со снижением скорости фотосинтетического электронного транспорта. С другой стороны, скорость электронного транспорта и ΔpH не связаны напрямую. Даже если электронный транспорт через ФСII подавлен в значительной степени, ΔpH может производиться за счёт циклического транспорта электронов вокруг ФСI. Формирование ΔpH, необходимого для высокого уровня нефотохимического тушения, требует функциональной целостности тилакоидных мембран [5]. Таким образом, ПАУ индуцируют окислительный стресс, ведущий к значительному нарушению целостности тилакоидной мембраны.

Таким образом, флуорантен и фенантрен благодаря своей низкой растворимости в воде слабо действуют на ФА. По-видимому, нужно длительное время для проявления их токсического действия, тогда как нафталин действует на ФА более эффективно, чем другие соединения, вероятно благодаря его более высокой растворимости в воде.

Литература

1. Kummerová M., Vráňová L. Chlorophyll fluorescence as an indicator of fluoranthene phototoxicity // PLANT SOIL ENVIRON. – 2007. – V.10. – P. 430–436.
2. Wraight C.A., Crofts A.R. Delayed fluorescence and light-energy state of chloroplasts // Europ. J. Biochem. – 1971. – V.19. – P. 386–397.

3. Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Strasser R.J. Delayed fluorescence in photosynthesis // Photosynth. Res. – 2009. – V. 101. – P. 217–232.
4. Biel K., Fomina I.R., Kreslavski V.D., Allakhverdiev S.I. Methods for assessment of activity and stress acclimation of photosynthetic machinery in cyanobacteria and symbiotic microalgae, in: W. Kliner, S.N. Bogchi, P. Mohanty (Eds.), Protocols on Algal and Cyanobacterial Research, Narosa Publishing House, New Delhi, 2009. – P. 195–214.
5. Zhang L., Xing D. Rapid determination of the damage to photosynthesis caused by salt and osmotic stresses using delayed fluorescence of chloroplasts // Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – V.7. – P. 352–360.

Для заметок

Влияние синтетических простагландинов на биохимические процессы в проростках тритикале

М.А. Капустин[1], Н.В. Гавриленко[1], В.П. Курченко[1], Е.М. Лапковская[1], В.М. Юрин[1], Ф.С. Пашковский[2], Ф.А. Лахвич[2]

[1]Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь
[2]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

Разработка средств защиты сельскохозяйственных растений от воздействия негативных факторов окружающей среды является чрезвычайно важной и актуальной задачей. Использование синтетических химических препаратов или пестицидов с одной стороны позволяет повысить урожайность, но вместе с тем приводит к негативным экологическим последствиям. В настоящее время усиливается внимание к разработке пестицидов нового поколения, обладающих высокой специфичностью действия в отношении патогенов и максимальной безопасностью для биосферы. С этих позиций наиболее перспективным направлением представляется применение биологически активных веществ природного происхождения и их синтетических аналогов, так называемых «биорациональных пестицидов». Использование таких препаратов основано на естественных принципах биорегуляции [1].

Ведущая роль в активации и ингибировании биохимических процессов в растительном организме принадлежит фитопростаноидам [2, 3]. Эти биомолекулы относятся к группе оксилипинов, включающую простогландин-подобные соединения жасмонатного типа и С18-изопростаноиды, которые синтезируются в ходе окислительной трансформации ненасыщенных жирных кислот. В растениях субстратом для синтеза фитопростанов преимущественно являются линолевая и линоленовая кислоты [3, 4]. Образующиеся оксигенированные продукты обладают широким спектром биологических активностей и вызывают в растительном организме различные физиолого-биохимические эффекты [5].

Характерной чертой природных простаноидов является непродолжительность действия, обусловленная коротким временем жизни [6]. Работы по получению химически более устойчивых синтетических аналогов фитопростаноидов были проведены в ИБОХ НАНБ.

Целью работы являлось исследование влияния предпосевной обработки семян тритикале синтетическими простаноидами на биохимические процессы в проростках.

Для определения экзогенного действия исследуемых веществ на метаболические реакции в проростках, семенной материал тритикале обрабатывали в течение 24 часов растворами с разными концентрациями синтетических простаноидов ЛЕ5Г (5-(гептиламино)-4-(4-метоксибензил)-2,3-дигидрофуран-3-он), ЛЕ3Г (N-Гептил-2-{5-[(2-(гептиламино)-4-оксо-4,5-дигидрофуран-3-ил)метил]-2-метоксифенокси} ацетамид) и ЛЕ11К ((Е)-Метил-6-(4-оксо-3-циннамил-4,5-дигидрофуран-2-иламино) гексаноат) (рисунок 1).

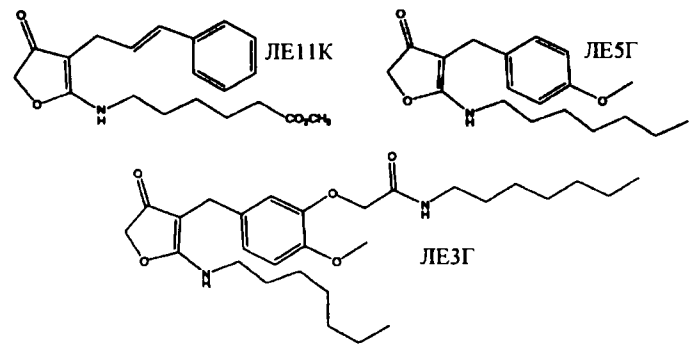


Рисунок 1 – Структурные формулы простаноидов ЛЕ3Г, ЛЕ5Г и ЛЕ11К

Обработанные семена высаживали в рулоны и через 7 дней анализировали основные биохимические параметры в проростках. Для выявления изменения белкового пула и активности различных изоформ пероксидаз была проведена экстракция белков из клеток листьев проростков по методу Сафоновых с последующим электрофоретическим исследованием [7]. Определение общего протеина в экстрактах проводили по методу Брэдфорд. Содержание общих фенолов определяли методом Фолина-Чикольтеу [7].

Анализ данных показал, что обработка семян тритикале растворами простаноида ЛЕ3Г в концентрациях 10^{-9} и 10^{-8} М вызывала снижение содержания общего белка в проростках по сравнению с контролем на 18% и 15%, соответственно. Использование более высоких концентраций препарата не приводило к достоверным изменениям суммарного количества протеинов в проростках тритикале. Применение растворов простаноида ЛЕ5Г в концентрациях 10^{-7}–10^{-4} М вызвало обратный физиологический эффект. Фитопростаноид в концентрации 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} и 10^{-4} М вызывал увеличение

содержания общего белка в проростках на 53%, 46%, 27% и 17%, соответственно. Простаноид ЛЕ11К также индуцировал синтез и накопление белков в клетках семидневных проростков. Данный эффект наблюдался при использовании растворов с концентрацией препарата 10^{-8}–10^{-4} М. Максимальное увеличение содержания белка наблюдалось при концентрациях ЛЕ11К 10^{-5} и 10^{-4} М и составило 24% и 30%, соответственно.

Результаты ДСН-электрофореза показали, что обработка семян растворами с различными концентрациями простаноида ЛЕ3Г приводит к уменьшению содержания двух основных белков с молекулярными массами около 52 и 16 кДа (субъединицы фермента рибулозобисфосфаткарбоксилазы). Содержание белка массой 52 кДа (L-субъединица) в пробах по сравнению с контролем снизилось на 6%, 18% и 30 % при действии синтетического простагландина ЛЕ3Г в концентрациях 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-8} М, соответственно, а при обработке препаратом в концентрациях 10^{-7} и 10^{-9} М – на 15% и 25%. Снижение содержания белка с молекулярным весом 16 кДа (S-субъединица) составило 2%, 17%, 4%, 28% и 31% соответственно концентрациям ЛЕ3Г 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} М. Анализ действия простаноида ЛЕ5Г показал, что с уменьшением действующей концентрации произошло увеличение содержания белков с молекулярными массами около 52 и 16 кДа. Содержание фракции белков L-субъединицы возрастало в пробах по сравнению с контролем на 24%, 32%, 41%, 44% при действии синтетического простагландина ЛЕ5Г в концентрациях 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} М, соответственно. Применение фитопростаноида в концентрациях 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} М вызывало увеличение содержания протеиновой фракции S-субъединицы на 17%, 27% и 52%, соответственно, а при действии в концентрации 10^{-4} М – снижение на 33%. Изменения содержания белков с молекулярной массой около 52 и 16 кДа в проростках тритикале сорта «Микола» после обработки семян простаноидом ЛЕ11К не коррелировали с изменением действующих концентраций препарата.

Обработка семян простаноидами вызвала изменение удельной активности пероксидаз по сравнению с контролем. При действии простаноидов ЛЕ3Г в ряду исследуемых концентраций наблюдалось изменение удельной активности на 49%, 12%, 9%, 47% и 43% соответственно концентрациям препарата 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} М Обработка семян тритикале сорта «Микола» фитопростаноидом ЛЕ5Г вызвала снижение активности пероксидаз в листьях семидневных проростков. При действии препарата в концентрациях 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} М наблюдалось уменьшение данного показателя на 32%, 31%, 35% и 29%, соответственно. Применение простаноида ЛЕ11К в концентрациях 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} и 10^{-9} М привело к соответственному увеличению удельной активности пероксидаз в проростках тритикале на 20%, 60%, 56% и 9%. Обработка семян 10^{-7} М и 10^{-8} М растворами фитопростаноида ЛЕ11К вызвало снижение этого показателя на 28% и 21%, соответственно.

Данные, полученные в результате электофоретического исследования, показали наличие в образцах нескольких изоформ пероксидаз, отличающихся по активности. Изменение удельной активности пероксидаз в белковых экстрактах листьев проростков по сравнению с контролем составило 30–60% при действии фитопростаноидов ЛЕ3Г, ЛЕ5Г и ЛЕ11К в ряду исследуемых концентраций.

В ходе анализа водно-спиртовых экстрактов проростков показано изменение содержания фенольных соединений в листьях при действии простаноидов в концентрациях 10^{-4}–10^{-9} М в пределах 5–22%. По данным ВЭЖХ можно заключить, что обработка семян растворами простаноида ЛЕ3Г в концентрациях 10^{-5}–10^{-7} М оказала стимулирующее действие на синтез флавоноидов, а применение фитопростаноидов ЛЕ5Г и ЛЕ11К в диапазоне концентраций 10^{-4}–10^{-7} М ингибирует синтез этих веществ.

Таким образом, исследовано влияние ряда синтетических фитопростаноидов на биохимические процессы в проростках тритикале. Была проведена оценка влияния обработки семян тритикале сорта «Микола» растворами с различными концентрациями простаноидов ЛЕ3Г, ЛЕ5Г и ЛЕ11К на пул общих белков клеток листьев проростков, на удельную активность и индукцию образования различных изоформ пероксидаз, на содержание общих фенолов и синтез вторичных метаболитов флавоноидной природы. Полученные данные свидетельствуют о том, что использование фитопростаноида ЛЕ3Г в низких концентрациях вызывает снижение содержания общего белка в проростках. Использование 10^{-5}–10^{-9} М растворов фитопростаноида привело к увеличению содержания флавоноидов по сравнению с контролем. Обработка семян простаноидом ЛЕ5Г в низких концентрациях вызывает в проростках увеличение содержания белка, общих фенолов, снижение пероксидазной активности во всех исследованных концентрациях и ингибирование синтеза флавоноидов. Использование фитопростаноида ЛЕ11К в высоких концентрациях приводит к увеличению содержания общего белка в проростках и не влияет на содержание общих фенолов в ряду исследованных концентраций. Изменение удельной активности пероксидаз носит колоколообразный характер и максимальное увеличение этого показателя по сравнению с контролем наблюдается при использовании простаноида в концентрации 10^{-8} М; ингибирование синтеза

флавоноидов наблюдается во всех исследуемых концентрациях и также имеет колоколообразную зависимость.

Таким образом, обработка семян простаноидами ЛЕ3Г, ЛЕ5Г и ЛЕ11К вызывает в проростках тритикале разнообразные и разнонаправленные физиологические эффекты, степень проявления и направление которых может отличаться не только для разных препаратов, но и для одного фитопростаноида в ряду исследованных концентраций.

Литература

1. Лахвич, Ф.А. Биорегуляторы: лечебные и диагностические препараты. Химические средства защиты растений / Наука народному хозяйству. Мн., 2002. – С. 611–641.
2. Taber, D.F. A nomenclature system for isoprostanes / D.F. Taber, J.D. Morrow, J.L. Roberts II // Prostaglandins. – 1997. – Vol. 53. – P. 63–67.
3. Thoma, I. The isoprostanoid pathway in plants / I. Thoma, M. Krischke, C. Loeffler // Chemistry and Physics of Lipids. – 2004. – Vol. 128. – P.135–148.
4. Stumpe, M. Formation of oxylipins by CYP74 enzymes / M. Stumpe, I. Feussner // Phytochemistry Reviews. – 2006. – Vol. 5. – P. 347–357.
5. Колупаев, Ю.Е. Жасмоновая кислота у растений: синтез, сигналинг и физиологические эффекты при стрессах / Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец // Вісник харківського національного аграрного університету. Серія біологія., – 2010. – Т. 1, № 19. – С. 21–33.
6. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants / I. Thoma [et al.] // The Plant Journal. – 2003. – Vol. 34. – P. 363–375.
7. Влияние обработки семян тритикале сорта «Микола» простаноидом ЛЕ5Г на ростовые и биохимические процессы в проростках / М.А. Капустин [и др.] // Труды БГУ. – 2009. – Т. 4, № 2. – С. 243–255.

Для заметок

Динамика содержания фитоэкдистероидов в новом продуценте *Silene colpophylla* Wrigley

А.А. Селиверстова, Л.Н. Зибарева.

Сибирский ботанический сад ТГУ, г. Томск

Silene colpophylla Wrigley - эндемик, произрастающий в юго-восточной части Франции и сопредельных территориях [1]. Данный вид является ценным продуцентом и сверхконцентратором биологически активных соединений, таких как экдистероиды, фенилпропаноиды, тритерпеновые сапонины и многих др. [2].

Такие растения находят широкое применение в медицине и сельском хозяйстве. Важным свойством многих смолевок является их успешная адаптация к различным климатическим условиям, в том числе и весьма суровым условиям Западной Сибири, с сохранением способности к биосинтезу БАВ [3].

Образцы *S. colpophylla* культивируются в Сибирском ботаническом саду ТГУ с 2009 года. Семена растений получены из ботанического сада Парижа (Muséum National d'Histoire Naturelle). В условиях Западной Сибири растения ведут себя как двулетние травянистые с прямостоящими стеблями до 1 м высотой. Проходят весь вегетативный цикл, формируя полноценные семена на 2-ом году жизни.

Фитоэкдистероиды - широко известная группа природных нетоксичных полиоксистероидов, служащая основой для многих современных препаратов. Выявлен широкий спектр физиологического действия фитоэкдистероидов, в том числе анаболическое, иммуностимулирующее, радиопротекторное, гемореологического, адаптогенное. Содержание фитоэкдистероидов в растениях является высокоинформативным показателем, позволяющим решать задачи хемосистематики и видоопределения. Эта группа вторичных метаболитов имеет большое химическое разнообразие структур, доказана их устойчивая внутривидовая и внутриродовая корреляция [4].

Целью данной работы являлось изучение динамики содержания фитоэкдистероидов в надземной части нового продуцента *S. colpophylla*, культивируемого в Сибирском ботаническом саду.

Определение состава фитоэкдистероидов проводили по доминирующему компоненту - 20-гидроксиэкдизону (20Е). Определение 20Е проводили методом ВЭЖХ. На рисунке 1 приведена хроматограмма, иллюстрирующая экдистероидный профиль *S. colpophylla*. 20-гидроксиэкдизону - соответствует пик со временем удерживания 16,15 мин.

Сезонную динамику и особенности накопления 20Е определяли в образцах двух поколений *S. colpophylla*, собранных в течение двух вегетационных периодов 2009-2012 гг.: 1-ый год жизни растений - начало вегетации, 2-й - год - начало вегетации, бутонизация, цветение и плодоношение. Для анализа использовали хроматоспектрофотометрический метод [5]. Хроматографическое разделение этанольных экстрактов проводили в системе растворителей хлороформ- этанол- ацетон. Элюирование 20Е осуществляли 96 % этанолом. Спектрофотометрическое определение 20Е осуществляют при длине волны 243 нм.

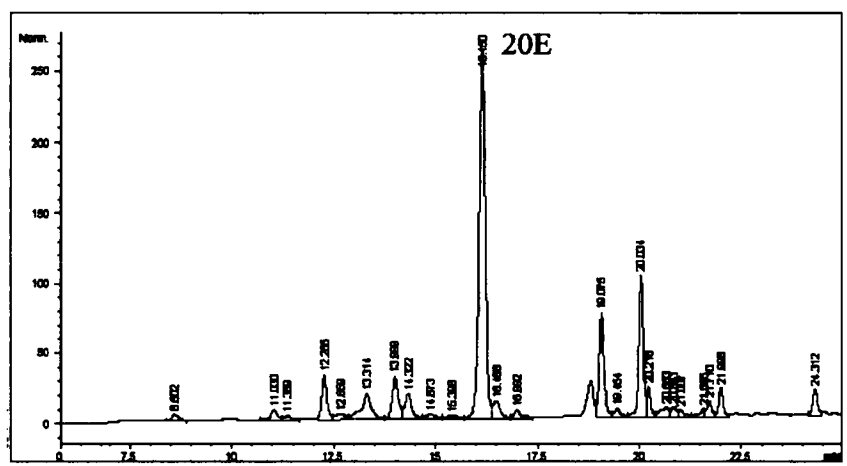


Рисунок 1 - Экдистероидный профиль *S. colpophylla*

Результаты исследования приведены на Рисунке 2.

Пик накопления 20Е в надземной части наблюдается в начале вегетации второго года жизни, а минимальное значение достигается в период созревания семян. Однако при использовании *S. colpophylla* в качестве сырья для получения экдистероидов необходимо учитывать биомассу каждой фенофазы растения. Своего пика биомасса *S. colpophylla* достигает в момент цветения. С учетом соотношения масса: выход экдистероидов наиболее продуктивно производить сбор растительного сырья в фазу бутонизации.

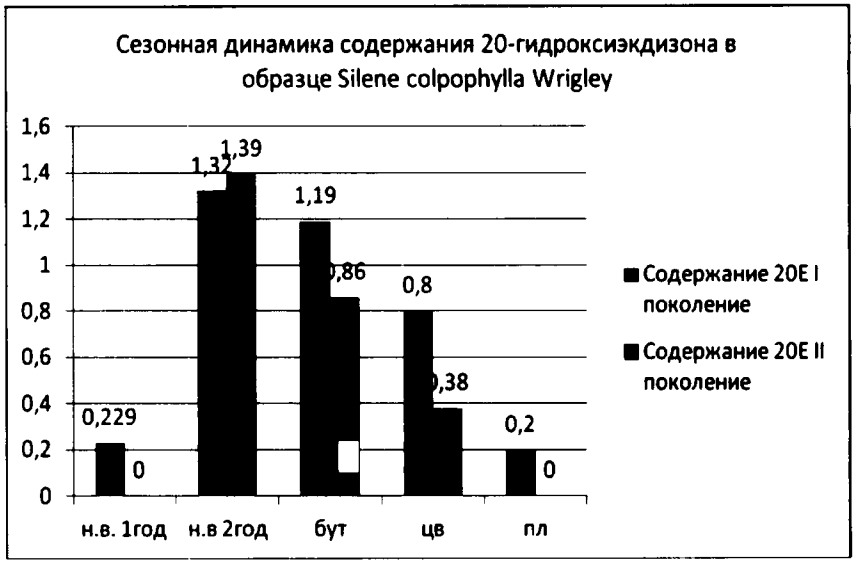


Рисунок 2 - Динамика содержания 20-гидроксиэкдизона в *Silene colpophylla*

Как следует из рисунка 2, во втором поколении растений, произрастающих в условиях Западной Сибири, не происходит значительного снижения содержания уровня 20E, а в фазе начала вегетации (2 год) происходит даже некоторое увеличение его количества.

Такой характер распределения фитоэкдистероидов является достаточно характерным для многолетних смолевок [6].

Литература

1. Tutin T. G. et al.Flora Europaea ed 2. V.1, 1993.

2. Zibareva L.N., Seliverstova A.A., Suksamrarn A., Athipornchai A., Wonganan O. The distribution of phytoecdysteroids in section Otites Otth. of genus Silene. 4th Annual Russian-Korean Conference "Current Issues of Natural Products Chemistry and Biotechnology" September 18-21, 2012. - P.139.

3. Мунхжаргал Н., Зибарева Л.Н., Лафон Р., Прибыткова Л.Н., Писарева С.И. Изучение качественного состава и содержания экдистероидов дикорастущей в Монголии и интродуцированной в Западную Сибирь *Silene Repens* // Химия растительного сырья. – 2009. – Т. 4. – С.133-138.

4. Зибарева Л.Н., Еремина В.И., Иванова Н.А., Лазьков Г.А. Распределение фитоэкдистероидов в трибе *Sileneae Dumort. (Caryophyllaceae Juss.)* // Растительные ресурсы. – 2003. – Т.39, №3. – С. 45-53.

5. Якубова М.Р., Генкина Г.Л., Шакиров Т.Т., Абубакиров Н.К. Хроматоспектрофотометрический метод определения экдистерона в растительном сырье. – 1978. – Т. 6. – С. 737-740

6. Зибарева Л.Н., Еремина В.И. Динамика содержания экдистероидов в видах *Silene* // Растительные ресурсы. – 1996. - Т. 32, №1. – С.106-110.

Для заметок

Зависимость морфогенеза арабидопсиса от уровня экзогенного мелатонина и фотопериода синего света

У.А. Комарова, И.Ф. Головацкая

Томский государственный университет, г. Томск

В настоящее время установлено, что гормон сна мелатонин (Мел) принимает участие в поддержании циркадного ритма животных, поскольку он непосредственно воздействует на клетки и изменяет уровень секреции других гормонов и биологически активных веществ, концентрация которых зависит от времени суток. Смена ритма свет/темнота является основным фактором, регулирующем синтез самого Мел и мелатонин-зависимых биоритмов. Обнаружение Мел в растениях инициировало изучение функциональных эффектов Мел и его роли в фотосинтезирующем организме [1, 2]. На примере морской макроводоросли Ulva показано, что содержание Мел зависит от полулунных ритмов, и согласуется со временем года [2]. В связи с недостаточно изученной ролью Мел в биоритмах растений целью наших исследований было установление зависимости морфогенеза арабидопсиса от уровня экзогенного мелатонина в условиях циркадного фотопериода на синем свету.

Объектом исследования служили 5-дневные проростки арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа Columbia (Col), культивированные в асептических условиях на синем свету, полученном от люминесцентных ламп фирмы «Philips» с 7-ми и 14-ти часовым фотопериодом. Интенсивность светопотока составила 150 мкмоль квантов/м^{2}с. Мелатонин («Sigma» США) добавляли в 50%-ную агаризованную питательную среду MS в диапазоне концентраций 10^{-13} – 10^{-6} М. Ростовые параметры проростков были измерены с привлечением программы Moticam 2300 (Испания).

Известно, что программа фотоморфогенеза растений включает серию ростовых реакций, обусловливающих выполнение процесса фотосинтеза. Типичными реакциями на свет являются: ингибирование растяжения осевой части побега и стимуляция растяжение фотосинтезирующей поверхности. В ходе нашего эксперимента установили, что размеры проростков арабидопсиса зависели от продолжительности светлого времени суток. Увеличение продолжительности освещения с 7 до 14 ч в течение 24-часовых суток приводило к трехкратному уменьшению линейных размеров гипокотиля. Одновременно с торможением растяжения гипокотиля происходило 2,5-кратное увеличение длины корня. Следует предположить, что в основе таких изменений ростовых параметров лежало изменение донорно-акцепторных связей между корнем и побегом, затрагивающим транспорт питательных и регуляторных веществ.

Введение в питательную среду 10^{-13} М Мел на коротком дне вызывало укорочение гипокотиля и удлинение корня, что напоминало реакцию на свет. Вероятно, Мел включал светозависимые реакции. Поскольку на длинном дне отсутствовали изменения размеров проростка по сравнению с контролем без гормона, то можно предположить, что в этом световом режиме снижалась чувствительность ростовых ответов к действию Мел. Подтверждением нашей гипотезы служили данные о дозовой зависимости морфогенеза от Мел: на коротком дне с увеличением концентрации Мел увеличивались размеры оси побега, но уменьшались размеры корня. На длинном дне происходило торможение роста корня, размеры гипокотиля не изменялись. Таким образом, полученные данные свидетельствовали о повышенной чувствительности ростовых реакций к Мел на коротком дне. Исследования будут продолжены.

Исследования частично поддержаны Госзаданием Минобрнауки России ВУЗам (№01201256295).

Литература

1. Kolar J, Machackova I. Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions // Pineal Res. - 2005. - N 39. - P. 333–341.

2. Tal O., Haim A., Harel O., Gerchman Y. Melatonin as an antioxidant and its semilunar rhythm in green macroalga Ulva sp. // J Exp Bot. - 2011. – V.62(6). - P. 1903–1910.

Для заметок

Изучение биоразнообразия накопительных культур из вольфрамово-молибденового месторождения Бурятии

П.А. Бухтиярова[1], А.Л. Герасимчук[1], О.П. Иккерт[1], Э.В. Данилова[2], О.В. Карначук[1]

[1]Томский государственный университет, г. Томск
[2]Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ

Бом-Горхонское вольфрамово-молибденовое месторождение расположено в юго-восточной части Забайкальского края, недалеко от села Новопавловка и в 30 км восточнее г. Петровск-Забайкальский. По недавним сведениям, на действующем руднике ведётся добыча и обогащение вольфрамово-молибденовых руд. Химический анализ проб воды показал присутствие таких металлов, как Al, Zn, Cu, Fe, Mn, U и др. По данным анализа концентрация U одна из высоких, среди концентраций других соединений. Присутствие урана в значимых концентрациях (до 0.4 мг/л) вызывает большой интерес.

В настоящее время нет информации о биологической функции урана, известно лишь, что уран токсичен для клеток даже при низких концентрациях: в 20-40 раз более токсичен, чем медь и никель. Токсичность урана первоначально связана с его химическими свойствами, нежели чем с его радиоактивностью. Сообщают, что бактерии, способные восстанавливать U(VI) до U(IV), распространены в природе повсеместно [1]. Способностью восстанавливать уран, наряду с другими металлами, обладают представители сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) [1].

СРБ – это анаэробные микроорганизмы, способные восстанавливать сульфат с одновременным окислением органических субстратов. Эти микроорганизмы имеют широкое распространение в окружающей среде, они живут в условиях разных концентраций pH и солей, и показывают огромную способность к восстановлению и накоплению металлов. Показано, что СРБ подвергают химическим изменениям железо [Fe(III)], хром [Cr(VI)], уран [U(VI)], магний [Mn(IV)] и технеций [Tc(VII)], наряду с другими [Spear, 2000]. Кроме того, СРБ могут быть толерантны к разным тяжелым металлам (медь, никель, кобальт, кадмий и др.) и растворенному сульфиду [1, 2]. Некоторые из этих микроорганизмов могут использовать U(VI) в качестве конечного акцептора электронов, снижая его токсичность за счет того, что растворенный U(VI) переходит в нерастворимую форму U(IV). К тому же образуемый СРБ H_2S способен реагировать с металлами и нерастворимыми формами сульфидов с образованием, в том числе, сульфидов урана [1, 3].

Благодаря способности образовывать сульфиды металлов, СРБ играют важную роль в биологической очистке токсичных отходов, содержащих тяжелые металлы [3] и могут использоваться для развития и создания систем очистки. Например, биологическое восстановление растворенного шестивалентного урана [U(VI)] в нерастворенный четырехвалентный уран [U(IV)] может быть использовано для удаления растворенного урана из подземных вод, шахтных вод или вод сайтов вторичной переработки. Чтобы разработать технологию биологической очистки, важно сначала изучить микробиологическое разнообразие загрязненных ураном сайтов, выявить биотехнологически перспективные формы микроорганизмов и исследовать их физиологические характеристики.

Целью данной работы стало получение устойчивых к металлам накопительных культур сульфидогенных и сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) с последующим исследованием их филогенетического разнообразия и выявления биотехнологического потенциала.

Образцы воды и осадков с территории месторождения собирали в пластиковые емкости и хранили при температуре +4°C. Для получения накопительных культур СРБ небольшое количество осадков помещали в 15-мл флаконы со стерильной средой Видделя [4]. В качестве органических субстратов использовали лактат, 1% пептон и формиат. Анаэробные условия создавали, доливая 15-мл флаконы питательной средой доверху. Культивирование проводили при 28°C. ДНК из накопительных культур выделяли набором реактивов MO BIO PowerSoil DNA Kit (MO BIO Laboratories, Inc, Carlsbad, CA). Анализ биоразнообразия накопительных культур проводили методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ), как описано ранее [5].

Были получены накопительные культуры на селективной для СРБ среде с добавлением 100мгCd/л, 200мгMoO_4/л и с совместным добавлением в среду 200мгCu/л и 200мгMoO_4/л на низком и среднем значениях pH. Культуры на пептоне и лактате с добавлением 200мгMoO_4/л, а также с пептоном и 200мгCu/л и 200мгMoO_4/л росли при pH 7. При низких значениях pH (pH 3) проводили культивирование на среде с лактатом и формиатом с добавлением 100мгCd/л. Продолжительность лаг-фазы при культивировании составила не менее 17 суток. Все накопительные культуры были морфологически неоднородны и представлены палочкообразными клетками, иногда со спорами.

ДГГЭ-анализ подтвердил различие в биоразнообразии накопительных культур, культивированных при разных условиях. Так, ДГГЭ-профили культур, полученных из одного образца, но культивированных на

разных субстратах роста, отличались по количеству и разнообразию филотипов.

Наибольшее количество филотипов обнаружено в накопительных культурах на средах с лактатом и пептоном с добавлением 200мгMoO_4/л при pH 7, а также на среде с формиатом с добавлением 100мгCd/л при pH 3 и с добавлением 200мгMoO_4/л и 200мгCu/л. Меньше всего филотипов обнаружено в накопительной культуре с пептоном с добавлением 200мгMoO_4/л и 200мгCu/л.

Таким образом, из осадков Бом-Горхонского вольфрамово-молибденового месторождения были получены накопительные культуры СРБ на разных питательных средах и добавлением ионов Mo, Cd и Cu. Исследованное биоразнообразие полученных накопительных культур выявило различие в филотипах 16S рРНК в зависимости от условий культивирования. Дальнейший филогенетический анализ полученных филотипов позволит установить таксономическое положение культивируемых СРБ из осадков месторождения.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-31519.

Литература

1. Chang Y.-J. Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site / Y.-J. Chang, A. D. Peacock, P. E. Long, J. R. Stephen, J. P. Mckinley, S. J. Macnaughton, A. K. M. A. Hussain, A. M. Saxton, D. C. White. // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – V. 67. – № 7. – 3149–3160 p.

2. Karnachuk O. V. Precipitation of Cu-sulfides by copper tolerant *Desulfovibrio* isolates / O. V. Karnachuk, K. Sasaki, A. L. Gerasimchuk, O. Sukhanova, D. A. Ivasenko, A. N. Kaksonen, J. A. Puhakka, O. H. Tuovinen. // Geomicrobiology journal. – 2008. – V. 25. – 219-227 p.

3. Naz N. Cadmium accumulation and DNA homology with metal resistance genes in sulfate-reducing bacteria / N. Naz, H. K. Young, N. Ahmed, G. M. Gadd. // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – V. 71. – № 8. – 4610–4618 p.

4. Widdel F. F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria / F. F. Widdel, R. Bak. // In: Balows A. et al (Eds). The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, 2rd edition. Berlin: Springer-Verlag. – 1992. – V. 4. – 3352-3378 p.

5. Карначук О. В. Бактерии цикла серы в осадках хвостохранилища добычи золота в Кузбассе / О. В. Карначук, А. Л. Герасимчук, Д. Бэнкс, Б. Френгстадт, Г. А. Стыкон, З. Л. Тихонова, А. Х. Каксонен, Я. А. Пухакка, А. С. Яненко, Н. В. Пименов. // Микробиология. – 2009. – Т. 78. – № 4. – 483-491 с.

Для заметок

Изучение устойчивости к меди у ацидофильного штамма *Desulfosporosinus* sp.I2

Е.В. Груздев, О.П. Иккерт, О.В. Карначук

Томский государственный университет, г. Томск

Загрязнение тяжелыми металлами различных экосистем представляет одну из наиболее серьезных экологических проблем современного общества. В производственных циклах предприятий добывающих и выплавляющих металлы, образуются большие количества отходов и стоков, содержащих металлы и сульфаты, в высоких концентраций, и часто характеризующихся низким значением pH среды. Существует множество различных источников загрязнения тяжелыми металлами, крупнейшим из которых являются производственные стоки и кислые шахтные дренажи. Встречаются несколько видов очистки, но все они дорогостоящие и недостаточно эффективные. Наиболее эффективным способом очистки – является осаждение металлов биогенным сероводородом ($Me^{+2}+HS \rightarrow MeS+H^{+}$). Сероводород, выделяющийся в процессе метаболизма сульфатредуцирующими бактериями (СРБ) реагирует с большинством металлов, образуя сульфиды, растворимость которых изменяется в пределах от 10^{-3} до 10^{-5} г/л. Данный способ гораздо выгоднее и эффективнее, чем осаждение гидроксидов металлов в присутствии комплексных соединений и хелаторов. Не смотря на это, существуют трудности в биотехнологиях осаждения металлов из-за их токсичности для микроорганизмов. Устойчивость чистых культур СРБ к ионам металлов, а в частности к ионов меди, делает эту группу перспективной для использования в биотехнология очистки кислых стоков от тяжелых металлов.

Изучали устойчивость к ионам меди ацидофильного штамма СРБ *Desulfosporosinus* sp. I2. Культура была выделена из загрязненных металлами осадков, с территории заброшенных золотодобывающих шахт в Кемеровской области. Штамм *Desulfosporosinus* sp. I2 культивировали на пресноводной среде Видделя с разными концентрациями ионов меди и кислым pH (начальный pH 2,5). В качестве органического субстрата использовали глицерин. Несмотря на низкий начальный pH среды, в процессе культивирования pH повышался, достигая в контроле 4-5 и в культуре 5-6. Вероятно, это происходило в результате химических процессов (вследствие наличия в среде железной проволоки, которая служит дополнительным источником железа для микроорганизмов и понижает окислительно-восстановительный потенциал), а также за счет жизнедеятельности бактерий. Повышение концентрации меди в среде проводили постепенно, с каждым пересевом повышая ее на 25 мг/л меди. Для достоверности результатов пересевы на одну и туже концентрацию меди проводили не менее трех раз, а в качестве контроля штамм культивировали без ионов металлов.

Для определения прироста клеток их подсчет осуществляли в тридцати случайно выбранных фиксированных полях зрения, а концентрацию клеток рассчитывали по формуле: Xср.= Sn.c.x1000xX/Sn.з.xV (Xср. – концентрация клеток на 1 мл; X – количество клеток в поле зрения; Sn.c. – площадь покровного стекла; 1000 – коэффициент пересчета на мл; Sn.з. – площадь поля зрения; V – объем, вносимой капли на предметное стекло).

Максимальную концентрацию клеток наблюдали при культивировании на среде с ионами меди в концентрации 25 мг/л ($114,5\times10^{6}$ Кл/мл), при этом продолжительность лаг-фазы составляла 2-3 суток (таблица 1). С повышением ионов меди в среде наблюдали увеличение лаг-фазы и снижение концентрации клеток. Минимальную концентрацию клеток наблюдали при культивировании штамма на среде с 1000 мгCu^{2+}/л, при этом лаг-фаза составляла более 20 суток. Интересно отметить, что в контрольной культуре росшей без меди концентрация клеток была ниже, чем на среде с ионами меди в концентрации 25-50 мгCu^{2+}/л. Вероятно, это связано с понижением концентрации сероводорода (благодаря связыванию его с медью), который сам по себе токсичен для бактерий в высокой концентрации.

Таблица 1 – Зависимость продолжительности лаг-фазы и концентрации клеток от концентрации меди в среде

Концентрация меди в среде, мг/л	Продолжительность лаг-фазы, сутки	Концентрация клеток, Кл/мл
Без металла	3-4	$111,3\times10^{6}$
25	2-3	$114,5\times10^{6}$
50	4-5	$113,5\times10^{6}$
100	5-6	$110,8\times10^{6}$
200	6-7	107×10^{6}
300	6-8	89×10^{6}
400	10-14	$90,7\times10^{6}$
500	12-14	61×10^{6}
600	14-16	53×10^{6}
700	14-16	42×10^{6}
1000	<20	30×10^{6}

Таким образом, *Desulfosporosinus* sp. I2 является перспективным штаммом для использования в биотехнологии очистки кислых стоков от ионов Cu^{2+}

Использование «вложенной» ПЦР для амплификации гена 16S рРНК архей из природных образцов термальной подземной воды

В.В. Широкова, Ю.А. Франк, О.В. Карначук

Томский государственный университет

Архей начали классифицировать отдельно от бактерий с 1977 года в результате революционной работы Карла Вёзе, предложившего использование гена 16S рРНК для определения филогении микроорганизмов [1]. Однако прокариоты, относящиеся к домену *Archaea*, все еще недостаточно изучены. Исследование распространения и физиологии этих удивительных микроорганизмов важно для понимания происхождения и эволюции жизни на Земле. Кроме того, многие группы архей включают представителей, выполняющих важные биогеохимические функции, обладающих ценными промышленными свойствами и перспективных для применения в биотехнологиях.

До недавнего времени были описаны только 2 филума домена *Archaea*: *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota*. В 1996 году был открыт третий филум термофильных архей из гидротермальных местообитаний, названный *Korarchaeota* [2]. Немного позже выделили новый филум гипертермофильных симбиотических архей *Nanoarchaeota* [3]. Долгое время считалось, что к археям вообще принадлежат исключительно экстремофилы (кроме филума *Euryarchaeota*, включающего большинство метаногенов). Но в 2008 году описали новый филум мезофильных архей *Thaumarchaeota* [4]. Тем не менее, экстремальные экосистемы являются типичными местообитаниями для представителей *Archaea*.

Объектом нашего исследования стали археи из уникальной подземной высокотемпературной экосистемы, вскрытой нефтепоисковой скважиной Р3 в Томской области. Термальная подземная вода скважины имеет среднюю минерализацию и относится к хлоридно-натриевому типу. Вода содержит повышенные концентрации нефтяных углеводородов, соединений бора, фтора, йода и мышьяка. Ранее была проведена оценка биоразнообразия прокариот в этой экосистеме. Исследования касались, главным образом, представителей домена *Bacteria* [5, 6]. При амплификации гена 16S рРНК архей из препаратов тотальной микробной ДНК подземной воды скважины были трудности с получением качественных продуктов ПЦР.

В настоящем исследовании для поиска архей была использована так называемая «вложенная» ПЦР (nested PCR). Этот вид ПЦР отличается последовательным использованием двух пар олигонуклеотидных праймеров. При этом продукты первой реакции служат матрицей во второй реакции. Этот подход разработан для уменьшения числа побочных продуктов и повышения эффективности реакции [7]. «Вложенная» ПЦР успешно применяется для молекулярной детекции и подготовки фрагментов ДНК к разделению.

Микробные клетки из термальной подземной воды объемом 0.5 л и 2.0 л осаждали фильтрованием через стерильный бактериальный фильтр из нитрата целлюлозы с диаметром пор 0.2 мкм. Выделение тотальной ДНК из фильтров выполняли с помощью набора для выделения ДНК «Power Soil DNA isolation kit» (MoBio, USA) в соответствии с инструкцией производителя. Первоначально проводили ПЦР-амплификацию гена 16S рРНК *Archaea* с парой "внешних" праймеров 21F-958R (21F 5'- TTCCGGTTGATCCYGCCGGA –3'; 958R 5'- YCCGGCGTTGAMTCCAATT -3') Полученные продукты использовали для реамплификации с парой "внутренних" праймеров Uni512F-Arch915R (Uni512F 5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGGTGBCAGCM GCCGCGGTAA-3'; Arch915R 5'- GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3') Реакционная смесь включала 10% 10xTaq-буфер (Fermentas), 1.5 мМ $MgCl_2$ (Fermentas), по 200 мкМ каждого dNTP (Fermentas), 400 нг/мкл BSA (Fermentas), по 0.5 мкМ прямого и обратного праймеров, 1.25 ед. Taq-полимеразы (Fermentas) на 50 мкл, 50-100 нг матрицы ДНК. ПЦР проводили в автоматическом термоциклере MyCycler (BioRad). Для амплификации с «внешними» праймерами температура отжига составляла 55 °С, а для амплификации с «внутренними» праймерами 57 °С. Продукты ПЦР визуализировали с электрофорезом в агарозном геле и фотографировали с помощью системы GelDoc-It (UVP).

В результате проведения первой реакции с «внешними» праймерами 21F-958R были получены слабые сигналы из отдельных образцов. В целом, амплификация прошла лучше при использовании ДНК, выделенной из воды объемом 2.0 л, по сравнению с ДНК, выделенной из 0.5 л подземной воды, что свидетельствовало о недостаточном количестве матрицы ДНК для амплификации. В трех образцах из разных временных точек при визуализации были обнаружены продукты размером около 950 пар нуклеотидов. Концентрация ДНК была низкой по сравнению с положительным контролем (*Thermococcus sibirica*). После реамплификации с парой Uni512F-Arch915R из всех образцов среднеминерализованной термальной подземной воды были получены продукты, сопоставимые по количеству ДНК с положительным контролем. Ранее «вложенная» ПЦР использовалась для детекции архей из пресных холодных подземных вод [8]. Однако авторы применяли пару праймеров Parch519F-Arch915R, доказав

эффективность именно этой пары для пресноводных образцов по сравнению с минерализованными.

Таким образом, в ходе применения «вложенной» ПЦР были получены продукты, представляющие собой смесь фрагментов 16S рРНК архей из природных проб термальной подземной воды из скважины Р3. Полученные продукты могут быть использованы для последующего молекулярно-биологического анализа путем разделения фрагментов гена отдельных представителей домена *Archaea*, обитающих в высокотемпературных подземных слоях.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант 12-04-31370 мол_а.

Литература

1. Woese C., Fox G. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms // Proc Natl Acad Sci USA. – 1977. - V.74, No.11. – P. 5088–5090.

2. Barns S.M., Delwiche C.F., Palmer J.D. and Pace N.R. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences // Proc Natl Acad Sci USA. – 1996. – V.93. – P. 9188-9193.

3. Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C., and Stetter, K.O. A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont // Nature. - 2002. – V.417. – P.63-67.

4. Brochier-Armanet C., Boussau B., Gribaldo S. and Forterre P. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota* // Nature Reviews Microbiology. – 2008. - V. 6. – P.245-252.

5. Frank Y.A., Gavrilov S.N., Gerasimchuk A.L., Komleva E.V., Kopnova A.V., Kazakovtseva M.V., Tronova T.M., Banks D., Bonch-Osmolovskaya E.A. and Karnachuk O.V. Seasonal variations of *Bacteria* and *Archaea* in the outflow of deep thermal hydrocarbon-bearing reservoir in Western Siberia, Russia // Extremophiles 2010 book of abstracts. – 2010. – P.242.

6. Франк Ю.А., Комлева Е.В., Курганская И.А., Тронова Т.М. Использование молекулярных методов для обнаружения микроорганизмов-деструкторов углеводородов в воде нефтепоисковой скважины // Проблемы региональной экологии. – 2011. - № 3. – С. 147-154.

7. Dar S.A., Kuenen J.G., Muyzer G. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities // Appl Environ Microbiol. – 2005. – Vol. 71, No. 5. – P. 2325–2330.

8. Vissers E.W., Bodelier P.L.E., Muyzer G. and Laanbroek H.J. A nested PCR approach for improved recovery of archaeal 16S rRNA gene fragments from freshwater samples // FEMS Microbiol Lett. - 2009. – P. 193-198.

Для заметок

Использование силибининовой и силидианиновой хеморас расторопши пятнистой для создания сортов лекарственных растений

А.С. Чубарова, В.П. Курченко

Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

Биологически активные вещества, синтезируемые лекарственными растениями, принадлежат к различным классам химических соединений. Генотипическая изменчивость может обуславливать значительные изменения в составе вторичных метаболитов растений, их соотношении и количественном содержании. С точки зрения хемосистематики именно эти вещества представляют наибольшую прогностическую ценность, так как их биосинтез у разных видов более специфичен по сравнению с продуктами первичного обмена. На основании различий химического состава вторичных метаболитов у многих видов растений существуют хеморасы или хемотипы. Например, тимьян ползучий (*Thymus serpyllum* L.) имеет несколько хемотипов, отличающихся по преимущественному накоплению одного из терпеноидов эфирного масла: тимолола, карвакрола, линалоола, терпинеола или других веществ [1]. Этот факт является предпосылкой для углубленного изучения содержания вторичных метаболитов в лекарственных растениях для выявления новых хеморас и проведения селекционной работы, направленной на получение их высокопродуктивных сортов.

Среди растений семейства сложноцветных особый интерес вызывает расторопша пятнистая (*Silybum marianum* Gaertn.), в плодах которой содержится большое количество флаволигнанов – биологически активных веществ фенилпропаноидной природы. Они обладают широким спектром биологических активностей, таких как гепатопротекторная, антиоксидантная, противовоспалительная и другие [2].

Плоды лиловоцветковой разновидности расторопши пятнистой используются при производстве гепатопротекторных лекарственных средств. Показано, что они могут содержать различное количество основных флаволигнанов: силибинина, силикристина и силидианина [3, 4], что создает определенные трудности в стандартизации сырья данного лекарственного растения. Несмотря на то, что расторопша пятнистая является сырьевым источником для получения лекарственной субстанции – силимарин, широко используемый при производстве гепатопротекторных лекарственных средств: Легалон, Карсил, Гепарсил, Силибор и др., в Республике Беларусь производство лекарственных средств на его основе ограничено из-за отсутствия сырьевой базы.

В связи с этим целью работы явился анализ качественного и количественного состава флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой, поиск хеморас и создание сортов этого лекарственного растения с высоким содержанием силимарина.

Растения расторопши пятнистой различного происхождения были интродуцированы Центральным ботаническим садом НАН Беларуси. Для анализа были предоставлены плоды интродуцентов из 11 ботанических садов Европы: Германии (Берлин), Польши, Словении, Беларуси, Швейцарии, Франции, Бельгии, Германии (Дрезден), Италии, Румынии и Франции (Париж). Из них были получены субстанции силимарина по известной методике [5]. Для оценки качественного и количественного состава отдельных флаволигнанов в исследованных силимаринах использовали ВЭЖХ. Анализ проводили на хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США), оборудованный диодно-матричным детектором. Колонка – Диасфер С18 (250х4,6 мм, размер частиц 5 мкм), температура колонки 40°С. Подвижная фаза состояла из раствора фосфорной кислоты pH 2,3, и метанола. Режим подачи подвижной фазы – градиентная элюция. Регистрацию осуществляли при длине волны 288 нм. Скорость потока элюента составляла 1 мл/мин, объем пробы составлял 10 мкл.

По результатам анализа определено, что содержание силимарина в исследованных плодах интродуцентов колебалось от 1,7 до 3,5%. Наибольшее содержание флавоноидов было обнаружено в плодах расторопши пятнистой из ботанических садов Польши (3,5%), Берлина (3,44%), Словении (2,93%) и Италии (2,9%). Эти плоды можно рекомендовать для промышленного выращивания расторопши пятнистой с целью повышения эффективности производства субстанции силимарин.

Количественную оценку содержания таксифолина, силибинина, силикристина и силидианина проводили по величинам площадей пиков, вычисленных из профилей элюции с помощью программного обеспечения ChemStation for LC 3D systems (Agilent Technologies, США) (таблица 1).

Из приведенных данных видно, что плоды, характеризующиеся высоким содержанием таксифолина, получены из ботанических садов Франции (Париж) (7,21±0,31%), Италии (6,65±,01%), Германии (Дрезден) (6,39±0,39%) и Словении (6,16±0,74%). Минимальное количество этого флавоноида содержали плоды расторопши пятнистой из ботанических садов Румынии (3,99±0,87%), Германии (Берлин) (3,74±0,12%) и Бельгии (3,25±0,37%).

Таблица 1 – Содержание основных флаволигнанов и таксифолина в силимаринах, полученных из плодов расторопши пятнистой различного происхождения (%)*

Страна происхождения	Таксифолин	Силикристин	Силидианин	Силибинин
Германия (Берлин)	3,74±0,12	25,42±0,12	3,7±0,08	**67,16±0,07**
Польша	5,27±0,21	25,55±0,075	4,14±0,52	**65,06±0,16**
Словения	6,16±0,74	26,51±0,17	3,32±0,13	**64,0±0,17**
Беларусь	5,11±0,81	16,31±0,61	**42,07±1,68**	36,52±0,77
Швейцария	4,40±0,07	13,53±0,25	**55,17±0,17**	26,90±0,27
Франция	5,05±0,54	15,64±0,72	**50,4±0,83**	28,92±0,79
Бельгия	3,25±0,37	16,73±0,29	**47,18±0,25**	32,86±0,27
Германия (Дрезден)	6,39±0,39	17,47±0,49	**44,60±0,74**	31,56±0,28
Италия	6,65±0,1	14,69±0,46	**52,60±0,35**	26,06±0,43
Румыния	3,99±0,87	16,91±0,77	**46,32±0,89**	32,79±0,31
Франция (Париж)	7,21±0,31	17,26±0,125	**41,16±0,74**	34,38±0,29

* – приведены значения в процентах от общего содержания силикристина, силидианина, силибинина и таксифолина, различия статистически достоверны при $p<0,05$

Сравнительный количественный анализ основных флаволигнанов, входящих в силимарины: силибинина, силикристина и силидианина из исследованных плодов показал, что по преимущественному содержанию силибинина или силидианина все они могут быть разделены на две группы. В группу с преимущественным содержанием силибинина вошли плоды, полученные из ботанических садов Германии (Берлин), Польши и Словении. Содержание его колебалось от 64 до 67%. Эти плоды также отличало высокое содержание силикристина (25–26%) на фоне низкого содержания силидианина (3–4%) (таблица 1). Вторую группу составили плоды, в составе которых доминирует силидианин от 41 до 55%. Максимальное содержание силибинина в этой группе плодов достигало 36%, а силикристина 17,5%. Полученные результаты свидетельствуют о наличии двух хеморас расторопши пятнистой, которые могут быть определены по составу вторичных метаболитов.

Для достоверного выявления хеморас нами был использован кластерный анализ. По его результатам установлено, что по количественному соотношению отдельных флаволигнанов все исследованные растения делятся на две группы, обладающие максимальными различиями по этому критерию, что полностью подтверждает экспериментальные данные. Исследованные выборки представляют собой две различные хеморасы расторопши пятнистой: силибининовую и силидианиновую.

Обнаружение хеморас на основе содержания флаволигнанов послужило основой для последующей селекционной работы, проведенной в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси, которая привела к разработке сорта «Золушка» (свидетельство селекционера № 0001462 от 15.01.2004) данного лекарственного растения. Его дальнейшее использование позволит получить стандартизированное сырье для фармацевтической промышленности.

С использованием ВЭЖХ дана характеристика разработанного сорта «Золушка» по содержанию силимарина и основных флаволигнанов. По результатам анализа суммарный выход флаволигнанов составил 4,05±0,11%. По относительному содержанию силибинина (46,36±0,81%), силикристина (11,78±0,27%) и силидианина (38,37±0,31%) на основании кластерного анализа можно сделать вывод о том, что этот сорт расторопши пятнистой принадлежит к силидианиновой хеморасе. Следует отметить, что полученный сорт характеризуется повышенным содержанием всех исследованных флаволигнанов, что делает плоды сорта «Золушка» ценным сырьевым источником для получения силимарина и создания гепатопротекторных лекарственных средств.

Таким образом, проведенный анализ химического состава флаволигнанов плодов расторопши пятнистой различного происхождения, интродуцированных Центральным ботаническим садом НАН Беларуси показал, что в их состав входят в различном соотношении все основные флаволигнаны: силибинин, силидианин и силикристин. Выявленные различия в содержании силибинина и силидианина позволили выделить две хеморасы этого лекарственного растения – силибининовую, содержащую 64–67% силибинина, и силидианиновую, содержащую 41–55% силидианина. С помощью ВЭЖХ был проведен биохимический анализ вторичных метаболитов флаволигнановой природы в плодах расторопши пятнистой сорта «Золушка», разработанного в Центральном ботаническом саду. Этот сорт отличается высоким содержанием силимарина. В связи с этим он может быть рекомендован в качестве растительного лекарственного сырья при производстве гепатопротекторных лекарственных средств.

Литература

1. Химический состав тимьяна байкальского (*Thymus baikalensis* Serg.), произрастающего в Забайкалье / С.В. Жигжитжапова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2008. – № 1. – С. 73–76.
2. Corchete, P. Silybum marianum (L.) Gaertn: the source of silymarin / P.Corchete // Bioactive molecules and medicinal plants / K.G. Ramawat, J.M. Merillon. – Springer Berlin Heidelberg, 2008. – P. 123–148.
3. Куркин, В.А. Флаволигнаны и другие природные лигноиды. Проблемы структурного анализа. / В.А. Куркин, В.Г. Запесочная // Химия природ. соединений. – 1987. – №1 – С. 11–35.
4. Беликов, В.В. Оценка содержания флаванонол-производных в плодах *Silybum marianum* (L.) Gaerth. / В.В. Беликов // Раст. рес. – 1985. – Вып. 3. – С. 350–358.
5. Щекатихина, А.С. Получение биологически активных веществ из семян растопши пятнистой (Silybum marianum) / А.С. Щекатихина, Т.М. Власова, В.П. Курченко // Труды Белорус. гос. ун-та. – Минск, 2008. – Т.3. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – С. 202–209.

Для заметок

Культивирование анаэробных ацидофильных микроорганизмов, восстанавливающих сульфаты, из экосистем кислых шахтных дренажей

М.А. Власова, А.Л.Герасимчук, О.П. Иккерт, О.В. Карначук

Томский государственный университет, г. Томск

Изучение биоразнообразия сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) в кислых шахтных дренажах, загрязненных металлами, имеет большое практическое значение. Важная биогеохимическая роль СРБ заключается в переводе ионов металлов в сульфиды с низким коэффициентом растворимости [1]. Являющийся продуктом диссимиляционной сульфатредукции биогенный сероводород химически связывает находящиеся в растворе ионы металлов и переводит их в форму сульфидов. Образование кристаллических сульфидов меди ранее было показано для накопительных [2] и чистых культур СРБ [3]. Образование абиогенных кристаллических сульфидов железа и меди в среде для культивирования СРБ было показано Gramp с соавторами в 2006.

В последние годы возрос интерес к изучению возможностей стимулирования активности аборигенной микрофлоры в загрязненных местообитаниях. Целью подобных исследований является поиск новых путей развития биоремедиационных технологий. В связи с этим, данные о численности и биоразнообразии СРБ в экосистемах, загрязненных стоками металлургических и горнодобывающих производств, представляют особую ценность.

Наше исследование посвящено получению культивируемых форм сульфатредуцирующих микроорганизмов из загрязненных металлами экосистем кислых высачиваний с территории хвостохранилищ золоторудных месторождений Кузбасса.

Объектами исследования являлись пробы осадков кислых высачиваний с территории месторождений добычи золота в Кузбассе. Описание сайтов отбора проб представлено в Таблице 1.

Накопительные культуры СРБ получали, помещая 1 г пробы кислых осадков в стерильные 15-мл стеклянные флаконы, долитые доверху селективной средой Видделя [4] (Widdel, Back, 1992) и запечатанные стерильными резиновыми пробками и алюминиевыми колпачками. В качестве органических субстратов для роста использовали лактат и глицерин, для регуляции уровня pH – 1н серную кислоту (H_2SO_4). Так же в качестве добавки к основной среде вносили ионы меди в концентрации 25мг/л, используя стоковый раствор $CuSO_4 \times 5H_2O$. Культивирование проводили при температуре 28°С. Для выделения из чистых культур СРБ, растущих при низких значениях pH, осуществляли посевы методом предельных разведений в жидкой среде Видделя, так как рост на агаризованной среде при кислых значениях pH затруднен. Использовали последние из серии разведений флаконы с заметным ростом СРБ. Используя их в качестве инокулята, проводили регулярные пересевы на ту же среду.

Таблица 1 – Описание мест отбора проб и некоторые физико-химические параметры

Место отбора проб	Обозначение пробы	Описание места отбора пробы	T °C	pH	Eh
Хвостохранилище «Центральное»	Том А	Верхний слой двухфазного осадка (верхний – тонкий окисленный слой оранжевого цвета рыхлой консистенции, нижний – восстановленный слой черного цвета с запахом H_2S) ветланда недалеко от отвала; края ветланда покрытыобрастаниями мха.	14.01	3.3	+363
Хвостохранилище «Центральное»	Том С	Нижний слой двухфазного осадка (верхний – тонкий окисленный слой оранжевого цвета рыхлой консистенции, нижний – восстановленный слой черного цвета с запахом H_2S) ветланда недалеко от отвала; края ветланда покрытыобрастаниями мха.	14.6	5.2	-386
Хвостохранилище «Комсомольское»	Том 17	Большая лужа с водой коричневого цвета, невдалеке поросшая камышами. На склоне дна видны отложения в виде прожилок рыжего осадка и зеленоватые обрастания.	18.0	2.84	+431
Хвостохранилище «Новый Берикуль»	Том 19	Оранжевая лужа, осадка практически нет, небольшой наилок.	24.1	2.43	+389

Анализ нерастворимых осадков сульфидов проводили с помощью сканирующей электронной микроскопии с использованием микроскопа Philips SEM515 с анализатором EDAX ECON IV и методом рентгено-фазового анализа на дифрактометре Shimadzu XRD 6000.

Из всех проб осадков получены накопительные культуры на селективной среде для СРБ, растущие при нейтральных (pH 6-7) и кислых (pH 2-5) значениях pH. Следует отметить, что характерные визуальные признаки сульфатредукции (помутнение среды, образование нерастворимого черного осадка сульфида железа) были более выражены при культивировании при пониженных значениях pH. Визуальная продолжительность лаг-фазы для накопительных культур ТомА (pH 4.2) и ТомС (pH 3.8) на лактате составляла 4-5 суток, в то время как продолжительность лаг-фазы накопительных культур Том 17 Таблица 1. Характеристика мест отбора проб и некоторые физико-химические параметры (лактат, pH 2.6) и Том 19 (глицерин, pH 2) составляла не менее 18 суток. Это может быть связано с культивированием при более высоких значениях pH.

Наибольшее морфологическое разнообразие наблюдали в накопительной культуре Том С на среде с лактатом при pH 3.8. Это, вероятнее всего, связано с повышенными значениями pH по сравнению с другими накопительными культурами, где типов клеток было меньше.

При проведении работ по выделению чистых культур ацидофильных СРБ, устойчивых к металлам, получены смешанные культуры с доминированием определенных морфологических типов клеток, что связано с селективным отбором более устойчивых форм. В накопительных культурах Том 17, Том 19 и Том С при пониженных значениях pH обнаружены вибрионы и укороченные палочки, что представляет интерес с точки зрения культивирования и выделения ацидотолерантных неспоровых СРБ.

Кроме того, проведены работы по анализу образования сульфидов металлов в полученных накопительных культурах и сравнению их состава с сульфидами в пробах осадков.

В накопительных культурах СРБ, полученных из сайтов Комсомольского хвостохранилища Том 17 и Берикульского Том 19 и инкубированных с добавлением меди в культуральную среду, показано накопление кристаллических форм пирита, сульфида железа, и джурлеита, сульфида меди (накопительная Том 17), а также макинавита, сульфида железа (накопительная культура Том 19). При культивировании с добавлением железа в накопительной культуре Том 19 образовывался кристаллический сульфид железа пирит.

В осадках пробы Том 17, как и в осадках полученной оттуда накопительной культуры, обнаружены кристаллические фазы сульфидов железа. Тот факт, что в осадках пробы Том 19 не обнаружено кристаллических фаз сульфидов в отличие от накопительной культуры, где показано отложение пирита, может свидетельствовать о том, что обитающие в данном сайте представители СРБ находятся в минорной фазе и не способны внести значимый вклад в осаждение растворенных металлов.

Таким образом, нами получены накопительные и смешанные культуры СРБ, устойчивые к металлам и низким pH среды и перспективные для использования в технологиях очистки загрязненных металлами экосистем. Полученные результаты подтверждают возможность образования сульфидов железа и меди за счет деятельности СРБ в экосистемах кислых шахтных дренажей.

Литература

1. Ehrlich H. L. Geomicrobiology. 3rd ed. Marcel Dekker Inc. New York. – 1996.
2. Gramp J.P., Sasaki K., Bigham J.M., Karnachuk O.V., Tuovine O.H. Formation of covellite (CuS) under biological sulfate-reducing conditions // Geomicrobiol. J. – 2006. – V. 23 (8). – P. 613-619.
3. Karnachuk O.V., K. Sasaki, A.L. Gerasimchuk, O. Sukhanova, D.A. Ivasenko, A.H. Kaksonen, J.A. Puhakka, and O.H. Tuovinen.Precipitation of Cu-sulfides by copper-tolerant *Desulfovibrio* isolates // Geomicrobiology J. – 2008. – V. 25. – P. 219-227.
4. Widdel F. F., Bak R. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. // In: Balows A. et al (Eds). The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, 2rd edition. Berlin: Springer-Verlag. – 1992. – V. 4. – P. 3352-3378.

Для заметок

Культивирование сульфидогенных микроорганизмов из подземной термальной воды скважины 3Р (Парабельский район Томской области)

Сафарян С.М., Франк Ю.А., Карначук О.В.

Томский государственный университет

В современной микробиологии молекулярные методы часто рассматривают как основную «движущую силу» [1]. Но, несмотря на все достижения в этой области, к настоящему времени описана лишь небольшая часть существующих на планете микроорганизмов. Такая неполная картина микробного разнообразия во многом связана с проблемами культивирования. На сегодняшний день большинство из существующих микроорганизмов считаются некультивируемыми. Однако выделение в культуру необходимо для описания микроорганизмов, определения их физиологических и биохимических особенностей. В связи с этим актуальной проблемой микробиологии является всестороннее изучение биологии и экологии микробного мира с помощью культуральных методов и разработка стратегий выращивания ранее некультивируемых микроорганизмов. Среди них особый интерес вызывают микробные сообщества и отдельные представители, имеющие важную экологическую и биотехнологическую роль.

Объектом нашего исследования являлись сульфидогенные микроорганизмы из термальной (около 50 °С), высокоминерализованной воды нефтепоисковой скважины 3Р Парабельского района Томской области. В настоящее время скважина, известная среди местного населения как источник « Чистый Яр», действует в режиме самоизлива, термальная вода используется в оздоровительных целях. Ранее было описано микробное разнообразие в воде скважины с применением молекулярных методов [2]. Получено несколько накопительных культур из воды и обрастаний, связанных со скважиной [3]. Из микробных матов, омываемых термальной водой, выделена умеренно термофильная бактерия *Melioribacter roseus*, представляющая новый филум *Ignavibacteriae* [4]. Сульфидогенные микроорганизмы из этой экосистемы до настоящего времени не были выделены в культуру и адекватно описаны.

Для получения накопительных культур была использована среда Видделя [5] с разными органическими веществами в качестве источника углерода и электрона. Тестировали рост на среде с лактатом натрия, ацетатом натрия, пептоном и желатином. Стерильную среду инокулировали в полевых условиях в месте излива скважины. Инкубацию вели при 50°С. Для анализа генов 16S рРНК прокариот в культурах применяли полимеразную цепную реакцию с олигонуклеотидными праймерами V3F-907R и Uni512F-Arch915R.

Культивирование сульфидогенных микроорганизмов в селективных условиях на среде с добавлением желатина и пептона было успешным. Интересно, что на традиционном для выращивания сульфатредуцирующих бактерий лактате натрия, а также на ацетате натрия, который могут использовать сульфатредукторы с неполным окислением субстратов, рост не зафиксирован. Наиболее активная накопительная культура сульфидогенных микроорганизмов, обозначенная как Р3а, была получена на среде с добавлением 2% желатина. О выделении сероводорода микроорганизмами судили по образованию черного осадка сульфида железа. В результате микроскопического анализа культуры были обнаружены подвижные клетки с различной морфологией: вибрионы, одиночные длинные палочки, короткие палочки, образующие небольшие цепочки, кокки. Даже после серии предельных разведений разнообразие форм клеток оставалось высоким. Среди палочковидных клеток выявлены спорообразующие. Выделение в чистую культуру именно спорообразующих сульфидогенных микроорганизмов вероятно, так как ранее проведенный молекулярно-биологический анализ показал присутствие в воде филотипа, близкородственного бактерии *Desulfovirgula thermocuniculi,* образующей эндоспоры.

Ранее в накопительных культурах из исследованной экосистемы обнаруживали исключительно бактерий. Амплификация фрагментов генов 16S рРНК прокариот из культуры 3Ра показала присутствие представителей как домена *Bacteria*, так и домена *Archaea*.

Исследование поддержано грантом РФФИ мол_а № 12-04-31370 и грантом Президента РФ (МК-919.2013.4).

Литература

1. Alain K., Querellou J. Cultivationg the uncultured: limits, advances and future challenges // Extremophiles. – 2009. - V.13. – P.583-594.

2. Frank Y.A., Gavrilov S.N., Gerasimchuk A.L., Komleva E.V., Kopnova A.V., Kazakovtseva M.V., Tronova T.M., Banks D., Bonch-Osmolovskaya E.A. and Karnachuk O.V. Seasonal variations of *Bacteria* and *Archaea* in the outflow of deep thermal hydrocarbon-bearing reservoir in Western Siberia, Russia // Extremophiles 2010 book of abstracts. – 2010. – P.242.

3. Герасимчук А.Л., Франк Ю.А., Казаковцева М.В., Бухтиярова П.А., Сафарян С.М. Микробные обрастания, связанные с нефтепоисковой скважиной,

вскрывающей глубинные подземные горизонты в пойме средней Оби // Проблемы региональной экологии. - 2012. - №6. – С.217-223.
4. Podosokorskaya O.A., Kadnikov V.V., Gavrilov S.N., Mardanov A.V., Merkel A.Y., Karnachuk O.V., Ravin N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Characterization of *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class *Ignavibacteria*, and a proposal of a novel bacterial phylum *Ignavibacteriae* // Environ Microbiol. – 2012, doi: 10.1111/1462-2920.12067.
5. Widdel F., Bak F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria // The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. / Eds. Balows A et al., 2nd edition, Berlin: Springer-Verlag. - 1992. - P. 3352-3378.

Для заметок

Наследование гетерологичного гена *HMG1* у потомков трансгенного табака и реакции проростков на экзогенную обработку фитогормонами

С.А. Борцова[1], Ю.В. Санаева[1], А.А. Ермошин[1], В.В. Алексеева[2]

[1]Уральский федеральный университет, г. Екатеринбург
[2]Филиал учреждения РАН Института биоорганической химии, г. Пущино

В современной физиологии растений в качестве моделей для изучения функций растений и их регуляции широко используются трансгенные растения. Особый интерес представляет вопрос о наследовании трансгенов и передачи новых признаков в ряду поколений.

В работе использовали линии трансгенного табака с подавленной активностью гена 3-окси-3-метилглуторил-КоА редуктазы за счёт использования стратегии антисмысловых РНК (линии А1, А2, А6) и с усиленной экспрессией гена (С1, С2, С4) за счёт введения дополнительной копи и гетерологичного гена из *Arabidopsis thaliana* под контролем двойного сильного конститутивного промотора CaMV 35S [1]. Данный ген отвечает за образование мевалоновой кислоты – ключевого предшественника в биосинтезе изопреноидов в цитозоле.

У трансгенных и контрольных растений табака были получены плоды и семена. Известно, что растения арабидопсиса, мутантные по гену *hmg1*, или по синтезу брассиностероидов, или цитокининов имеют сниженную всхожесть семян [2]. Это явилось причиной нашего интереса к определению всхожести полученных семян. В работе использовали семена разных лет – 2003 года, 2009 года, два урожая 2010 года. Во всех случаях получили одинаковый результат - семена контрольных растений и семена растений со смысловой копией гена не отличались по всхожести.

Семена антисмысловых линий имели несколько меньшую всхожесть семян в сравнении с контролем (до 24%), и данное отличие было достоверно (табл. 1).

Для доказательства сохранения экспрессии генетической конструкции семена были высеяны на среду МС, содержащую 100 мг/л сульфата канамицина. Растения, экспрессирующие трансген, сохранили зеленую окраску.

Растения, содержащие единичную инсерцию генетической конструкции, имеют Менделевское расщепление 3:1, а растения, содержащие вставку двух генов, имеют расщепление 15:1. Результаты эксперимента представлены в табл. 2.

Таблица 1 - Всхожесть семян (%) контрольных и трансгенных растений табака с геном *hmg1*

Линия	Время сбора семян				среднее
	2003 г	июль 2009	февраль 2010	сентябрь 2010	
контроль	92	80	84	94	88
А1	-	50	78	64	64
А2	82	-	76	82	80
А6	76	-	-	-	76
С1	-	84	90	-	87
С2	72	-	94	84	82
С4	86	-	80	80	82

Таблица 2 - Расщепление признака (трансгенная вставка) в потомстве Т1

линия	Наблюдаемое расщепление		Теоретическое расщепление	копийность	экспрпрессия
С1	92:38	2,4:1	3:1	1 копия	+
С2	0	-	-	-	-
С4	123:20	6,2:1	15:1	2 копии	+
А1	82:120	1,46:1	3:1	1 копия	+
А6	147:22	6,7:2	15:1	2 копии	+

Из полученных растений Т1 для дальнейших исследований были отобраны линии, сохранившие экспрессию трансгенной вставки и имеющие 1 или 2 инерции. Для изучения реакции растений на экзогенные фитогормоны были использованы линии, несущие 2 инсерции, т.е. те, где большинство потомков являются трансгенными.

Наблюдаемое снижение всхожести семян у антисмысловых линий может быть связано с недостатком гормонов или нарушением чувствительности к ним, так как модификация экспрессии гена *hmg1* влияет на метаболизм изопреноидных соединений у растений. Для проверки этого предположения была проведена обработка семян табака контрольной линии, двух линий с антисмысловой копией гена *hmg1* и одной «смысловой» линии растений табака экзогенными фитогормонами (БАП, $ГА_3$) в концентрациях 0, 1, 3, 10 мг/л. Определяли всхожесть семян (рис. 1).

Семена всех линий на воде и растворах гормонов начинали прорастать в одно время, однако отличались скоростью роста и всхожестью. Растворы гормонов не оказали влияния на всхожесть семян «смысловых» растений, не действовали на контрольные семена или вызывали незначительное (на 12%) ингибирование их всхожести (10 мг/л БАП). Только у одной из двух линий «антисмысловых» растений всхожесть семян

увеличилась на 72-88% при обработке цитокинином. Под влиянием гиббереллина всхожесть семян обеих «антисмысловых» линий увеличивалась линейно с ростом концентрации гормона. Таким образом, снижение всхожести семян «антисмысловых» линий растений, вероятно, связано с дефицитом у них эндогенных гормонов изопреноидной природы.

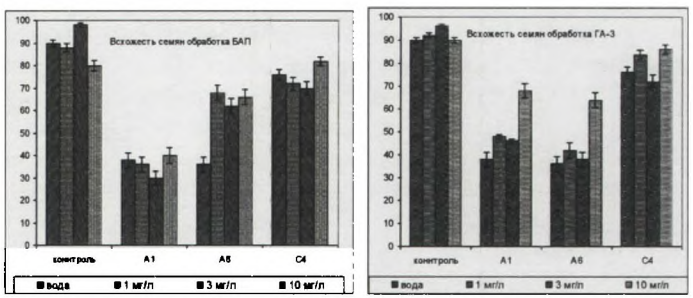


Рисунок 1 - Влияние обработки цитокининами (БАП) и гиббереллинами (ГА3) на всхожесть трансгенных семян

Авторы выражают глубокую благодарность д.б.н., с.н.с. Рукавцовой Е.Б. и д.б.н., проф. Бурьянову Я.И. (лаборатория биотехнологии растений УРАН ФИБХ, г. Пущино) за предоставление семян трансгенного табака.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14.A18.21.0203.

Литература

1. Поройко В.А., Рукавцова Е.Б., Орлова И.В., Бурьянов Я.И. Фенотипические изменения трансгенных растений табака с антисмысловой формой гена *hmg1* // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1200–1205.

2. Suzuki M, Kamide Y, Nagata N et al. Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in Arabidopsis leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels // Plant J. - 2004. - V. 37(5). - P. 750-61.

Для заметок

Особенности листового аппарата кедра сибирского в суходольных экотопах юга Западной Сибири

А.Г. Бендер[1], О.Г. Бендер[2]

[1] Томский государственный университет, г. Томск
[2] Институт мониторинга климатических и экологических систем СО РАН, г. Томск

Кедр сибирский (*Pinus sibirica* Du Tour) является одним из главных лесообразующих видов таежной зоны Западной Сибири. Обширный ареал, занимаемый кедром сибирским, объясняется его высокой экологической пластичностью.

Благодаря высокой адаптивной способности *P. sibirica* занимает различные экологические ниши, но при этом предпочитает произрастать на влажных легких почвах. Поэтому основным фактором, ограничивающим продвижение этого вида на юг, является недостаток почвенной влаги. Цель данного исследования состояла в анализе структурных и функциональных характеристик хвои кедра сибирского на южном пределе его распространения в связи с дефицитом влаги в почве.

Район исследования находился на границе Томской и Новосибирской областей. Исследования проводили в июле на двухлетней хвое 100-120-летних деревьев. Были выделены 5 местообитаний (ПП), характеризующихся последовательной сменой экологических ступеней по градиенту влажности почвы. Запас влаги в верхнем слое почвы составил 43 (ПП 1), 89 (ПП 2), 20 (ПП 3), 16 (ПП 4), 11мм (ПП 5). На самой южной ПП 5 деревья испытывали сезонную нехватку влаги, ПП 1 имела оптимальный режим увлажнения и ПП 2 характеризовалась избыточным почвенным увлажнением в весенний период вегетации.

Изучение структурных особенностей хвои показало, что с уменьшением влажности почвы уменьшалась длина хвои, площадь мезофилла и число устьиц в единице площади хвои (рис. 1). Площади смоляных каналов и жилки хвои между пробными площадями достоверно не различались. Наименьшая оводненность хвои (53 %) и интенсивность транспирации (114 мг·г$^{-1}$ сух. веса ч$^{-1}$) были отмечены так же на участках с дефицитом влаги в почве. Интенсивность фотосинтеза снижалась на пробных площадях с избытком и недостатком почвенной влаги. Причиной низкой интенсивности транспирации и CO_2 газообмена было снижение устьичной проводимости и уменьшение содержания фотосинтетических пигментов.

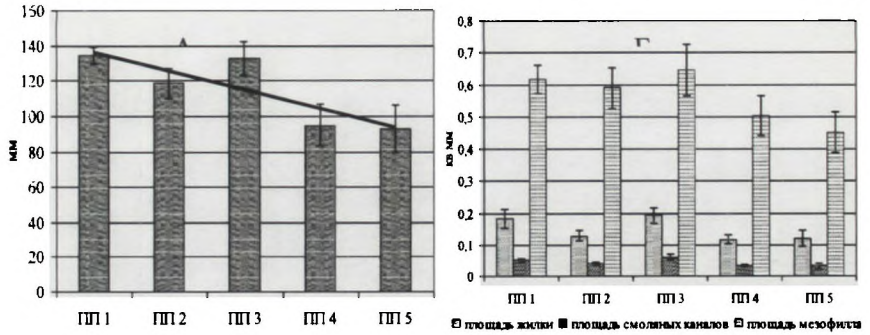


Рисунок 1 - Изменение длины (А) и площади анатомических структур хвои (Б) кедра сибирского по градиенту влажности почвы

Таблица 1 - Содержание пигментов мг/г сухого веса в хвое кедра сибирского в связи с влажностью почвы

Вариант	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Сумма *a* + *b*	Сумма каротиноидов	*a* / *b*	*a* + *b*/ каротиноиды
ПП1	1,48±0,05	0,48±0,04	1,96±0,10	0,29±0,05	3,1	5,1
ПП2	2,25±0,04	0,81±0,03	3,06±0,07	0,56±0,04	2,8	4,0
ПП3	1,68±0,07	0,55±0,04	2,23±0,11	0,34±0,05	3,1	5,0
ПП4	1,20±0,05	0,40±0,02	1,60±0,10	0,23±0,02	3,0	5,2
ПП5	1,43±0,07	0,46±0,3	1,89±0,11	0,28±0,03	3,1	5,1

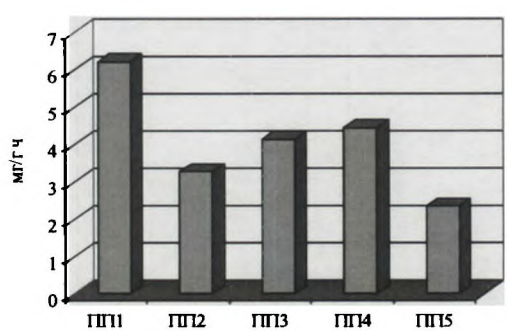


Рисунок 2 - Интенсивность фотосинтеза (А) хвои кедра сибирского в зависимости от влажности почвы.

Максимальное содержание хлорофиллов *a* и *b* (2.36 мг·г$^{-1}$ сухой веса), а так же каротиноидов (0.56 мг·г$^{-1}$ сухой веса) наблюдалось на участке с оптимальным почвенным увлажнением (ПП 2). Избыточное содержание воды в почве, а так же ее дефицит вызывали достоверное уменьшение пула зеленых и желтых пигментов в хвое на 20 – 30 %.

Таким образом, на южной границе ареала в условиях водного дефицита хвоя кедра сибирского становилась более ксероморфной, что в итоге вызывало уменьшение интенсивности транспирации и фотосинтеза. Морфо-анатомические изменения хвои и снижение активности фотосисинтетических процессов способствовали повышению устойчивости кедра сибирского в условиях дефицита почвенной влаги.

Для заметок

Роль 24-гомобрассинолида и селена в регуляции морфогенеза *Arabidopsis thaliana*

Е.А. Борисова, И.Ф. Головацкая

Томский государственный университет, г. Томск

Морфогенез растений на тканевом уровне регулируется балансом эндогенных фитогормонов. Среди которых особое место занимают брассиностероиды, проявляющие высокую полифункциональность, в том числе контролирование светозависимых и защитных реакций организма. На клеточном уровне выделяют ферментативную систему регуляции, функционирование которой контролируется микроэлементами. Показано включение селена в состав 9-ти белков, в том числе ферментов, выполняющих антиоксидантную роль в клетке. В настоящее время не достаточно изучено взаимодействие этих систем [1]. В связи с этим целью исследований было изучение совместного влияния 24-гомобрассинолида и селената натрия на морфогенез *Arabidopsis thaliana*.

Объектом исследования служили 7-дневные проростки арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа Columbia (Col), культивированные в асептических условиях на белом свету, полученном от люминесцентных ламп фирмы «Philips» с 14-ти часовым фотопериодом. Интенсивность светопотока составила 150 мкмоль квантов/м^{2}с. Селенат натрия (Se) и 24-гомобрассинолид (ГБЛ, «Sigma» США) добавляли в 10%-ную жидкую питательную среду MS в концентрации 10^{-6} и 10^{-9} М, соответственно. Ростовые параметры проростков были измерены с привлечением программы Moticam 2300 (Испания). Содержание фотосинтетических пигментов определяли спектрофотометрически [2].

В результате исследования было установлено влияние ГБЛ и Se на ростовые реакции проростков арабидопсиса (рис. 1а). ГБЛ увеличивал растяжение гипокотиля и тормозил рост корня. Действие Se проявлялось в ингибировании корня. Совместное влияние веществ оказывало антагонистическое действие на ростовые процессы, корень удлинялся по сравнению с контролем.

Поскольку рост растений на свету определяется активностью фотосинтетических процессов, нами было изучено формирование пула пигментов под действием гормона и микроэлемента (рис. 1б). ГБЛ и Se однозначно увеличивали содержание хлорофилла *a* (Хл*a*), хлорофилла *b* (Хл*b*) и каротиноидов (Кар). Повышение уровня Кар поддерживало пул Хл*a*. Совместное действие веществ снимало стимулирующий эффект каждого.

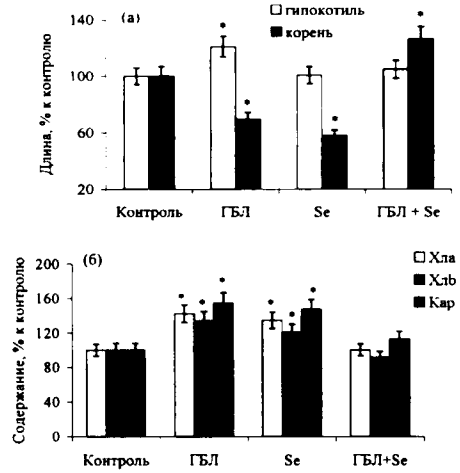


Рисунок 1 – Ростовые параметры и содержание фотосинтетических пигментов у проростков арабидопсиса в зависимости от 24-гомобрассинолида и селената натрия

Исследования частично поддержаны Госзаданием Минобрнауки России ВУЗам (№01201256295).

Литература

1. Golovatskaya I.F., Pavlova D.G., Kulagina Ju.M., Karnachuk R.A., Khripach V.A. The physiological action of brassinosteroids depends on concentration of selenium in the medium // 20th International Conference on Plant Growth Substances IPGSA (28 June – 2 July 2010, Tarragona, Spain). PS05-38. - P. 88–89.
2. Lichtenthaler H.K. Chlorophyles and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods in enzymology. - 1987. - Vol. 148. - P. 350–382.

Для заметок

Мелатонин как возможный регулятор метаболизма у клеточной культуры *Saussurea orgaadayi*

Н.А. Володина, И.Ф. Головацкая

Томский государственный университет, г. Томск

Разнообразие химического состава позволяет рассматривать растения в качестве важнейших источников физиологически активных соединений. В настоящее время свыше 40% медикаментов составляют лекарственные препараты растительного происхождения. Не смотря на то, что мировой перечень лекарственных растений насчитывает около 20 тыс. видов, в Государственном реестре лекарственных средств присутствуют не более 300 растений. По количеству видов, используемых во всех разделах медицины, выделяется семейство Asteraceae Dumort. [1]. Однако многие из сложноцветных еще недостаточно изучены.

Естественные ресурсы многих ценных дикорастущих растений ограничены, что связано как с сокращением ареалов распространения некоторых активно используемых лекарственных видов, так и принадлежностью их к группам эндемов, редким и исчезающим видам. В связи с этим большой интерес в качестве источника биологически активных веществ представляют культуры растительных клеток, важной особенностью которых является сохранение способности к синтезу вторичных метаболитов, свойственных интактным растениям данного вида, например, алкалоидов, гликозидов, стероидов и других. Всестороннее изучение биохимического состава культуры растительных клеток, выявление особенностей вторичного метаболизма, поиск методов повышения продуктивности является актуальной задачей и может служить основой для создания промышленной технологии получения вторичных метаболитов в клеточной культуре *in vitro*.

Оптимизация условий культивирования клеточной культуры с целью коррекции ростовых процессов или повышения выхода вторичных метаболитов подразумевает введение дополнительных регуляторов. Ранее в наших исследованиях было показано, что рост культуры клеток находится под контролем брассиностероидов и селена [2–4]. В последнее время привлекает внимание к себе гормон сна человека мелатонин, выполняющий важнейшие функции в человеческом организме, включая антиоксидантную и регуляторную (например, регуляцию биоритмов). Введение мелатонина в культуру, прежде всего, повысит ее фармакологическое значение.

Присутствие мелатонина установлено в растительных организмах. Среди покрытосеменных, мелатонин был обнаружен в более чем у 30-ти видов, относящихся к 19-ти различным семействам. Содержание этого соединения очень широко варьирует в разных видах растений, а также неравномерно распределено по частям организма [5]. Мелатонин может влиять на фотопериодические реакции растений, а также может действовать как антиоксидант. Мелатонин увеличивает активность ряда антиоксидантных ферментов, тем самым, повышая их способность защищать макромолекулы от окислительного стресса. Также нельзя исключать возможность того, что в растениях, мелатонин может иметь функции, отличающиеся от животных. Например, он может обладать некоторыми ауксино-подобными эффектами.

В связи с выше сказанным целью наших исследований было изучение влияния мелатонина на ростовые процессы и биохимический состав клеточной культуры *Saussurea orgaadayi* (V.Khan. and Krasnob.).

Объектом исследования служила клеточная культура *S. orgaadayi* (V.Khan. and Krasnob.). Горькуша оргаадай – многолетнее растение сем. Asteracea (сложноцветных), узколокальный эндемик небольшой территории, прилегающей к стыку Русского Алтая, Юго-Западной Тывы и территорий Монголии, редкий, лекарственный асоциальный вид, который обитает в высокогорьях (субальпийский пояс). В родственных видах *S. salicifolia* L., *S. controversa* D. C. и др. обнаруживают сесквитерпены, алкалоиды, эфирное масло, флавоноиды; фенолкарбоновые кислоты и кумарины; тритерпеновые сапонины; стероидные соединения, инулин и органические кислоты. Широкий спектр вторичных метаболитов обеспечивает важное фармакологическое значение видов рода *Saussurea*, к которому относится и нами исследуемый вид.

Исходная клеточная культура *S. orgaadayi* получена из изолированных клеток и тканей на среде Мурасиге-Скуга с добавлением гормонов 2,4-Д и 6-БАП в стерильных условиях на кафедре физиологии растений и биотехнологии под руководством профессора Р.А. Карначук, ею было начато исследование регуляции вторичного метаболизма [2]. Семена растений любезно предоставила профессор Н.А. Некратова (НИИ ББ ТГУ, Томск). В процессе эксперимента в асептических условиях наращивали исходную каллусную массу, затем разделяли ее на фрагменты, которые взвешивали и пересаживали на новую питательную среду. Культивирование каллусных клеток проводили на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей мелатонин ("Sigma", США) в концентрации 10^{-15} и 10^{-13} М (опыт) и без него (контроль). Содержание сапонинов и фенолоспиртов определяли спектрофотометрически по методикам [6].

В результате исследования было показано, что накопление сухой и сырой биомассы культуры происходило активно в контрольном варианте.

Добавление мелатонина в концентрации 10^{-15}М в питательную среду незначительно замедляло обводненность клеток в процессе роста культуры клеток *S. orgaadayi,* вероятно, за счет замедления растяжения клеток (табл. 1).

Таблица 1 – Ростовые параметры каллусной культуры клеток *S. orgaadayi* в зависимости от уровня мелатонина в среде культивирования

Параметр	Контроль	Концентрация мелатонина, М	
		10^{-15}	10^{-13}
Сырая масса, г	3,74±0,17	3,41±0,12	3,61±0,21
Сухая масса, г	0,035±0,001	0,035±0,001	0,033±0,001

Действие мелатонина в концентрации 10^{-13} М проявлялось в поддержании однородного светло-желтого цвета культуры клеток (рис. 1В), что свидетельствовало об отсутствии некроза. Длительное сохранение жизнедеятельности клеток могло быть обусловлено антиоксидантными свойствами мелатонина, удаляющего свободные радикалы и перекись, тем самым, поддерживая функционирование компонентов клеток. Наши данные согласуются и с данными о задержке мелатонином старения листьев однодольных и двудольных интактных растений [5].

Биохимический анализ каллусной культуры клеток *S. orgaadayi* показал, что на 20-е сутки культивирования на питательной среде, содержащей ауксины и цитокинины, в ней накапливаются сапонины и фенолоспирты (табл. 2, контроль).

Таблица 2 – Содержание биологически активных веществ (БАВ) в каллусной культуре клеток *S. orgaadayi* в зависимости от уровня мелатонина в среде культивирования

Содержание БАВ, % к сухой массе клеточной культуры	Контроль	Концентрация мелатонина, М	
		10^{-15}	10^{-13}
Сапонины	0,29±0,005	0,48±0,007	0,24±0,003
Фенолоспирты	11,05±0,1	11,11±0,076	11,27±0,13

Добавление экзогенного мелатонина в концентрации 10^{-15} М в питательную среду увеличивало содержание сапонинов на 65% относительно контроля. Накопление фенолоспиртов в каллусе клеточной культуры под влиянием исследуемых концентраций мелатонина не изменялось, однако намечалась тенденция к увеличению их содержания при действии 10^{-13} М мелатонина. Фенолоспирты, для которых показано участие в процессе роста растений, стимулируют деление клеток в культуре растительных тканей. Отсутствие изменения содержания их в культуре согласуется с ростом на уровне контроля.

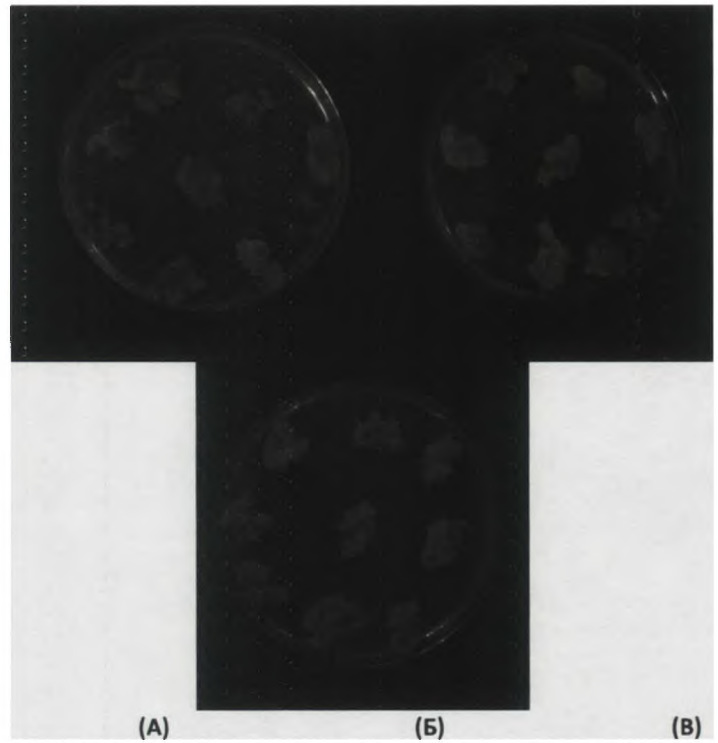


Рисунок 1 – Морфология каллуса клеточной культуры *S. orgaadayi* на питательной среде без (А) и с мелатонином в концентрации 10^{-15} (Б) и 10^{-13}М (В) на 20-е сутки культивирования

Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие низких концентраций мелатонина в питательной среде повышает активность накопления сапонинов в клеточной культуре *S. orgaadayi.* Эти предварительные исследования позволяют причислить мелатонин к числу регуляторов вторичного метаболизма. Предполагаются исследования действия других концентраций мелатонина и расширения спектра изучаемых вторичных метаболитов.

Исследования частично поддержаны Госзаданием Минобрнауки России ВУЗам (№01201256295).

Литература

1. Воробьева А. Н. Таксономия и фитоэкдистероиды дальневосточных видов родов *Stemmacantha* Cass., *Serratula* L. и *Saussurea* DC. (Asteraceae): Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05, 03.00.32. – Владивосток, 2004. 174 с. РГБ ОД, 61:04-3/1520.

2. Карначук Р.А., Дорофеев В.Ю., Гвоздева Е.С., Головацкая И.Ф., Чурин А.А., Суслов Н.И., Медведева Ю.В. Влияние физиологически активных соединений на рост и уровень тритерпеновых сапонинов и флавоноидов клеточной культуры *Atragene speciosa* Weinm. // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2008. - № 3(4). - С. 48–54.

3. Володина Н.А., Головацкая И.Ф. Зависимость роста клеточной культуры *Saussurea orgaadayi* от уровня селена и гомобрассинолида в питательной среде // Научные, прикладные и образовательные аспекты физиологии, генетики, биотехнологии растений и микроорганизмов: Материалы XII конференции молодых ученых, 15–16 ноября 2012 г. Киев, Украина. – Киев, 2012. - С. 232.

4. Головацкая И.Ф., Володина Н.А. Каллусная культура клеток *Saussurea orgaadayi* – модель для изучения регуляции роста и вторичного метаболизма 24-гомобрассинолидом и селеном // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий: сборник трудов III Международной научной Интернет-конференции. Казань, 21–23 ноября 2012 / Ред. Изотова И.Д. – Казань: Изд-во Казанский университет, 2012. - С. 90–93.

5. Kolar J, Machackova I. Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions // Pineal Res. - 2005. - N 39. - P. 333–341.

6. Ладыгина Е.Я., Сафронич Л.Н., Отряшенкова В.Э. и др. Химический анализ лекарственных растений / Под ред. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. – М.: Высшая школа, 1983. – 176 с.

Для заметок

Снижение вязкости нефти с применением уробактерий выделенных из природных источников

Ю.З. Гусева

Институт химии нефти СО РАН, г. Томск

Для увеличения нефтеотдачи месторождений высоковязкой нефти ранее в Институте химии нефти СО РАН была создана технология, сочетающая паротепловой и физико-химический метод воздействия на залежь с применением нефтевытесняющих композиций на основе ПАВ и карбамида, которые в пласте под действием температуры пара образуют CO_2 и аммиачную буферную систему [1,2]. Но карбамид в растворе практически устойчив при температуре до 70 °С. Поэтому для увеличения нефтеотдачи низкотемпературных (20-40°С) залежей вязких нефтей с применением композиций на основе ПАВ и карбамида необходимо одновременное введение в пласт гидролизующего карбамид фермента в составе препаратов растительного или бактериального происхождения – уреазы или группы уробактерий, способных гидролизовать карбамид без теплового воздействия. В процессе ферментативного гидролиза карбамида непосредственно в пласте генерируется углекислый газ CO_2 и аммиачная буферная система, обеспечивающая высокие нефтевытесняющие свойства ПАВ. CO_2 растворяется, в основном, в нефти. При растворении CO_2 вязкость нефти снижается без применения теплового воздействия, что также способствует лучшему вытеснению ее из пласта. Кроме того, при закачке в нефтяной пласт композиций на основе ПАВ и азотсодержащих компонентов и разбавлении их пластовой водой, компоненты композиции служат питательными субстратами для аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры, стимулируя ее рост и активность. Промежуточные продукты микробиологического окисления углеводородов нефти проявляют поверхностно-активные свойства, что способствует десорбции нефти с породы пласта и дополнительному вытеснению нефти [2].

Фермент уреаза, гидролизующий карбамид при низких (20-40 °С) температурах, входит в состав природных источников: отходы жизнедеятельности с/х животных, соя, свекла [21]. Уробактерии широко распространены в природе, встречаются в почве, сточных водах, навозе, подстилках для скота – то есть в средах, богатых карбамидом (мочевиной). Уробактерии гидролизуют мочевину до аммиака и двуокиси углерода: $CO(NH_2)_2 + H_2O = CO_2 + NH_3$. Для получения энергии уробактерии окисляют органические кислоты и аминокислоты. Большинство уробактерий, разлагающих карбамид, относятся к аэробной группе, способны расти в сильнощелочных средах (pH 9.5), относятся к родам *Bacillus, Micrococcus, Sarcina, Achromobacter u Clostridium, Staphylococcus* .

Активность гидролиза карбамида в растворе композиции ПАВ с добавлением природных источников уреазы оценивали по изменению pH, концентрации карбамида, накоплению CO_2 и аммиака. Из растительных объектов исследовали уреазную активность соевой муки, содержащей уреазу и кожуры свеклы, содержащей уреазу и группу уробактерий, численность которых достигает $3.2 \cdot 10^9$ клет/г. Для проведения гидролиза карбамида применяли 5 и 10 %-ные растворы композиции, содержащие карбамид в концентрации 32 и 64 г/дм^3 соответственно. Максимальное значение pH 9.4 ед. получено при соотношении кожуры свеклы: карбамид 1:64 (0.5:32) в течение 48 часов и соевой муки:карбамид – 0.1:32, при котором за 2 ч значение pH составило 9.3.

Изменение параметров гидролиза карбамида соевой мукой исследовали в течение 30 сут. При этом содержание карбамида понизилось от 64 до 3.4 г/л, концентрация ионов аммония увеличилась от 9.9 до 25 мг/л, величина pH – от 6.5 до 9.4; накопление CO2 на 30 сут составило 20 л/л. Более подробно изменение параметров гидролиза карбамида и накопление продуктов метаболизма представлено на рисунке 1.

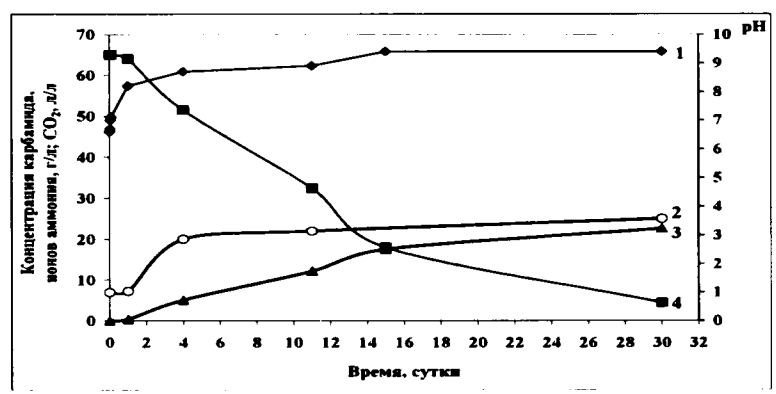


Рисунок 1 - Изменение параметров гидролиза карбамида в составе 10 %-ной композиции НИНКА® с применением соевой муки: *1*– pH, *2*– NH_4^+, *3*– CO_2, *4*– карбамид

Влияние CO_2 на изменение вязкости нефти месторождения исследовали ротационным методом при разных скоростях сдвига после ее термостатирования в присутствии 10 %-ного раствора композиции НИНКА®, содержащего карбамид, и гидролизующего его фермента растительного и бактериального происхождения (соевая мука, свекла и кизяки). Вязкость исходной нефти месторождения Цагаан-Элс (Монголия) составляет 544 мПа·с при 40 °С. После термостатирования при 35 °С в течение 45 суток в контейнерах вязкость нефти снижается в 1.3-1.5 раз.

Хроматографический анализ газообразных продуктов метаболизма подтвердил накопление CO_2 в процессе ферментативного гидролиза карбамида и показал, что при гидролизе свекольной массой концентрация CO_2 в 2 раза выше, чем при гидролизе кизяками в одинаковых условиях эксперимента. Следовательно, уробактерии в составе природных источников обладают активной ферментативной системой, гидролизующей карбамид с повышением pH, выделением CO_2 и аммиака.

Для исследования фильтрационных характеристик и нефтевытесняющей способности композиции НИНКА® с добавлением уреазы или уробактерий, согласно ГОСТа 39-195-86 применяли изовязкостную модель нефти, для чего к нативной нефти добавляли 30 % керосина. Физико-химические свойства нефти представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Физико-химические свойства нативной и изовязкостной модели нефти месторождения Цагаан-Элс

Исследуемые параметры	Нефть месторождения Цагаан-Элс	
	нативная	изовязкостная
Плотность, г/м^3 при 40 °С	0.921	0.845
Вязкость, мПа·с при 40 °С	544	8.84

Вытеснение проводили из насыпной модели, состоящей из 4 колонок высотой 90 см, диаметром 2 см. Колонки заполняли силикагелем марки АСКГ с проницаемостью от 8.1 мкм^2 до 10.1 мкм^2. Удельная поверхность силикагеля 160-500 м^2/г. В качестве нефтевытесняющего агента в контрольной модели применяли 10 %-ный раствор композиции НИНКА®, в состав которой входит карбамид – 64.0 г/л, аммиачная селитра – 32.0 г/л, неонол $АФ_{9-12}$ – 4.0, pH 6.5. Вытеснение проводили при температуре 40 °С, близкой к пластовой. Для довытеснения остаточной нефти контрольную колонку обрабатывали 10 %-ным раствором композиции НИНКИ® (колонка 1), опытные- раствором композиции с добавлением соевой муки 0.1 г/л (колонка 2), кизяков (колонка 3) и свеклы (колонка 4) по 0.2 г/л. Колонки перекрывали и термостатировали в течение 14 суток при 40 ºС для размножения микрофлоры и накопления продуктов метаболизма. После термостатирования вытеснение остаточной нефти продолжали водой до полной обводненности на выходе. Применение раствора композиции с экстрактом кизяков, содержащих уробактерии, гидролизующих карбамид, увеличило абсолютный коэффициент нефтевытеснения от 50.6 (контроль) до 53.0 и 59.5 % в опытных вариантах. Значимо изменился относительный прирост коэффициента нефтевытеснения от 14.6 до 19.0 и 23.6 %, что связано с размножением во время термостатирования уробактерий, продуцирующих уреазу. Термостатирование с использованием соевой муки увеличил прирост коэффициента нефтевытеснения до – 15.9 %, а в контрольной колонке прирост коэффициент нефтевытеснения составил 8.3 %. Абсолютный коэффициент нефтевытеснения с применением соевой муки, содержащей уреазу, составил 42.2 %, для контрольной колонки – 37.0 %.

Хроматографический анализ углеводородов довытесненной остаточной нефти с применением раствора композиции и экстракта кизяков не подтвердил каких-либо изменений в составе углеводородов. Отношение Pr/C_{17} и Ph/C_{18} идентичны для контрольного и опытного вариантов. Следовательно, биодеструктивные процессы отсутствуют, довытеснение нефти протекает за счет газообразных продуктов гидролиза карбамида, снижающих вязкость и увеличивающих моющие свойства композиции.

Таким образом, уреаза природных источников растительного и бактериального происхождения (соевая мука, свекла, кизяки домашних животных) проявляет высокую активность в процессах гидролиза карбамида в составе нефтевытесняющей композиции НИНКА® с выделением CO_2, снижающего вязкость нефти, и NH_3, повышающего pH и моющие свойства композиции, что способствует вытеснению вязкой нефти из пласта.

Полученные данные являются научной основой для разработки комплексного физико-химического и микробиологического метода увеличения нефтеотдачи вязкой нефти низкотемпературных залежей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Соглашения № 8360 Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы и гранта РФФИ № 11- 03- 92203-Монг_а.

Литература

1. Желтов Ю.В., Кудинов В.И., Малофеев Г.Е. Разработка сложнопостроенных месторождений вязкой нефти в карбонатных коллекторах М.:Ижевск, 2011. – 317 с.

2. Алтунина Л.К., Кувшинов В.А. Увеличение нефтеотдачи пластов композициями ПАВ.– Новосибирск: Наука, 1995. – 196 с.
3. The Enzymes / Edited by Paul D. Boyer, third ed. – New York and London, 1971. – Vol. IV. – p. 1-21.
4. Горелова Ю.С. Ускоренный метод определения карбамида в водных, спиртоводных и углеводородных растворах / Ю.С. Горелова, Р.М. Абзалов, П.Л. Ольков, Е.Ю. Горелова, Ф.С. Бактермиров // Заводская лаборатория. – 1992. – № 11. – С. 14-16.
5. Большой практикум по микробиологии под ред. Г. Л. Селибера. – М.: Высшая школа, 1962. – 491с.

Для заметок

Солевое влияние на клеточный цикл корневой меристемы трансгенных (FeSOD) линий томата

Е.К. Серенко[1], Н.В. Кононенко[1], А.А. Гулевич[1], Н.В. Куренина[1], Е.Н. Баранова[1], С.А. Данилова[2]

[1]Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, г. Москва
[2]Институт Физиологии растений РАН, г. Москва

Абиотические стрессы, такие как засуха, кислые или щелочные почвы, засоление, экстремальные температуры и др. нарушают рост и развитие растений томата, что вызывает значительное снижение его урожайности. Среди таких стрессов засоление, особенно на полузасушливых и засушливых территориях, оказывает огромное негативное влияние на возделываемые овощные культуры из-за плохого качества применяемой для орошения воды, вследствие чего происходит постепенное накопление в почве солей, и пахотные земли становятся непригодными для промышленного овощеводства. Повреждающий эффект от стресса, вызываемого засоленностью среды под овощными культурами, складывается из суммарного воздействия трех стрессовых факторов: осмотического, токсического и окислительного [1]. Окислительный (оксидативный) стресс представляет собой генерацию активных видов кислорода (ROS), включая супероксид-анион (0_2^-) перекись водорода (H_20_2) и гидроксильный радикал (OH^-) [2]. Для того, чтобы противостоять токсическим эффектам ROS, индуцирующим окислительный стресс, клетки растений (в том числе и томата) активируют целый ряд защитных механизмов, которые включают и низкомолекулярные антиоксиданты (глутатион, аскорбиновую кислоту, токоферол) и антиокислительные ферменты (супероксиддисмутазы, каталазы, редуктазы, пероксидазы) [3].

В настоящее время, благодаря развитию современных методов биотехнологии, таких как генетическая трансформация, можно искусственно повысить адаптацию растений к окислительному стрессу, являющемуся составной частью подавляющего большинства абиотических и биотических стрессов. Методом генетической трансформации получены трансгенные растения томатов, в которые перенесен ген *FeSOD*, отвечающий за синтез супероксиддисмутазы (СОД) - это ферменты, осуществляющие реакцию дисмутации супероксид-аниона в перекись водорода которая, затем подвергается детоксикации различными каталазами и пероксидазами [4]. Ранее нами были получены трансгенные растения томата и табака, экспрессирующие ген Fe-зависимой супероксиддисмутазы [5, 6]. Отобранные линии томата, различавшиеся по морфологическим признакам, отличались также как по уровню активности СОД и аскорбатпероксидазы.

Цель настоящей работы – методом цитофотометрического анализа изучить влияние солевого стресса, вызванного NaCl и Na_2S0_4, на кинетику клеточного цикла корневой меристемы трансгенных растений томата.

Ранее нами были получены несколько линий томата, экспрессирующего интродуцированный ген Fe-зависимой суперокиддисмутазы гороха. Две линии, отличающиеся увеличенной активностью супероксиддисмутазы и различающиеся по активности нейтрализующей ее продукт (H_20_2) аскорбатпероксидазы, были выбраны для дальнейших исследований. Для испытания эффективности защиты Fe-SOD1 -трансгенных линий (№8 и №6) томата растения клонировали. После подтверждения трансгенног статуса [4], растения томата переносили с агаризованной среды Мурасиге-Скуга (MS) в пробирки с жидкой питательной средой $^1/_2$ MS. После акклимации растений (примерно через 2 недели) растения помещали в растворы, содержащие NaCl или Na_2S0_4, выровненные по осмотическому давлению до 400 кПа, что соответствует 97,4 и 77,5 мМ. Эти концентрации были выбраны в предварительном эксперименте, как соответствовавшие порогу, установленному для обратимого ингибирования прорастания семян томата. В эксперименте использовали по 3 повторности каждой линии как для контроля ($^1/_2$ MS), так и для сред с добавлением NaCl и Na_2S0_4.

Для проведения цитофотометрического анализа кончики корня (0,5 - 0,7 см) трансгенных и контрольных растений фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты (в соотношении 3:1) в течение 3 ч. Зону корневой меристемы (до 1-2 мм) отделяли и помещали на 2 ч при 37°С в мацерирующую смесь, содержащую 0,4 % целлюлазы ("Sigma", США) и 0,4% пектиназы ("Merk"), затем окрашивали по методу Фельгена (реактив Шиффа, "Мегк") в течение 2 ч (время гидролиза в 5N HCl при 22°С 40 мин) и готовили постоянные препараты. Для определения содержания ДНК ядра меристематических клеток измеряли на цитофотометре SMP-20 (Opton) с объективом х16, окуляром х10 и зондом 0,16 мм. В качестве стандарта использовали ядра меристематических клеток корня в стадиях телофазы (2С) или метафазы (4С). Выборка для каждой экспериментальной точки составляла не менее 300 ядер из клеток 10 корешков. На постоянных препаратах корневых меристем определяли встречаемость отдельных фаз митоза и митотический индекс по общепринятой методике (рис. 1).

В качестве экспериментальной системы для изучения циклирующих клеток использовалась меристема корней. Характеристикой

пролиферативной активности клеток является митотический индекс. В контрольных растениях томата этот показатель составляет около 5,7%. После проращивания растений в условиях сульфатного засоления среды наблюдается уменьшение митотического индекса на 26% в клетках корневой меристемы, а у трансгенных линий томата - на 18-22% (№8 и №6). При хлоридном засолении МИ у контрольных томатов снижается на 28%, у трансгенных – на 15-20%.

Нарушения клеточного цикла характерны для многих стрессовых воздействий и являются реакцией растительных клеток на засоление, обезвоживание и температурные стрессы, однако, различные стрессовые воздействия имеют свои особенности. Изучение клеточного цикла корневой меристемы томата показало, что хлорид и сульфат натрия по-разному влияют на распределение клеток по периодам интерфазы и митоза.

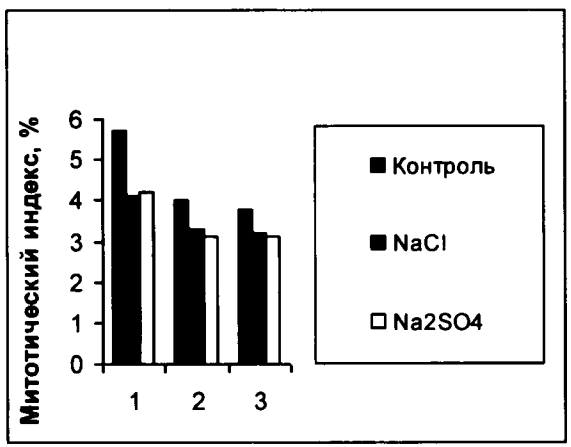


Рисунок 1 - Влияние NaCl и Na_2SO_4 на митотический индекс томатов (1-контрольные томаты; 2- линия №6; 3- линия №8)

Под действием хлорида и сульфата натрия в клетках меристемы корня трансгенных растений томата (линии №6 и №8) увеличивается продолжительность пресинтетической фазы клеточного цикла. Это можно объяснить неблагоприятными для него условиями культивирования. Так, при хлоридном засолении увеличивается количество клеток в G1 фазе у контрольных растений томата на 55% , а у трансгенных (линии №6 и №8)-на 25%, в S фазе число клеток уменьшилось: у контрольных томатов на 41%, у линии №8 – на 35%. У линии №6 произошло небольшое увеличение клеток в синтетической фазе.

У трансгенных растений в меньшей степени сокращается продолжительность клеточного цикла, и соли натрия оказывают меньшее влияние на процесс деления. В целом, трансгенные растения оказались более устойчивые к хлоридному и сульфатному засолению, по сравнению с нетрансгенными. Более медленное снижение пролиферации и задержка клеток в фазе G1 свидетельствует о большей толерантности трансгенных растений к данным неблагоприятным условиям выращивания.

Трансгенные растения лучше переносят засоление хлоридом и сульфатом натрия по сравнению с нетрансгенными. Полученные данные являются основой для разработки прогностического метода, позволяющего оценить солетолерантность трансгенных растений на ранних этапах их развития.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №12-04-31508

Литература

1. Баранова Е.Н., Гулевич А.А. Проблемы и перспективы генно-инженерного подхода к устойчивости растений к засолении // Сельскохозяйственная биология. – 2006. – Т. 1. – С. 36-59.

2. Lin J., Wang Y., Wang G Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status // Journal of Plant Physiology. – 2006. – V. 163. – P. 731-739.

3. Inze D., Van Montagu M. Oxidative stress in plants // Curr. Opin. Biotech. – 1995. – V. 6. – P. 153-158.

4. Gusta L.V., Benning N.T., Wu G., Luo X., Liu X., Gusta M.L., McHughen A Superoxide dismutase: an all-purpose gene for agri-biotechnology // Molecular Breeding. – 2009. – V. 24. – P. 103-115.

5. E. K. Serenko, E. N. Baranova, T. I. Balakhnina, L. V. Kurenina , Gulevich A. A., Kosobryuhov A.A., Maisuryan A.N., Polyakov V.Y Structural organization of chloroplast of tomato plants Solanum lycopersicum transformed by Fe-containing superoxide dismutase // Biochemistry (Moscow) Supplemental Series A: Membrane and Cell Biology. – 2001. – V. 5. – P. 177-184

6. Baranova E.K., Serenko E.K., Balachnina T.I., Kosobruhov A.A., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Maisuryan A.N. Activity of the photosynthetic apparatus and antioxidant enzymes in leaves of transgenic Solanum lycopersicum and Nicotiana tabacum plants, with FeSODI gene // Russian Agricultural Sciences. – 2010. – V. 36. – P. 242-249.

Алфавитный список устных докладов

Ацидофильные сульфатредуцирующие бактерии в местах обитания, связанных с добычей и переработкой металлов	А.Л. Герасимчук, О.В. Карначук	С. 68
Взаимосвязь продуктивности *Lactuca sativa* L., активности гетеротрофных бактерий почвы и спектрального состава света	Н.Л. Пермякова, Ю.С. Белянцева, М.А. Юрьева, А.Г. Ивлева, И.Б. Минич, А.С. Минич	С. 71
Влияние криогеля на основе поливинилового спирта на рост и развитие почвенных микроорганизмов и растений	Д.А. Филатов, Л.И. Сваровская, В.С. Овсянникова, Ю.З. Гусева, М.С. Фуфаева, Е.А. Жук	С. 54
Гипертермофильные археи: новые свойства, новые группы	Е.А. Бонч-Осмоловская	С. 30
Грамположительные спорообразующие бактерии из глубинных подземных горизонтов Западно-Сибирского нефтегазоносного бассейна	Ю.А. Франк, О.В. Карначук	С. 45
Микроводоросли горных местообитаний - объекты перспективные для биотехнологии	Е.Н. Патова, И.В. Новаковская, Н.В. Матистов, М.Д. Сивков, В.В. Володин	С. 48
Микроорганизмы, медь и кислород	О.В. Карначук	С. 38
Молекулярные механизмы гормональной регуляции биогенеза хлоропластов	В.В. Кузнецов	С. 62
Образование активных форм кислорода в корнях проростков редиса при воздействии *Escherichia coli*	А.Л. Турская, А.А. Ульданова, Т.Е. Путилина, А.В. Степанов, Ю.А. Маркова	С. 82
Образование индолилуксусной кислоты энтеробактериями, патогенными для человека	Ю.А. Маркова, А.Л. Турская, А.В. Духанина, Т.Е. Путилина, А.А. Ульданова, А.В. Крамарский, Л.А. Беловежец	С. 79
Оценка целесообразности и эффективности применения микробных препаратов для биоремедиации нефтезагрязненных почв на основе отечественного и зарубежного опыта	Н.Н. Терещенко, С.В. Лушников	С. 77
Подбор условий культивирования и клеточная селекция каллусов клевера ползучего на устойчивость к высоким дозам меди	А.А. Ермошин, М.Н. Цибизова, И.С. Киселева	С. 59
Проточные системы культивирования и принципы устойчивой организации микробных сообществ	А.Г. Дегерменджи	С. 31
Различная регуляция выхода семян из физиологического покоя и начала прорастания	Н.В. Обручева	С. 61
Регуляция транскрипции пластома *Arabidopsis* брассиностероидами	М.В. Ефимова, И.С. Ковтун, А.К. Кравцов, В.В. Кузнецов	С. 66
Роль высших растений в искусственных экосистемах	А.А. Тихомиров	С. 32
Семенное размножение *in vitro* видов рода *Cattleya* Lindl., интродуцированных в Сибирском ботаническом саду ТГУ	Г.Я. Степанюк, Л.В. Хоцкова	С. 74
Сообщество сульфатредуцирующих бактерий окисленных вод Черного и Балтийского морей	Н.В. Пименов, А.Л. Брюханов	С. 36
Сравнительная оценка состояния фотосинтетического аппарата *Pinus sibirica* и *Pinus pumila* в зимний период	О.Г. Бендер, А.П. Зотикова	С. 51
Структурные и физиолого-биохимические перестройки стареющих листьев сахарной свеклы при нитратном и углеводном стрессах	Г.А. Семенова, А.К. Романова, Н.С. Новичкова, А.Р. Игнатьев	С. 42

Трансгенные растения как модели для фундаментальных исследований в области физиологии растений	Е.В. Дейнеко, Е.С. Гвоздева	С. 34
Физиолого-биохимические основы применения фиторегуляторов в технологии выращивания сельскохозяйственных растений	Е.С. Роньжина	С. 63
Физиология растений – фундаментальная основа современных биотехнологий	Вл.В. Кузнецов	С. 29
Флуоресцентный метод в оценке стрессоустойчивости яровой пшеницы	Н.А. Гаевский, В.Ю. Ступко, Н.В. Зобова	С. 39
Фотосинтез, дыхание и соотношение дыхательных путей в процессе деэтиоляции проростков пшеницы	Е.В. Гармаш, М.А. Шелякин, Р.В. Малышев, Т.К. Головко	С. 57

Алфавитный список стендовых докладов

Влияние брассиностероидов на устойчивость растений рапса к засолению	А.В. Мануйлова, М.К. Малофий, И.С. Ковтун, М.В. Ефимова	С. 126
Влияние гормонального состава питательной среды при культивировании незрелых зародышей гороха в культуре in vitro	М.Н. Сащенко	С. 129
Влияние зеленого света на вегетативную стадию роста медицинских грибов *Lentinula edodes*	Л.Б. Глухова, Л.О. Соколянская, О.В. Карначук, Р.А. Карначук	С. 131
Влияние индолил-3-уксусной кислоты и мелатонина на ростовые процессы в растениях	Е.В. Соловьева, И.Ф. Головацкая	С. 133
Влияние красного света на активность ауксинов, гиббереллинов и абсцизинов у изогенных по генам ее линий сои	В.Ф. Тимошенко, В.В. Жмурко, А.А. Кубась	С. 87
Влияние полициклических ароматических углеводородов на фотосистему II растений гороха	А.В. Ланкин, В.Д. Креславский, С.И. Аллахвердиев	С. 136
Влияние синтетических простагландинов на биохимические процессы в проростках тритикале	М.А. Капустин, Н.В. Гавриленко, В.П. Курченко, Е.М. Лапковская, В.М. Юрин, Ф.С. Пашковский, Ф.А. Лахвич	С. 139
Действие дефицита воды на физиологические процессы сортов пшеницы Росинка и Омская 23	Н.П. Широкова	С. 90
Динамика содержания фитоэкдистероидов в новом продуценте *Silene colpophylla* Wrigley	А.А. Селиверстова, Л.Н. Зибарева	С. 142
Зависимость морфогенеза арабидопсиса от уровня экзогенного мелатонина и фотопериода синего света	У.А. Комарова, И.Ф. Головацкая	С. 144
Изучение биоразнообразия накопительных культур из вольфрамово-молибденового месторождения Бурятии	П.А. Бухтиярова, А.Л. Герасимчук, О.П. Иккерт, Э.В. Данилова, О.В. Карначук	С. 145
Изучение особенностей механизмов устойчивости кормовых культур к недостатку кислорода	С.А. Войцековская, Т.П. Астафурова, Г.С. Верхотурова, Г.В. Боровикова, В.М. Постовалова, А.А. Буренина	С. 92
Изучение устойчивости к меди у ацидофильного штамма *Desulfosporosinus* sp.I2	Е.В. Груздев, О.П. Иккерт, О.В. Карначук	С. 147
Использование "вложенной" ПЦР для амплификации гена 16S рРНК архей из природных образцов	В.В. Широкова, Ю.А. Франк, О.В. Карначук	С. 148
Использование силибининовой и силидианиновой хеморас расторопши пятнистой для создания сортов этого лекарственного растения	А.С. Чубарова, В.П. Курченко	С. 150
Красный свет как фактор криопротекции	Т.П. Якушенкова, Д.Ю. Юнусов	С. 94
Культивирование анаэробных ацидофильных микроорганизмов, восстанавливающих сульфаты, из экосистем кислых шахтных дренажей	М.А. Власова, А.Л.Герасимчук, О.П. Иккерт, О.В. Карначук	С. 153
Культивирование сульфидогенных микроорганизмов из подземной термальной воды скважины 3Р	С.М. Сафарян, Ю.А. Франк, О.В. Карначук	С. 155
Микробиологическая характеристика водных ресурсов минерализованных озер степного Алтая	Т. М. Тронова, О. В. Арсеньева, Н. Г. Клопотова	С. 96
Наследование гетерологичного гена *HMG1* у потомков трансгенного табака и реакции проростков на экзогенную обработку фитогормонами	С.А. Борцова, Ю.В. Санаева, А.А. Ермошин, В.В. Алексеева	С. 157
О возможности совместного использования микроорганизмов и микроэлементов для регулирования роста и развития саженцев винограда	С.Г. Великсар, Н.Б. Леманова, С.И. Тома, В.Д. Балан	С. 98
Особенности аккумуляции наночастиц платины органами проростков пшеницы и гороха в зависимости от специфики субстрата	Т.П. Астафурова, Г.В. Боровикова, А.П. Зотикова, Г.С. Верхотурова, В.М. Постовалова	С. 101

Особенности листового аппарата кедра сибирского в суходольных экотопах юга Западной Сибири	А.Г. Бендер, О.Г. Бендер	С. 159
Особенности морфогенных процессов трансгенных растений табака под действием верапамила на ранних этапах онтогенеза	Е.С. Гвоздева, Е.Д. Данилова, Л.В. Коломейчук, Е.В. Дейнеко, Р.А. Карначук	С. 104
Получение клеточной суспензионной культуры трансгенного табака *Nicotiana tabacum* L., содержащего ген uidA, для создания на ее основе биопродуцентов рекомбинантных белков	Е.С. Гвоздева, М.В. Дочупайлова, Е.В. Дейнеко	С. 107
Получение новых высокопродуктивных линий княжика сибирского *Atragene speciosa* Weinm. в культуре in vitro	Ю.В. Медведева, В.Ю. Дорофеев, С.В. Песяк, Р.А. Карначук	С. 110
Роль 24-гомобрассинолида и селена в регуляции морфогенеза *Arabidopsis thaliana*	Е.А. Борисова, И.Ф. Головацкая	С. 161
Роль темнового дыхания в продукционном процессе	Т.И. Голованова, А.Ф. Валиулина	С. 112
Регулятор роста и развития растений мелафен предотвращает дисфункцию митохондрий проростков гороха в условиях недостаточного увлажнения	И.В. Жигачева, Е.Б. Бурлакова, И.П. Генерозова, А.Г. Шугаев, С.Г. Фаттахов	С. 114
Регуляция роста оздоровленных растений картофеля сортов, районированных в Сибири в условиях in vitro и гидропоники для усиления их продукционного процесса	В.Ю. Дорофеев, И.Ф. Головацкая, Ю.В. Медведева, П.Е. Никифоров, Р.А. Карначук	С. 117
Регуляция селеном биохимического состава растений *Lactuca sativa* L. При коррекции солнечного излучения	И.Ф. Головацкая, А.В. Крахалева, Ю.М. Кулагина	С. 118
Мелатонин как возможный регулятор метаболизма у клеточной культуры *Saussurea orgaadayi*	Н.А. Володина, И.Ф. Головацкая	С. 162
Снижение вязкости нефти с применением уробактерий выделенных из природных источников	Ю.З. Гусева	С. 165
Содержание пигментов в листьях разных видов клевера, произрастающих в различных условиях влажности	В.Н. Крашенинников, В.Н. Хрянин	С. 121
Солевое влияние на клеточный цикл корневой меристемы трансгенных (FeSOD) линий томата	Е.К. Серенко, Н.В. Кононенко, А.А. Гулевич, Н.В. Куренина, Е.Н. Баранова	С. 168
Физиологические показатели яровой пшеницы, структура урожая и урожайность при обработке семян препаратами из помета	А.В. Кравец	С. 123

Список участников

Арсеньева Ольга Вячеславовна	Томский научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии, г. Томск	olga_best70@mail.ru
Астафурова Татьяна Петровна	Сибирский ботанический сад Томского государственного университета, г. Томск	agronomia@sibmail.com
Бендер Анна Геннадьевна	Томский государственный университет, г. Томск	annabender@inbox.ru
Бендер Ольга Григорьевна	Институт мониторинга климатических и экологических систем СО РАН, г. Томск	obender65@mail.ru
Бонч-Осмоловская Елизавета Александровна	Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, г. Москва	lbo@mail.ru
Борисова Евгения Александровна	Томский государственный университет, г. Томск	borisova200292@yandex.ru
Бухтиярова Полина Александровна	Томский государственный университет, г. Томск	poljan4ik@mail.ru
Великсар София Георгиевна	Институт генетики и физиологии растений АН РМ, г. Кишинэу, Молдова	dechevas@rambler.ru
Власова Мария Александровна	Томский государственный университет, г. Томск	Kagasyka@mail.ru
Володина Наталья Александровна	Томский государственный университет, г. Томск	Confeta-NV@yandex.ru
Войцековская Светлана Анатольевна	Томский государственный педагогический университет, г. Томск	euvit@bk.ru
Гаевский Николай Александрович	Сибирский федеральный университет, г. Красноярск	nikgna@gmail.com
Гвоздева Елена Станиславовна	Томский государственный университет, г. Томск	ivanova_ls@rambler.ru
Герасимчук Анна Леонидовна	Томский государственный университет, г. Томск	gerasimchuk_ann@mail.ru
Глухова Любовь Борисосвна	Томский государственный университет, г. Томск	glb122@mail2000.ru
Голованова Тамара Ивановна	Сибирский федеральный университет, г. Красноярск	tigolovanova@mail.ru
Головацкая Ирина Феоктистовна	Томский государственный университет, г. Томск	golovatskaya.irina@mail.ru
Груздев Евгений Владимирович	Томский государственный университет, г. Томск	qwerty765123@vtomske.ru
Гусева Юлия Зинуровна	Институт химии нефти СО РАН, г. Томск	shagabieva1412@mail.ru
Данилова Елена Дмитриевна	Томский государственный университет, г. Томск	danilova_lenochk@mail.ru
Дегерменджи Андрей Георгиевич	Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск	ibp@ibp.ru

Дейнеко Елена Викторовна	Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск	deineko@bionet.nsc.ru
Дорофеев Вячеслав Юрьевич	Томский государственный университет, г. Томск	karnach@mail.tsu.ru
Дочупайлова Мария Васильевна	Томский государственный университет, г. Томск	Maria-Caurus7@yandex.ru
Ермошин Александр Анатольевич	Уральский федеральный университет, г. Екатеринбург	bos_o@mail.ru
Ефимова Марина Васильевна	Томский государственный университет, г. Томск	stevmv555@gmail.com
Жигачева Ирина Валентиновна	Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва	zhigacheva@mail.ru
Зотикова Альбина Петровна	Томский государственный университет, г. Томск	zotik.05@mail.ru
Иккерт Ольга Павловна	Томский государственный университет, г. Томск	but310@mail.ru
Казаковцева Марина Витальевна	Томский государственный университет, г. Томск	Marina-kazakovceva@rambler.ru
Капустин Максим Александрович	Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь	maximkapustin84@gmail.com
Карначук Ольга Викторовна	Томский государственный университет, г. Томск	olga.karnachuk@green.tsu.ru
Киселёва Ирина Сергеевна	Уральский федеральный университет, г. Екатеринбург	Irina.Kiselyova@usu.ru
Ковтун Ирина Сергеевна	Томский государственный университет, г. Томск	kovtunirina2@gmail.com
Коломейчук Лилия Виктровна	Томский государственный университет, г. Томск	forgotten@docsis.ru
Комарова Ульяна Алексеевна	Томский государственный университет, г. Томск	uliana0891@mail.ru
Кравец Александра Владимировна	Сибирский НИИ сельского хозяйства и торфа Россельхозакадемии, г. Томск	kravets@sibmail.com
Кузнецов Виктор Васильевич	Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва	vkusnetsov2001@mail.ru
Кузнецов Владимир Васильевич	Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва	vlkuzn@mail.ru
Ланкин Антон Вадимович	Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва	lankin_a@sibmail.com
Малофий Марина Константиновна	Томский государственный университет, г. Томск	marina_malofii@mail.ru
Мануйлова Арина Владимировна	Томский государственный университет, г. Томск	arinamanuylova@gmail.com
Маркова Юлия Александровна	Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск	Juliam06@mail.ru

Медведева Юлия Валерьевна	Томский государственный университет, г. Томск	karnach@mail.tsu.ru
Минич Александр Сергеевич	Томский государственный педагогический университет, г. Томск	minich@tspu.edu.ru
Обручева Наталья Владимировна	Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва	obroucheva@ippras.ru
Овсянникова Варвара Сергеевна	Институт химии нефти СО РАН, г. Томск	sli@ipc.tsc.ru
Патова Елена Николаевна	Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар	patova@ib.komisc.ru
Пермякова Наталья Леонидовна	Томский государственный педагогический университет, г. Томск	minich@tspu.edu.ru
Пименов Николай Викторович	Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, г. Москва	npimenov@mail.ru
Попова Юлия Викторовна	Харьковский национальный университет им. И.Н. Каразина, г. Харьков, Украина	Popova.Ju.V@gmail.com
Роньжина Елена Степановна	Калининградский государственный технический университет, г. Калининград	ron-box@mail.ru
Сафарян Софья Михайловна	Томский государственный университет, г. Томск	safaryan.sofi@yandex.ru
Сащенко Мария Николаевна	Всероссийский НИИ сахарной свеклы им. А.Л. Мазлумова, г. Воронеж	samani84@mail.ru
Сваровская Лидия Ивановна	Институт химии нефти СО РАН, г. Томск	sli@ipc.tsc.ru
Селиверстова Анна Александровна	Сибирский ботанический сад Томского государственного университета, г. Томск	anna.july@sibmail.com
Семенова Галина Алексеевна	Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино	aromanova27@rambler.ru
Серенко Екатерина К.	Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, г. Москва	greenpro2007@rambler.ru
Соколянская Людмила Олеговна	Томский государственный университет, г. Томск	Lusi5055@yandex.ru
Соловьева Екатерина Владимировна	Томский государственный университет, г. Томск	CaterinaSoloveva@gmail.com
Степанюк Галина Яковлевна	Сибирский ботанический сад Томского государственного университета, г. Томск	sbg_biotech@sibmail.com
Терещенко Наталья Николаевна	Сибирский НИИ сельского хозяйства и торфа Россельхозакадемии, г. Томск	ternat@mail.ru

Тимошенко Владимир Федорович	Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, г. Харьков, Украина	vltim1@yandex.ru
Тихомиров Александр Аполлинарьевич	Институт биофизики СО РАН, г. Томск	alex-tikhomirov@yandex.ru
Тронова Татьяна Михайловна	Томский научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии, г. Томск	resurs@niikf.tomsk.ru
Турская Анна Леонидовна	Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск	turskaya-anna@mail.ru
Филатов Дмитрий Александрович	Институт химии нефти СО РАН, г. Томск	filatov@ipc.tsc.ru
Франк Юлия Александровна	Томский государственный университет, г. Томск	yulia.frank@rambler.ru
Хоцкова Любовь Витальевна	Сибирский ботанический сад Томского государственного университета, г. Томск	sbg_biotech@sibmail.com
Хрянин Виктор Николаевич	Пензенский государственный университет, г. Пенза	viktor.khryanin@gmail.com
Чубарова Анна Сергеевна	Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь	ann.shchekatihina@gmail.com, kurchenko@tut.by
Шелякин Михаил Анатольевич	Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар	shelyakin@ib.komisc.ru
Широкова Вера Владимировна	Томский государственный университет, г. Томск	vera.shirokova_9@mail.ru
Широкова Наталья Петровна	Омский государственный педагогический университет, г. Омск	Natalivita@mail.ru
Якушенкова Татьяна Петровна	Казанский Приволжский Федеральный университет, г. Казань	tyakushe@mail.ksu.ru

2-000900

Томский госуниверситет 1878
Научная библиотека 00864332

Отпечатано в ООО “КИРОЛ” 2.04.2013 г.
тираж 75 экземпляров.
г. Томск