

**Влияние солевого стресса на функционирование сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы *Zea mays* L.****Научный руководитель – Епринцев Александр Трофимович**Анохина Г.Б.<sup>1</sup>, Карабутова Л.А.<sup>1</sup>

1 - Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Индукцированные солью изменения в работе ферментов вносят существенный вклад в формирование адаптации клетки к действию стрессора. Наибольший интерес к ферментным системам C<sub>4</sub>-растений обусловлен особенностями морфо-физиологической структуры и функционированием цикла Хэтча-Слэка [2]. Согласно литературным данным, среди растений с C<sub>4</sub>-типом метаболизма наиболее чувствительным к солевому стрессу видом является кукуруза (*Zea mays* L.) [3]. Сукцинатдегидрогеназа (СДГ, К.Ф. 1.3.99.1), являющаяся маркерным ферментом ЦТК, представляет собой сложный мультиферментный комплекс, состоящий из 4 субъединиц. Ранее нами было показано, что СДГ участвует в адаптивной реакции клеточного метаболизма к солевому стрессу. При этом, повышение активности СДГ в первые часы действия стресса было обусловлено активацией экспрессии гена *sdh2-3*, кодирующего субъединицу В [1]. Информация о влиянии солевого стресса на экспрессию гена *sdh1-2*, кодирующего субъединицу А, не была обнаружена. В связи с этим, целью данной работы являлось исследование роли регуляции экспрессии генов *sdh1-2*, *sdh3*, *sdh4* сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы в условиях солевого стресса.

Использовались листья 10-12 дневной кукурузы сорта Воронежская-76, выращенные гидропонно при десятичасовом световом дне. Действие солевого стресса осуществлялось путем помещения растений с предварительно удаленной корневой системой в раствор хлорида натрия (150 мМ) на 24 ч. В первые часы воздействия стресса в листьях кукурузы наблюдалась активация СДГ. Максимум активности был обнаружен на 3 ч инкубации, после чего наблюдалось постепенное ее снижение. Спустя 24 ч инкубации, отмечено падение активности СДГ ниже уровня контроля. Полученные результаты свидетельствуют об индукции функционирования ЦТК хлоридом натрия на начальных этапах действия стрессора. Ранее в нашей лаборатории было показано, что активность СДГ и МДГ в листьях амаранта под действием солевого стресса также значительно увеличивалась [4].

Анализ транскрипционной активности генов *sdh1-2* и *sdh2-3* показал их корреляцию с изменением ферментативной активности - уровень транскриптов генов *sdh1-2* и *sdh2-3* был выше контрольных значений в первые часы инкубации. Солевой стресс непродолжительно стимулирует экспрессию гена *sdh3* и оказывает ингибирующее действие на работу гена *sdh4*, кодирующих С и D субъединицы мембран-связанного домена СДГ. В дальнейшем наблюдалось падение транскрипционной активности исследуемых генов. Таким образом, интенсификация функционирования СДГ, вероятно, обусловлена повышением уровня энергизации клетки для нейтрализации негативного влияния NaCl в первые часы стресса. Увеличение активности СДГ обусловлено интенсификацией экспрессии генов, кодирующих каталитический домен СДГ, включающий А и В субъединицы.

**Источники и литература**

- 1) Анохина Г.Б. Влияние абиотических факторов на активность СДГ в проростках кукурузы // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. Межрегиональный сборник научных работ. Воронеж. 2016, В. 18. с. 91

- 2) Епринцев А.Т., Федорина О.С., Бессмельцева Ю.С. Реакция малатдегидрогеназной системы мезофилла и обкладки кукурузы на солевой стресс // Физиология растений, 2011. Т.58.№: 3.С.384-390
- 3) Калайи Х. , Рутковска А. Стресс от соли .Как определить эту проблему с помощью флуориметра // Зерно, 2010. Т.1. С.76-83
- 4) Хаба А. М. Экспрессионная регуляция генов малатдегидрогеназы в амаранте сорта «Харьковский» при засолении // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация.2013.№ 2.С.88-90

**Проантоцианидины клеточных стенок каллусных культур чайного растения  
(*Camellia sinensis* L.)**

**Научный руководитель – Загоскина Наталья Викторовна**

**Зубова Мария Юрьевна**

*Аспирант*

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

*E-mail: mariaz1809@gmail.com*

Проантоцианидины (ПА) представляют собой производные флаван-3-олов с различной степенью полимеризации [6]. В растительной клетке они локализируются преимущественно в вакуолях и значительно реже - в клеточной стенке [2]. Научный интерес к ПА обусловлен их высокой биологической активностью и возможностью применения для профилактики и лечения различных заболеваний [3].

Ранее было показано, что растения чая обладают специализированным обменом, направленным на биосинтез флаванов, в том числе и ПА. И эта особенность сохраняется при их культивировании в условиях *in vitro* [1]. Известно, что культуры клеток и тканей растений обладают свойством тотипотентности, выращиваются в строго контролируемых условиях и могут служить продуцентами различных биологически активных веществ [4].

Целью исследования являлось изучение накопления проантоцианидинов в клеточных стенках гетеротрофной и фотомиксотрофной каллусных культур чайного растения.

Каллусные культуры *Camellia sinensis* L. выращивали в темноте или при 16-часовом фотопериоде на модифицированной питательной среде Хеллера, содержащей глюкозу (2,5%) и 2,4-Д (5 мг/л). Длительность пассажа составляла 7 недель. Содержание ПА определяли во фракции клеточных стенок стандартным методом [5].

Установили, что по мере роста культур уровень и характер накопления ПА в клеточных стенках изменялся. В гетеротрофном каллусе их содержание значительно снижалось (почти в 2 раза) к середине пассажа, а к концу - вновь возрастало. В фотомиксотрофной культуре, для которой характерно высокое содержание ПА в клеточных стенках (в 1,5-2 раза выше, чем в гетеротрофной), существенных изменений не отмечалось. Лишь к концу пассажа их количество снижалось в 1,5 раза. Следовательно, уровень накопления ПА в клеточных стенках каллусных культур чайного растения зависит от условий их культивирования (темнота, свет) и стадии их роста.

**Источники и литература**

- 1) Загоскина Н. В. и др. Культура ткани чайного растения: дифференциация, уровень плоидности, образование фенольных соединений // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 5. С. 762.
- 2) Debeaujon I. et al. Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis thaliana*: regulation of differentiation and role in seed development // Plant Cell. 2003. V. 15. № 11. P. 2514-2531.
- 3) Min B., Gu L., McClung A.M., Bergman C.J., Chen M.H. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours // Food Chemistry. 2012. V. 133. № 3. P. 715-722.

- 4) Nosov A. M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // Applied biochemistry and microbiology. 2012. V. 48. № 7. P. 609-624.
- 5) Ossipova S., Ossipov V., Haukioja E., Loponen J., Pihlaja K. Proanthocyanidins of mountain birch leaves: quantification and properties // Phytochemical Analysis. 2001. V. 12. № 2. P. 128-133.
- 6) Zhao J., Pang Y., Dixon R. A. The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization // Plant Physiology. 2010. V. 153. № 2. P. 437-443.

**Фенольный комплекс листьев диплоидного и тетраплоидного сортов  
*Fagopyrum esculentum***

**Научный руководитель – Загоскина Наталья Викторовна**

**Казанцева Варвара Викторовна**

*Аспирант*

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

*E-mail: k.v.-90@mail.ru*

Получение полиплоидных форм растений является перспективным направлением в селекции сельскохозяйственных культур на повышение их продуктивности. Они характеризуются более крупными размерами, ускоренным ростом и нередко повышенным содержанием биологически активных веществ [3]. Все это имеет важное значение, особенно в случае получения из них соединений для фармакологических целей.

Гречиха обыкновенная представляет собой перспективную культуру для создания аутополиплоидных сортов, которые характеризуются быстрой адаптацией к экологическим условиям. Уникальной особенностью гречихи является способность к накоплению биологически активных веществ фенольной природы. Из ее надземной массы получают флавоноид рутин (кверцетин-3-О-рутинозид), используемый при создании препаратов для лечения сердечно-сосудистой системы, предотвращения ломкости капилляров и других заболеваний [1]. Однако до сих пор нет ясности в вопросе о составе фенольных соединений у растений гречихи посевной с различным уровнем пloidности.

Объектом исследования являлись 9-дневные проростки гречихи обыкновенной (*Fagopyrum esculentum* Moench) сорта Девятка (2n) и Большевик 4 (4n), которые выращивали в условиях факторостата при 24°C и 16-ч фотопериоде. Фенольные соединения извлекали из семядольных листьев экстракцией 96%-ным этанолом и анализировали методом ВЭЖХ [2].

В семядольных листьях исследуемых сортов гречихи были идентифицированы следующие фенольные соединения: хлорогеновая кислота (класс фенолпропаноидов), рутин (класс флавонолов), а также витексин, изовитексин, ориентин, изоориентин (класс флавонов). При этом у полиплоидного сорта содержание идентифицированных веществ было значительно выше, чем в диплоидном. Так, количество хлорогеновой кислоты у сорта Большевик 4 было выше на 57%, относительно сорта Девятка, флавонолов - на 68-73%, рутина - на 65%.

Полученные данные свидетельствуют о том, что тетраплоидные растения гречихи посевной характеризовались более высокой способностью к накоплению биологически активных веществ фенольной природы, по сравнению с диплоидными, на фоне отсутствия различия в основных их компонентах.

### **Источники и литература**

- 1) Анисимова М.М., Куркин В.А., Ежов В.Н. Качественный и количественный анализ флавоноидов травы гречихи посевной // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2010, т. 12, №1 (8). С. 2011-2014.
- 2) Зайцев Г. П., Мосолкова В. Е., Гришин Ю. В., Черноусова И. В., Огай Ю. А., Авидзба, А. М. Фенольные компоненты винограда сорта Каберне-Совиньон винодельческих хозяйств Крыма // Химия растительного сырья. 2015, №. 2.
- 3) Хатефов Э. Б., Щербак В. С. Роль полиплоидии в селекции сельскохозяйственных культур // Владимирский земледелец. 2011, №. 2. С. 15-16.

**Триба *Cynareae* семейства Asteraceae флоры Южной Сибири как перспективный источник биологически активных веществ**

**Научный руководитель – Зибарева Лариса Николаевна**

**Кастерова Евгения Александровна**

*Аспирант*

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства, Томск, Россия

*E-mail: borisova200292@yandex.ru*

Триба *Cynareae* широко представлена во флоре Южной Сибири. Многие виды обладают богатым химическим составом, используются в официальной и народной медицине. Литературные данные свидетельствуют о наличии у них флавоноидов, кумаринов, тритерпеноидов, алкалоидов и многих других биологически активных веществ (БАВ), обладающих спектром фармакологических активностей - противоопухолевой, антибактериальной, противовоспалительной и др. [1].

Данная работа посвящена изучению химического состава представителей трибы *Cynareae*, влияния условий произрастания на накопление БАВ.

Объектами исследования выбраны слабо изученные виды трибы *Cynareae* из родов: *Serratula* L. (3 вида), *Centaurea* L. (2 вида), *Saussurea* DC. (10 видов), *Cirsium* Mill. (1 вид), *Ancathia* DC. (1 вид). Экстракты надземной части растений изучали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В результате исследования идентифицированы индивидуальные соединения, принадлежащие к двум группам веществ - флавоноиды и экдистероиды. Наиболее высокое содержание флавоноидов характерно для *Saussurea alpina* - 2,3, *Saus. frolowii* - 2,2, *Centaurea scabiosa* - 2,0 %, наименьшее - *Saussurea amara*, *Serratula kirgisorum*, *Ancathia igniaria* (по 0,2 %). Ранее сообщалось [2], что содержание флавоноидов в *Saus. frolowii* и *Saus. salicifolia* составило 2,9 и 2,0 %, соответственно.

Экдистероиды обнаружены в *Serratula centauroides* - 0,15 и *Ser. kirgisorum* - 0,06 %. Ранее авторами [3, 4] показано, что эти виды содержат экдистероиды (1,69 и 0,06 %, соответственно). По данным ВЭЖХ экдистероиды обнаружены в *Saussurea amara* - 0,07, *Saus. porcii* - 0,19, *Saus. alpina* - 0,55, *Saus. salicifolia* - 1,18 %. Однако эти результаты требуют дальнейшего химического подтверждения, в связи с тем, что пока нет достоверных данных о присутствии экдистероидов в видах *Saussurea* [5].

Отмечено, что количество БАВ существенно варьирует в зависимости от фазы вегетации, места произрастания, климатических условий. В эксперименте виды, собранные в районах с семиаридным климатом, отличались низким содержанием БАВ по сравнению с видами, собранными в субальпийском поясе. Так, *Saus. frolowii*, собранная на территории опустыненной степи на Алтае, содержала 0,2 % флавоноидов, а растения, произрастающие на территории субальпийского редколесья в Кузнецком Алатау - 2,2 %.

В результате проведенного исследования флавоноиды обнаружены во всех исследованных видах трибы *Cynareae*, их содержание варьирует в видах *Saussurea* от 0,2 до 2,3 %, в *Serratula* от 0,2 до 1,0 %, в *Centaurea* от 0,7 до 2,0 %. Экдистероиды выявлены в ряде видов *Saussurea* и *Serratula* (0,1-1,2 %).

#### **Источники и литература**

- 1) Буданцев А.А. Растительные ресурсы России. М, 2013. 312 с.
- 2) Шурупова М.Н. Исследование химического состава некоторых видов *Saussurea* // Лек. раст.: фунд. и прикл. проб. Мат. II Межд. научн. конф. Нск, 2015. С. 131-133.

- 3) Bespayeva A.M. et al. The spread of 20-hydroxyecdysone and its analogues in plant // Chemistry. 2012. 2(66). P. 13-16.
- 4) Vorob'eva A.N. et al. Phytoecdysteroids from *Serratula centauroides* // Chem. of Nat. Comp. 2005. 41(1). P. 105-106.
- 5) Ecdybase.org: <http://ecdybase.org>

**Влияние фолиарной обработки наночастицами серебра на биохимические показатели картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и фитопатогенные микромицеты**

**Научный руководитель – Пашкевич Елена Борисовна**

***Королев Петр Сергеевич***

*Студент (магистр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет почвоведения, Кафедра агрохимии и биохимии растений, Москва, Россия

*E-mail: petrkorole@googlemail.com*

В начале XXI века наноматериалы нашли широкое применение в сельском хозяйстве и растениеводстве. Это обусловлено особенностями наночастиц, их значительной удельной поверхностью и пролонгированным действием. Наночастицы серебра (НЧ) обладают бактерицидными и фунгицидными свойствами, что позволяет использовать их для обработки растений при заражении их фитопатогенными микромицетами.

Целью работы было изучение воздействия фолиарной обработки растений картофеля водными дисперсиями НЧ серебра на некоторые биохимические характеристики и полевая оценка развития фитопатогенов на побегах картофеля. Были поставлены следующие задачи: заложить полевой опыт, провести фолиарную обработку картофеля НЧ серебра, оценить влияние обработки на биохимические показатели и провести полевое определение устойчивости картофеля к фитофторозу на разных стадиях роста растений. Полевой мелкоделяночный опыт был заложен на дерново-подзолистой среднесуглинистой почве на территории агробиостанции МГУ «Чашниково». На ней выращивали картофель сорта «Удача» и проводили обработку дисперсиями НЧ, полученными восстановлением серебра из его нитрата боргидридом натрия и стабилизированным амфотерным поверхностно-активным веществом (ПАВ). Схема опыта состояла из 6 вариантов: 1 - Контроль (растения без фолиарной обработки), 2 - фолиарная обработка растений ПАВ 800 мг/л, 3 - фолиарная обработка растений ПАВ 1600 мг/л, 4 - фолиарная обработка растений ПАВ 800 + Ag 25 мг/л, 5 - фолиарная обработка растений ПАВ 800 + Ag 50 мг/л, 6 - фолиарная обработка растений ПАВ 1600 + Ag 100 мг/л. Параллельно с обработкой проводили полевой анализ растений на устойчивость к фитофторозу и определяли содержание пигментов (хлорофилла и каротиноидов) и активность фермента каталазы в листьях.

Анализ полученных данных урожая растений показал эффективность обработки дисперсией ПАВ 800 + Ag 50 мг/л: прирост урожая клубней составлял 12 % по сравнению с контрольным вариантом. При этом содержание хлорофилла снижалось на 19 %, в то время как концентрация каротиноидов наоборот - увеличилась на 5 %. Активность каталазы была максимальна в последнем варианте опыта (ПАВ 1600 + Ag 100 мг/л), что позволяет предположить наличие окислительного стресса у растений картофеля при обработке высокими концентрациями НЧ серебра. Проведенный полевой анализ растений на устойчивость к фитофторозу показал, что при использовании дисперсии НЧ серебра в концентрации 50 мг/л поражение растений картофеля фитопатогенными микромицетами снижалось на 17% по сравнению с контролем. Для остальных вариантов опыта этот показатель был значительно меньше.

На основании полученных данных мы сделали вывод, что обработка дисперсиями НЧ серебра в концентрации 50 мг/л является оптимальной для растений картофеля.



**Диагностика образцов редиса (*Raphanus sativus* L.) коллекции ВИР на устойчивость к алюмотоксичности кислых почв**

**Научный руководитель – Артемьева Анна Майевна**

**Курина Анастасия Борисовна**

*Аспирант*

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Москва, Россия

*E-mail: nastya\_n11@mail.ru*

Сельскохозяйственные культуры различаются по устойчивости к токсическим элементам кислых почв. Для роста редиса наиболее благоприятна слабокислая реакция почвенного раствора (рН 5,5-6,0). Особенно чувствительны растения редиса в начальные периоды роста. Токсическое действие почвенной кислотности связано с высоким содержанием ионов  $Al^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$  и других металлов, доступность которых для растений резко возрастает на фоне низких значений рН почвенного раствора. Наиболее негативно сказывается на жизнедеятельности растений избыток алюминия в почве. Накопление алюминия в тканях корня нарушает процессы деления клеток, инициации и роста боковых корней, снабжения растения минеральными веществами и водой [1].

В ряде лабораторных методов оценки растений на устойчивость к алюмотоксичности используются красители (гематоксилин, эриохромцианин). Уровень устойчивости оценивается по степени повреждения корней алюминием и их способности восстанавливать рост после токсического действия этого металла [2].

Данное исследование было направлено на определение токсической концентрации алюминия, дифференцирующей образцы редиса по степени алюмоустойчивости, и диагностику части коллекции редиса по данному признаку. Объектом исследования были 30 образцов редиса различного эколого-географического происхождения из коллекции ВИР. За основу был взят метод оценки алюмоустойчивости зерновых культур с использованием эриохромцианинового красителя [3]. Метод заключался в следующем: семена проращивали в растительной воде в течение 3 суток; затем растительные проростки помещали на питательный раствор (0,4мМ  $CaCl_2$ , 0,4 мМ  $KNO_3$ , 0,25 мМ  $MgCl_2$ , 0,01 мМ  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,04М  $NH_4NO_3$ ), содержащий токсические концентрации хлорида алюминия (16, 20, 24 мг/л; рН 4,2) на 24 ч; инкубировали проростки в том же питательном растворе без алюминия в течение 2 суток и окрашивали корни 0,1 % раствором эриохромцианина в течение 10 мин. Зона повреждения тканей корней алюминием окрашивалась в фиолетовый цвет. Устойчивость растений к алюминию определяли по способности к восстановлению роста корней после воздействия токсиканта.

Концентрация алюминия 16 мг/л была менее токсичной для всех образцов, так как прирост корней после воздействия токсиканта был высоким ( $14 \pm 2$  мм). При концентрации 20 мг/л отрастание корней у 63,3% изучаемых образцов снизилось и составляло 8-10 мм; у 9% образцов изменений не было, у 6,7% увеличился прирост корней на 1-5 мм. При концентрации алюминия 24 мг/л отрастание корня у 50% образцов было низким (1-7 мм), у 40% образцов отсутствовал дальнейший рост корней. Только три образца (к-1666, к-2222, к-2260) из России и Венгрии можно отнести к высокоустойчивым, так как наблюдался прирост корня 11-14 мм. Образцы с минимальной (1-7 мм) длиной отрастания корня характеризовались интенсивной фиолетовой окраской обработанного алюминием участка корня, а образцы с максимальной (12-14 мм) длиной отрастания корня имели слабое, но детектируемое окрашивание.

В результате данного исследования выявлено, что редис имеет высокую вариабельность по алюмотолерантности при разной напряженности стрессора. Благодаря проведенному скринингу удалось определить внутривидовую изменчивость растений редиса на ранних этапах вегетации и идентифицировать контрастные по устойчивости к алюминию генотипы. Можно рекомендовать концентрацию алюминия 20 мг/л для оценки алюмоустойчивости редиса, а концентрацию 24 мг/л для выявления наиболее алюмотолерантных генотипов.

### Источники и литература

- 1) Климашевский Э.Л. Генетический аспект минерального питания растений. М.,1991.
- 2) Косарева И.А., Давыдова Г.В., Семенова Е.В. Методические указания по определению кислотоустойчивости зерновых культур, ВИР, СПб., 1995.
- 3) Aniol A. Tolerancyinosa zboz na toksyozne dzialanietonow gtinu // Bul. inst. hodowli i aklim roslin. 1985. № 158. P. 7-11.

**NO-индуцируемая аутофагия в растительных клетках**

**Научный руководитель – Минибаева Фарида Вилевна**

**Мазина Анастасия Борисовна**

*Студент (магистр)*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной  
медицины и биологии, Казань, Россия

*E-mail: abmazina@gmail.com*

В настоящее время аутофагию рассматривают как неспецифическую стрессовую реакцию клеток, которая способствует выживанию или программируемой гибели отдельных клеток и выживанию всего организма [2]. Активные формы кислорода (АФК) и азота являются сигнальными молекулами, участвующими в аутофагии в эукариотических клетках, однако данные об NO-опосредованной регуляции аутофагии в клетках растений отсутствуют в литературе. Настоящая работа направлена на изучение индукции аутофагии и изменения редокс-статуса клеток корней проростков пшеницы при воздействии NO-доноров.

Нами показано, что обработка интактных проростков пшеницы NO-донорами (1 мМ  $\text{KNO}_2$ , 10 мМ  $\text{KNO}_3$ , 10 мкМ нитропруссид, 1/10/100 мкМ спермин (Спм)) приводит к повышению уровня NO в клетках корней, что подтверждалось увеличением флуоресценции NO-специфичного красителя DAF-FM и характерными триплетными ЭПР спектрами NO.

Применение NO-доноров индуцировало образование аутофагосом, визуализация которых осуществлялась при помощи конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентного маркера LysoTracker Red.  $\text{KNO}_2$ , нитропруссид и Спм (1 и 10 мкМ) индуцировали образование аутофагосом уже после 3 ч воздействия, в то время как  $\text{KNO}_3$  индуцировал образование аутофагосом только после 12 ч воздействия. Образование аутофагосом сопровождалось усилением экспрессии аутофагических генов (ATG 4 / ATG 6 / ATG 8 I, II, III). Активация аутофагии при действии доноров NO не приводила к снижению жизнеспособности клеток. NO-индуцированная аутофагия сопровождалась увеличением содержания в клетках  $\text{H}_2\text{O}_2$ , но не ПОЛ. Достоверное повышение уровня ПОЛ наблюдалось только при действии 100 мкМ Спм. Это свидетельствует о регуляторном действии NO-доноров на клетки корней.

Известно, что аутофагия является энергозависимым процессом [1]. NO-опосредованная аутофагия сопровождалась незначительным повышением митохондриального мембранного потенциала при действии  $\text{KNO}_3$  и спермина в низких концентрациях. Действие  $\text{KNO}_2$ , нитропруссид и спермина (100 мкМ) приводило к снижению  $\Delta\Psi_m$ . Аналогичным образом изменялась интенсивность дыхания.

Таким образом, в растениях NO-доноры приводят к повышению уровня NO, накоплению АФК и индуцируют образование аутофагосом, которое сопровождается экспрессией аутофагических генов. Вероятно, запуск аутофагии при действии NO-доноров может быть обусловлен изменением функциональной активности митохондрий.

**Источники и литература**

- 1) Пупышев, А.Б. Репаративная аутофагия и аутофаговая гибель клетки, функциональные и регуляторные аспекты // Цитология. 2014. Т. 56. С. 179-196.
- 2) Parzych, K.R., Klionsky. D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation // Antioxidants & Redox Signaling. 2014. V. 20. P.460-473.

**Функциональная комплементация мутанта *Saccharomyces cerevisiae*  $\Delta gef1$  генами *SaCLCa1* и *SaCLCc1* из галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall****Научный руководитель – Балнокин Юрий Владимирович***Неделяева О.И.<sup>1</sup>, Шувалов А.В.<sup>2</sup>*

1 - Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия; 2 - Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

Семейство хлоридных каналов (CLC) растений включает анион/протонные антипортеры и анионные каналы, локализованные в эндомембранах. CLC участвуют в стимуляции закисления люмена органелл, регуляции мембранного потенциала и накоплении в них анионов  $\text{Cl}^-$  и  $\text{NO}_3^-$ .

Клонировано 2 гена из соленакапливающего галофита *Suaeda altissima* - *SaCLCa1* и *SaCLCc1*. Наиболее вероятно, что оба гена относятся к семейству CLC, так как нуклеотидные последовательности кодирующих областей генов в большей степени сходны с последовательностями CLC других растений. На основе анализа аминокислотной последовательности можно предположить, что оба белка являются анион/ $\text{H}^+$  - антипортерами, *SaCLCa1* транспортирует  $\text{NO}_3^-$ , а *SaCLCc1* -  $\text{Cl}^-$ .

В работе исследовали физиологические функции *SaCLCa1* и *SaCLCc1*. Для этого осуществили гетерологическую экспрессию *SaCLCa1* и *SaCLCc1* в мутанте *Saccharomyces cerevisiae* по единственному гену семейства CLC - *GEF1*, участвующему в транспорте  $\text{Cl}^-$ .

Нокаут *GEF1* приводит к фенотипу *petite*, подавлению роста мутанта на средах, дефицитных по железу и содержащих неферментируемые источники углерода; на минимальных средах с pH 7.0; на средах с повышенным содержанием токсичных катионов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ).

Для проведения функциональной комплементации получен дрожжевой делеционный мутант  $\Delta gef1$  на основе штамма W303. Положительным контролем комплементации мутации  $\Delta gef1$  служил *CLCd*, клонированный из *Arabidopsis thaliana*.

Рост мутанта  $\Delta gef1$ , экспрессирующего *SaCLCc1* и *AtCLCd*, восстанавливался при выращивании клеток на дефицитной по  $\text{Fe}^{2+}$  среде YPEG (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% этанол и 2% глицерин как неферментируемые источники углерода) и на минимальных синтетических средах: SD (2% декстроза – ферментируемый источник углерода, 50 мМ Mes-Tris, pH 7.0) и SR (2% раффиноза – неферментируемый источник углерода, 50 мМ Mes-Tris, pH 7.0). Восстановление роста трансформантов наблюдалось также при выращивании клеток на богатой среде YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% декстроза), содержащей ионы  $\text{Mn}^{2+}$  в повышенных концентрациях. Восстановление роста мутанта  $\Delta gef1$  не наблюдалось ни на одной из сред при экспрессии в нем *SaCLCa1*.

Отсутствие комплементации мутации  $\Delta gef1$  геном *SaCLCa1* указывает на возможное участие белка *SaCLCa1* в транспорте ионов  $\text{NO}_3^-$ .

Комплементация фенотипа мутанта  $\Delta gef1$  геном *SaCLCc1* свидетельствует об участии белка *SaCLCc1* в транспорте ионов  $\text{Cl}^-$ . Восстановление переноса  $\text{Cl}^-$  приводит к нейтрализации положительных зарядов в люмене, что стимулирует работу  $\text{H}^+$ -V-АТФазы и  $\text{Cu}^{2+}$ -АТФазы эндомембран. Подкисление люмена и поступление ионов меди способствуют формированию функциональной высокоаффинной системы поглощения железа в поствезикулах аппарата Гольджи и, следовательно, восстановлению роста мутанта на Fe-дефицитных средах. Конвертирование  $\Delta\phi$  в  $\Delta\text{pH}$  и образование высокого трансмембранного  $\Delta\text{pH}$  в результате стимуляции  $\text{H}^+$ -V-АТФазы обеспечивает изолирование токсичных ионов

$Mn^{2+}$  в вакуоли и рост мутанта  $\Delta gef1$ , экспрессирующего *SaCLC1*, на средах с повышенным содержанием ионов  $Mn^{2+}$ .

Работа поддержана грантом РФФИ 16-34-00991мол\_а.

**Роль клеточной стенки в поглощении ионов меди корнями вики нарбонской  
(*Vicia narbonensis* L.).**

**Научный руководитель – Мейчик Наталия Робертовна**

***Никущин Олег Витальевич***

*Студент (магистр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра физиологии растений, Москва, Россия

*E-mail: nikushin.94@mail.ru*

Накопление и детоксикация тяжелых металлов растительными клетками - это комплексное явление. В ответ на металл-стресс растения используют разнообразные молекулярные механизмы, чтобы избежать накопления токсических концентраций тяжелых металлов ( $Me^{n+}$ ) в цитоплазме. Молекулярным механизмам защиты растений от действия  $Me^{n+}$  посвящены многочисленные исследования, однако информация об участии клеточной стенки в процессе защиты растений от влияния избыточных концентраций  $Me^{n+}$  в среде крайне ограничена. Целью настоящей работы являлось выявление роли клеточной стенки в поглощении  $Cu^{2+}$  корнями вики нарбонской (*Vicia narbonensis* L.).

Проведено сравнительное исследование поглощения ионов меди корнями интактных растений и изолированными из их корней клеточными стенками (КС) при разных концентрациях  $Cu^{2+}$  в растворе. Растения выращивали в климатической камере (25°C, освещенность - 110 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с), 14-часовой день) при постоянной аэрации растворов с концентрацией ионов  $K^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Na^+$ ,  $PO_4^{3-} \sim 0,2$  мМ. В возрасте 10-11 дней растения переносили на растворы с концентрацией  $Cu^{2+}$  10, 50 и 100 мкМ (рН 5) на 24 часа при указанных выше внешних условиях. Методом потенциометрического титрования определено, что КС корней 10 дневных растений содержат четыре типа ионогенных групп: аминогруппы, карбоксильные группы с разными значениями  $pK_a$  (полигалактуроновой и гидроксикоричных кислот) и фенольные ОН-группы. Установлено, что в расчете на сухую массу клеточной стенки преобладают карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты. В связывании ионов меди в КС принимают участие только карбоксильные группы, так как константы диссоциации двух других групп лежат за пределами исследуемой области рН. В соответствии с результатами, с увеличением концентрации  $Cu^{2+}$  в среде увеличивается способность к связыванию ионов меди как корней, так и изолированных из них КС. При всех обработках не наблюдалось изменений в сухой массе ни корней, ни надземных частей растений по сравнению с контролем, т.е. в выбранных условиях эксперимента не происходило ингибирование роста. Во всем исследованном диапазоне концентраций  $Cu^{2+}$  содержание ионов меди в изолированной КС было значительно выше по сравнению с содержанием этого металла в корне. Причиной может быть частичное осаждение меди в экспериментах с целыми растениями (рН растворов после 24 ч -  $6,5 \pm 0,3$ ,  $pH_{нач.ос.} = 5$ ) или выделение корнями органических лигандов, препятствующих поглощению  $Cu^{2+}$ .

Полученные результаты дают основание полагать, что у растений вики нарбонской, которые имеют высокое содержание пектиновых веществ, депонирование  $Cu^{2+}$  в клеточные стенки корня является важным механизмом защиты в ответ на  $Cu$ -стресс наряду с выделением органических лигандов корнями растений.

**Влияние высокотемпературных воздействий разной интенсивности на теплоустойчивость растений пшеницы и накопление в их листьях транскриптов генов *HSP70*, *BIP*, *IRE1***

**Научный руководитель – Титов Александр Федорович**

***Нилова Ирина Александровна***

*Аспирант*

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия

*E-mail: im-ira@mail.ru*

Действие на растения высоких температур может приводить к накоплению в эндоплазматическом ретикулуме и цитозоле клеток белков с нарушенной структурой. Поэтому усиление экспрессии генов, кодирующих стрессовые и некоторые регуляторные белки, является важной составляющей формирования теплоустойчивости растений. В связи с этим, целью исследования стало изучение влияния высоких температур на теплоустойчивость растений и накопление в их листьях транскриптов стрессовых генов *IRE1*, *HSP70*, *BIP*.

Исследования проводили на недельных проростках пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выращенных в камерах искусственного климата (температура воздуха 22°C, его относительная влажность 60-70%, освещенность ФАР 100 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с), фотопериод 14 ч). Затем их подвергали действию температур 33, 37 или 43°C. Продолжительность воздействия составляла от 15 мин до 3 сут. Устойчивость оценивали по температуре, вызывающей гибель 50% палисадных клеток листа (оценивали по коагуляции цитоплазмы и деструкции хлоропластов) после 5-минутного прогрева высечек листа в водном термостате при последовательном повышении температуры от 48,7°C с интервалом в 0,4°C. Для изучения экспрессии генов использовали метод ПЦР в режиме реального времени.

Теплоустойчивость проростков пшеницы при температуре 33°C повышалась через 1 сут, через 2 сут она достигала максимума и в дальнейшем не изменялась. При 37°C теплоустойчивость увеличивалась через 1 ч, затем продолжала возрастать, достигая более высокого уровня, чем при 33°C. Температура 43°C вызывала быстрый рост теплоустойчивости, а затем - её резкое снижение.

При температурах 33 и 37 и 43°C через 15 мин от начала теплового воздействия наблюдали увеличение содержания в листьях мРНК гена *HSP70*, однако через 1 ч происходило его снижение. Экспрессия генов *BIP* и *IRE1* изменялась в зависимости от интенсивности температурных воздействий. При 33°C накопление транскриптов гена *BIP* через 15 мин снижалось. При температуре 37°C содержание мРНК этого гена повышалось. Под влиянием температуры 43°C происходило многократное увеличение содержания транскриптов гена *BIP*, которое через 1 ч сменялось его резким падением. Экспрессия гена *IRE1* при 33°C снижалась. При температуре 37°C содержание транскриптов этого гена повышалось через 15 мин, достигало максимума через 1 ч, и затем снова снижалось. Действие температуры 43°C проводило к резкому снижению транскриптов гена *IRE1* в первые часы воздействия.

Полученные результаты показали, что динамика теплоустойчивости растений зависит от интенсивности высокотемпературного воздействия. При этом самый высокий уровень теплоустойчивости (при 37°C) совпадал с максимумом накопления транскриптов генов *BIP* и *IRE1*, что может свидетельствовать о вкладе белков *BIP* и *IRE1* в устойчивость растений. В отличие от этого, накопление транскриптов гена *HSP70* не зависело от интенсивности высокотемпературного воздействия. Следовательно, ответная реакция растений на действие высоких температур носит многокомпонентный характер и в ней могут участвовать разные гены, изменение экспрессии которых носит индивидуальный характер.

**Изменение гормонального статуса и содержания лектина в растениях пшеницы при действии стевиозида и низких положительных температур**

**Научный руководитель – Тимофеева Ольга Арнольдовна**

*Огороднова У.А.<sup>1</sup>, Ахметова А.М.<sup>2</sup>*

1 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия; 2 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра биоэкологии, гигиены и общественного здоровья, Казань, Россия

Необходимость применения регуляторов роста и развития растений в сельском хозяйстве неоспорима. Эти соединения должны быть эффективны, экономичны и экологически безопасны. Поэтому поиск и изучение механизмов действия таких биологически активных веществ на растения является одной из первостепенных задач физиологии растений.

Известно, что в растениях стевии синтезируется ряд гликозидов, причем синтез их общего агликона - стевиола - и гибберелловой кислоты до энт-каурена идет по одному пути. Есть данные, что обработка стевиолом карликовых мутантов растений кукурузы (чувствительных только к гиббереллинам) вызывала их рост [1].

Цель работы: изучить возможные механизмы протекторного действия гиббереллин-подобного соединения стевиозида в растениях пшеницы, подвергнутых низкотемпературному воздействию.

Объект исследования: 4-суточные проростки озимой пшеницы сорта Казанская- 560, выращенные в лабораторных условиях. Перед посадкой семена замачивали на 24 ч в растворе стевиозида в активной концентрации  $10^{-8}$  М. Контрольные растения выращивали на воде. Через 4 суток растения помещали в холодильную камеру 3°C на 3 ч.

В первой серии экспериментов изучали влияние стевиозида на содержание фитогормонов в 4-суточных проростках, подвергнутых холодному стрессу. Показано, что в нормальных условиях содержание стрессового фитогормона АБК не изменялось в вариантах со стевиозидом и контроле. На фоне стресса наблюдалось достоверное увеличение содержания АБК, причем в большей степени в варианте со стевиозидом.

Предпосевная обработка стевиозидом в течение 24 ч сходным образом меняла содержание ИУК и ЦК в 4-суточных проростках пшеницы. В контрольных условиях стевиозид увеличивал содержание ИУК и ЦК на 19% и 21% соответственно. А на фоне низкотемпературного стресса поддерживал содержание фитогормонов практически на уровне контроля (без стресса).

Во второй серии экспериментов исследовали содержание и экспрессию генов лектинов при действии стевиозида. Было обнаружено, что в нормальных условиях стевиозид несколько увеличивал содержание агглютинина зародыша пшеницы (АЗП, преобладающий лектин у данного вида) относительно контроля. На фоне стресса содержание лектина возрастало, причем стевиозид приводил к еще большему его накоплению.

Анализ относительного уровня экспрессии генов АЗП показал, что активность изучаемых генов не изменялась ни при действии низких температур, ни при действии стевиозида. Однако при совместном действии этих двух факторов наблюдали усиление экспрессии генов АЗП в 2 раза.

Таким образом, один из механизмов действия стевиозида связан с изменениями в гормональном балансе растения. Первичное повышение содержания лектина в варианте со стевиозидом и холодным стрессом не связано с синтезом *de novo*, а, по-видимому, вызвано посттрансляционными модификациями этих белков, либо их синтезом из пула запасных мРНК.



**Источники и литература**

- 1) Ruddat M. Conversion of steviol to a gibberellin-like compound by *Fusarium moniforme*  
// Arch. Biochem. Biophys. 1965. V. 111. P. 187–190.

**Изменения в содержании структурных компонентов ФС2 во время нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла у растений риса**

**Научный руководитель – Зулфугаров Исмаил Сохбатович**

***Пашаева Айнура Наги***

*Аспирант*

Национальная академия наук Азербайджана, Биология, Баку, Азербайджан

*E-mail: aynurapashayeva@gmail.com*

Свет является основным источником энергии для фотосинтезирующих организмов, он важен для роста и дифференцирования растений, однако его избыточное поглощение может привести к образованию активных форм кислорода и фотоингибированию, что может способствовать окислительному разрушению клеточных компонентов, таких как ДНК, белки, липиды, и пигменты. Одним из основных механизмов для предотвращения окислительного повреждения растений является диссипация избыточной энергии возбуждения в виде тепла, называемая нефотохимическим тушением (НФТ).

В представленном сообщении приведены результаты исследовательской работы, направленной на изучение структурных компонентов (белков, пигментов и липидов) фотосистемы II (ФС2), выделенных из диких и мутантных по PsbS белку растений риса. Сравнительный анализ компонентов ФС2 диких (WT) и мутантных (PsbS-KO) образцов риса, подвергнутых действию света высокой интенсивности, показало наличие значительных различий между фотосинтетическими аппаратами растений в «тушеном» и «нетушеном» состояниях. Сравнение фотосинтетических пигментов ФС2 диких (WT) и мутантных (PsbS-KO) образцов показало изменение в концентрации пигментов ксантофиллового цикла, выполняющих функцию защиты фотосинтетического аппарата от избытка энергии при повышенном поглощении солнечной энергии, повышение концентрации Нео, Вио, Лют в PsbS-KO мутантах и уменьшение концентрации пигментов Ант, Хлб,  $\beta$ -кар в WT. Следует отметить, что концентрация Хла осталась одинаковой для WT и PsbS-KO образцов. Сравнение четырех основных липидных классов ФС2, таких как MGDG, DGDG, PG, SQDG, составляющих основную часть мембранных липидов в хлоропластах и имеющих специфическую роль в биогенезе, поддержании тилакоидных мембран, а также в процессе фотосинтеза, показало повышение их концентрации в PsbS-KO мутантах по сравнению с дикой формой (WT). Соотношение галактолипидов MGDG/DGDG, имеющих важное значение в качестве основных структурных компонентов тилакоидной мембраны, составило 1,6 и 1,8 для WT и PsbS-KO образцов соответственно. Соотношение анионных SQDG и PG липидов же диких и мутантных форм было 1,4 и 1,2 соответственно. Тотальное соотношение липидов диких образцов к мутантным составило 1,5.

Представленные данные показывают что, несмотря на изначальную разницу в структуре ФС2 из-за мутации PsbS белка, существенные изменения в структуре ФС2 происходят в процессе образования НФТ флуоресценции хлорофилла.

**Создание трансгенных растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.),  
экспрессирующих гены *HyPer* и *Pt-GFP***

**Научный руководитель – Брилкина Анна Александровна**

***Печёрина Анна Александровна***

*Студент (бакалавр)*

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний  
Новгород, Россия

*E-mail: ihmmtatb@yandex.ru*

Изменения концентрации вторичных мессенджеров и уровня рН в растительной клетке могут определяться с помощью генетически кодируемых сенсоров. Многие из них созданы на основе GFP, свойства которого зависят от рН среды [1]. С помощью этих сенсоров возможна визуализация динамических изменений уровня рН [3], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [2] и других молекул в целом растении. Цель данной работы состоит в создании модельных растений картофеля, экспрессирующих рН-чувствительный сенсор Pt-GFP и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-чувствительный сенсор HyPer.

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) - ценная сельскохозяйственная культура и важный объект физиологии растений. Для эффективной трансформации требуется отработка наиболее продуктивных биотехнологических методик для каждого сорта.

Отбор подходящих для генетической трансформации сортов и типов экспланта проводился среди пяти сортов. Он осуществлялся путём индукции органогенеза на листовых и стеблевых эксплантах на 14 вариантах питательных сред по прописи Мурасиге и Скуга с различными концентрациями фитогормонов. Выявлено, что наиболее успешно органогенез проходил на стеблевых эксплантах картофеля сортов Невский и Ирбитский на среде Мурасиге-Скуга с 6-БАП (3 мг/л) и ИУК (0,5 мг/л) (среда ЗВ/0,5I).

Далее проверялась устойчивость картофеля к цефотаксиму - антибиотику, к которому чувствительны агробактерии. Для этого использовались сорта Невский и Ирбитский, стеблевой тип эксплантов и среда ЗВ/0,5I. Было выяснено, что на среде с цефотаксимом с концентрацией выше 200 мкг/л агробактерии погибали. При этом концентрации 300 мкг/л и 600 мкг/л оказались наиболее эффективными для прохождения органогенеза на эксплантах для сортов Ирбитский и Невский.

Подобранные сорта, тип экспланта, состав среды и концентрация цефатоксима в дальнейшем использовались для агробактериальной трансформации картофеля генами Pt-GFP и HyPer. Для этого были использованы агробактерии штамма AGL0, несущие плазмиды pART27 с геном Pt-GFP (NanoLight® Technologies, США) или с геном HyPer (Евроген, Россия) под контролем промотора CaMV 35S. Для первичного отбора регенерантов использовалась селективная питательная среда с добавлением канамицина (100 мкг/л), ген устойчивости к которому находится также под контролем промотора CaMV 35S.

Генетическая трансформация картофеля проводилась путем кокультивирования эксплантов с агробактериями на среде ЗВ/0,5I в темноте два дня. Затем экспланты пересаживали на питательную среду ЗВ/0,5I с цефотаксимом и канамицином и через четыре недели снова на эту же среду и культивировали до появления регенерантов.

#### **Источники и литература**

- 1) Зубова Н.Н., Булавина А.Ю., Савицкий А.П. Спектральные и физико-химические свойства зелёного (GFP) и красного (dGFP583) флуоресцирующих белков // Успехи биологической химии. 2003. Т. 43. С. 163-224.

- 2) Bilan D.S., Belousov V.V. HyPer Family Probs: State of the Art // Antioxydants and Redox signaling. 2016. Vol. 24, No 13. P. 731-751.
- 3) Schulte A., Lorenzen I., Böttcher M., Plieth C. A novel fluorescent pH probe for expression in plants // Plant Methods. 2006. Vol. 2, No. 7. P. 1-13.

## Эффект экзогенных АФК и антиоксидантов на ионный гомеостаз пыльцевых трубок лилии

Научный руководитель – Брейгина Мария Александровна

*Подольян Александра Олеговна*

*Студент (бакалавр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра физиологии растений, Москва, Россия

*E-mail: aleksaniaara@gmail.com*

Активные формы кислорода в растительной клетке образуются в значительных количествах как побочный продукт в реакциях энергетического и пластического обмена, а также синтезируются специальными ферментными системами, в том числе, на плазматической мембране. В настоящее время активные формы кислорода рассматриваются в первую очередь не как токсичные метаболиты, а как сигнальные молекулы, играющие важную роль в различных физиологических программах. Пероксид водорода является наиболее стабильной АФК, кроме того, была доказана способность апопластного  $H_2O_2$  проникать в цитоплазму, и тем самым осуществлять передачу сигнала между клетками.

Ряд исследований показал, что пероксид водорода может принимать активное участие в оплодотворении у цветковых растений. Он накапливается в рыльце пестика, и, благодаря наличию в пыльцевых трубках белков-мишеней, может обеспечивать передачу сигнала от женского спорофита. В работах нашей лаборатории на протопластах из пыльцевых зерен электрофизиологическими методами были обнаружены ключевые мишени для  $H_2O_2$ , которыми оказались ионные каналы и, возможно, другие ион-транспортные системы. На данном этапе работы важно было увидеть, как на пероксид водорода реагируют интактные растущие трубки, которые, в отличие от протопластов, характеризуются наличием градиентов различных ионов по длине трубки, что типично для объекта, обладающего полярным ростом.

Было изучено влияние нетоксичных концентраций  $H_2O_2$  и антиоксиданта Mn-TMPP (вещества порфириновой природы, тушителя  $H_2O_2$  и супероксид-аниона) на уровень цитоплазматического  $Ca^{2+}$ , градиент pH и мембранного потенциала пыльцевых трубок лилии. Было установлено, что в контрольных трубках апикальная зона деполяризована относительно дистальной части. Нетоксичность использованных концентраций была проверена с помощью стандартного FDA-теста (жизнеспособность). Выяснено, что концентрация пероксида 1 мМ и ниже, а также концентрация Mn-TMPP 200 мкМ и ниже не влияет на жизнеспособность пыльцевых трубок.

Методами количественной флуоресцентной микроскопии мы обнаружили, что пероксид водорода в концентрации 1 мМ вызывает:

- значительное повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  (причем преимущественно в зоне апикального градиента);
- гиперполяризацию мембраны по длине трубки (форма градиента не изменяется);
- изменение формы градиента pH (закисление субапикальной области при неизменном pH в основной части трубки).

Антиоксидант Mn-TMPP изменяет форму градиента мембранного потенциала, влияет и на другие изученные показатели.

Тем самым показана возможность модуляции ключевых элементов ионного гомеостаза растущих пыльцевых трубок за счет небольших изменений содержания АФК в среде роста при сохранении их жизнеспособности.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (18-34-00979 мол-а).

**Источники и литература**

- 1) Miller E.W., Dickinson B.C., Chang C.J. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010. V. 107. № 36. P. 15681–15686.
- 2) McInnis S.M., Desikan R., Hancock J.T., Hiscock S.J. Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk? // New Phytol. 2006. V. 172. № 2. P. 221–228.

**Исследование ауксин-чувствительности генов АЦК-синтаз в корне  
*Arabidopsis thaliana* L.**

**Научный руководитель – Землянская Елена Васильевна**

**Убогоева Елена Вячеславовна**

*Студент (бакалавр)*

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,  
Новосибирск, Россия

*E-mail: ubogoeva@gmail.com*

Ауксин и этилен являются важнейшими регуляторами процессов роста и развития корня растений. Линейные пути передачи гормональных сигналов хорошо изучены, но в реализации физиологических ответов существенную роль играет взаимодействие этих фитогормонов. Известно, что ауксин индуцирует биосинтез этилена. Одним из механизмов такой индукции является ауксин-зависимая активация экспрессии генов АЦК-синтаз (*ACS*), катализирующих скорость-лимитирующую стадию биосинтеза этилена. Однако молекулярные механизмы этого процесса остаются неизвестными. Цель работы: системное исследование чувствительности генов АЦК-синтаз к ауксину (индол-3-уксусной кислоте, ИУК) различной концентрации и времени обработки.

С использованием метода количественной ОТ-ПЦР показана ауксин-чувствительность 6 из 8 генов АЦК-синтаз (*ACS5,6,7,8,9,11*). Из них *ACS6,8,9,11* активируются ауксином (ауксин-чувствительность гена *ACS9* показана впервые), в то время как экспрессия генов *ACS5* и *ACS7* подавляется этим гормоном (снижение экспрессии показано впервые). Уровень транскрипции всех ауксин-чувствительных генов изменялся уже через 1 час обработки ауксином (в концентрации 1 мкМ). Дальнейшая обработка (до 3 часов), как правило, приводила к снижению амплитуды ответа. Результаты анализа собственных данных секвенирования ауксин-индуцированных транскриптомов, а также публично доступных данных микрочип-экспериментов хорошо согласуются с полученными нами результатами. Дальнейший анализ ауксин-чувствительности генов АЦК-синтаз выявил различие профилей их экспрессии в зависимости от концентрации ИУК (в диапазоне от 0,01 до 20 мкМ). Например, транскрипционный ответ гена *ACS7* наблюдался только при концентрации ауксина 1 мкМ. Гены *ACS9*, *ACS11* отвечали на ауксин в более широком диапазоне концентраций, при сохранении максимального изменения уровня экспрессии в ответ на обработку 1 мкМ ИУК. Амплитуда ответа гена *ACS6* практически не менялась при разной концентрации ауксина.

С целью выявления возможных механизмов ауксин-зависимой регуляции транскрипции генов *ACS* был осуществлен поиск потенциальных сайтов связывания транскрипционных факторов (ССТФ) в промоторах этих генов с помощью позиционных весовых матриц, а также с привлечением данных DAP-seq, ChIP-seq. В результате были предсказаны ССТФ для целого ряда транскрипционных факторов, часть которых являлась ауксин-чувствительными. В промоторах некоторых генов *ACS* предсказаны сайты связывания транскрипционных факторов ARF - основных регуляторов первичного ответа на ауксин.

Таким образом, можно заключить, что модуляция биосинтеза этилена под воздействием ауксина осуществляется путем изменения профиля экспрессии генов синтеза этилена в зависимости от концентрации ауксина. Регуляция некоторых генов *ACS* может осуществляться первичными регуляторами транскрипционного ответа на ауксин, тогда как остальные гены, вероятно, регулируются ауксином опосредованно. На основании полученных данных предложена схема ауксин-зависимой регуляции биосинтеза этилена.

## Идентификация биологически активных пептидов в клетках мха *Physcomitrella patens*

Научный руководитель – Фесенко Игорь Александрович

Филиппова А.А.<sup>1</sup>, Князев А.Н.<sup>2</sup>, Мамаева А.С.<sup>3</sup>, Хазигалева Р.А.<sup>4</sup>, Ляпина И.С.<sup>2</sup>

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоорганической химии, Москва, Россия; 2 - Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева, Агронии и биотехнологии, Генетики и биотехнологии, Москва, Россия; 3 - Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия; 4 - Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Растительные биоактивные пептиды представляют класс низкомолекулярных соединений, которые играют важную роль во множестве биологических процессов от роста и развития до ответа на биотический и абиотический стрессы [1,2]. Большинство из изученных пептидов генерируется путем деградации неактивных белков-предшественников с помощью селективного действия пептидаз [3]. Однако, современные подходы масс-спектрометрии и биоинформатического анализа позволили обнаружить новый источник биоактивных пептидов, которые могут образовываться путем протеолитической деградации функционально-активных белков или же кодируются короткими открытыми рамками считывания [4]. Тем не менее, до сих пор неясно, являются ли данные пептиды побочными продуктами функциональных белков или обладают определенной биологической функцией. Данные пептиды являются “темной материей” пептидома клеток и представляют большой интерес для дальнейших исследований ответа растений на биотический и абиотический стрессы.

С помощью масс-спектрометрического анализа нами были исследованы пулы эндогенных пептидов, образованных из функциональных белков-предшественников в клетке и секрете модельного объекта мха *Physcomitrella patens*. Данный подход позволил идентифицировать 3000 эндогенных пептидов в клетках и 1000 в секрете мха. Также были проанализированы пулы нативных пептидов, выделенных из клеток и секрета, до и после обработок фитогормонами - 400 мкМ метилжасмонатом и 400 мкМ салициловой кислотой. Наши результаты указывают на то, что эти стрессовые гормоны усиливают деградацию белков и приводят к формированию нового пула биоактивных пептидов, которые обладают широким спектром возможных биологических функций. Мы предполагаем, что данные эндогенные пептиды участвуют в сигналинге гормонов и выполняют защитные функции в ответе на стрессовые условия. С помощью *in silico* и *in vivo* анализа идентифицированных фрагментов пептидов из функциональных белков при обработке метилжасмонатом мы обнаружили антимикробную активность у нескольких пептидов. Можно сделать вывод, что деградация функциональных белков играет важную роль в защитных механизмах у растений путем генерации нового источника антимикробных пептидов. Таким образом, пептиды, образованные из функциональных белков-предшественников, не представляют так называемый «клеточный шум», а играют важную роль в растительном ответе на биотический и абиотический стрессы.

### Источники и литература

- 1) Czyzewicz, N., Yue, K., Beeckman, T., De Smet, I. Message in a bottle: small signalling peptide outputs during growth and development // J Exp Bot. 2013. V. 64, № 17. P. 5281–5296



- 2) Albert, M. Peptides as triggers of plant defence // J Exp Bot. 2013. V. 64, № 17. P. 5269-5279
- 3) De Coninck, B., De Smet, I. Plant peptides - Taking them to the next level // J Exp Bot. 2016. V. 67, № 16. P. 4791–4795
- 4) Fesenko, I. A., et al. Specific pools of endogenous peptides are present in gametophore, protonema, and protoplast cells of the moss *Physcomitrella patens* // BMC Plant Biol. 2015. V. 15, № 1. P. 87

**Стрессовые низкомолекулярные белки тилакоидных мембран цианобактерий****Научный руководитель – Юрина Надежда Петровна****Шарапова Любовь Сергеевна**

Аспирант

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»

РАН», Москва, Россия

E-mail: lubasha1707@mail.ru

Избыточное освещение негативно влияет на фотосинтетический аппарат. Световой стресс приводит к образованию активных форм кислорода и изменению экспрессии целого ряда генов. Существуют различные механизмы, позволяющие снизить повреждающее действие избыточного освещения, одним из которых является синтез светоиндуцируемых низкомолекулярных белков тилакоидов, содержащих одну трансмембранную спираль (One-helix protein; ОНР). Данные белки содержат все изученные кислородные фототрофы. У цианобактерий, считающихся эволюционными предшественниками хлоропластов, они называются Hlips (high light-inducible proteins) или SCP (small Cab-like proteins). Считается, что Hlips участвуют в регуляции биосинтеза хлорофилла, утилизации синглетного кислорода [2] и других важных процессах. Однако, роль Hlips в клетке на сегодняшний день исследована недостаточно. Для выяснения функций Hlips, необходимо установить их локализацию в мембранах тилакоидов. В качестве объекта исследований были выбраны два вида цианобактерий - *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Arthrospira platensis*. Ранее было показано различие спектральных характеристик хлорофилл-белковых комплексов тримеров и мономеров фотосистемы 1 (ФС1) этих цианобактерий [1], в связи с чем их сравнение представляет интерес. Пигмент-белковые и белковые комплексы тилакоидных мембран фракционировали с помощью нативного неокрашенного электрофореза в ПААГ (Clear Native PAGE). На электрофореграмме, полученной в результате фракционирования лизата тилакоидных мембран *Synechocystis* sp., выявлен ряд комплексов: тримеры и мономеры комплекса ФС1, димеры и мономеры комплекса ФС2, цитохромный комплекс, АТФ-азный комплекс, комплекс NAD(P)H-хинон-оксидоредуктазы, а также зона свободных белков. Белки Hlips были идентифицированы с помощью иммуоблоттинга. Масс-спектрометрический анализ показал, что Hlips ассоциированы с тримерами ФС1, комплексами ФС2 и мономерами ФС1. Кроме того, они были обнаружены в зоне свободных белков. Сравнение электрофореграмм, полученных с помощью CN-PAGE, выявило сходное распределение хлорофилл-белковых комплексов ФС1 и ФС2 *Synechocystis* sp. и *Arthrospira platensis*. Проводится изучение ассоциации Hlips белков с хлорофилл-белковыми комплексами *Arthrospira platensis*.

Работа подготовлена при поддержке программы президиума РАН № 18 «Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии» и гранта РФФИ № 16-04-01626А.

**Источники и литература**

- 1) Карапетян Н.В., Большевцева Ю.В., Юрина Н.П., Терехова И.В., Шубин В.В. Длинноволновые хлорофиллы фотосистемы 1 цианобактерий: происхождение, локализация и функции // Биохимия. 2014. Т. 79. С. 283-292.
- 2) Sinha R.K., Komenda J., Knoppova J., Sedlarova M., Pospisil P. Small CAB-like proteins prevent formation of singlet oxygen in the damaged photosystem II complex of the

cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Plant Cell Environ.* 2012. V. 35. P.806 – 818.

## **Аноксия и окислительный стресс как факторы повреждений липидов и белков растений**

**Научный руководитель – Емельянов Владислав Владимирович**

***Шиков Антон Евгеньевич***

*Студент (бакалавр)*

Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет,

Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: shik-999@inbox.ru*

Аноксия (отсутствие кислорода) возникает в природе в результате разнообразных неблагоприятных воздействий (наводнение, оледенение, образование корки снега). В ходе аноксии в растениях накапливаются промежуточные продукты обмена, из-за чего по возвращении их в условия нормальной аэрации провоцируются окислительные повреждения макромолекул, главным образом, липидов [1] и белков [2]. Повреждения белков, главным образом, проявляются в форме карбонилирования - необратимого окисления боковых радикалов аминокислотных остатков (лизина, пролина, треонина и аргинина), что является маркером последующей протеолитической деградации белков. Совместно с повреждениями клеточных мембран это зачастую провоцирует апоптоз. Весь этот процесс называется окислительным стрессом, который может вызвать потери ценных сельскохозяйственных культур. Важно отметить, что растения, устойчивые к окислительному стрессу, оказываются более устойчивыми ко многим стрессовым факторам [3].

В качестве объектов исследования были выбраны проростки риса (*Oryza sativa*) и пшеницы (*Triticum aestivum*). Были проведены опыты с аноксией и последующей реаэрацией, а также с использованием окислительных агентов (метилвиологен, менадион, перекись водорода). Карбонилирование белков проверяли на спектрофотометре по реакции с динитрофенилгидразином. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по изменению содержания малонового диальдегида (МДА).

Зафиксировано, что аноксия вызывает снижение ПОЛ, тем не менее, последующая реоксигенация провоцировала интенсификацию этого процесса в обоих растениях. При этом степень ПОЛ у пшеницы была выше, чем у риса. Пикового значения уровень МДА у пшеницы достигал при длительных сроках реаэрации (24 ч).

Карбонилирование белков в проростках риса усиливалось в ходе реаэрации, тем не менее, к 24 ч реаэрации степень карбонилирования возвращалась к значениям контроля. У пшеницы степень карбонилирования неуклонно повышалась по ходу реаэрации, особенно в корнях.

Таким образом, накопление продуктов окислительного повреждения липидов и белков в проростках пшеницы происходило достаточно интенсивно, что демонстрирует её неустойчивость к окислительному стрессу. При этом рис достаточно эффективно справлялся с детоксикацией окисленных белков и липидов, оказываясь существенно более устойчивым к аноксии и последующей реаэрации.

Опыты с использованием окислительных агентов были проведены на пшенице. Интересно отметить, что окислительный стресс, вызванный постаноксической реаэрацией, оказал более интенсивное воздействие на ПОЛ в сравнении с метилвиологеном, менадионом и перекисью водорода. Тем не менее, степень карбонилирования белков во всех описанных условиях повышалась одинаково.

Исследования поддержаны РФФИ 18-04-00157.

**Источники и литература**

- 1) Чиркова Т.В., Блохина О.Б. Влияние аноксии на уровень эндогенного перекисного окисления липидов в корнях растений, различающихся по устойчивости к недостатку кислорода // Вестник Ленингр. ун-та. Сер. 3. 1991. №4(24). С. 85-90.
- 2) Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2007. V. 58. P. 459-481.
- 3) Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review // Ann. Bot. 2003. V. 48, No. 91 P. 179-194.

**Фитохромная регуляция стресс-устойчивости фотосинтетического аппарата высших растений****Научный руководитель – Креславский Владимир Данилович***Шмарев А.Н.<sup>1</sup>, Худякова А.Ю.<sup>1</sup>*

1 - Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Россия

Известен ряд механизмов адаптации фотосинтетического аппарата (ФА) к развитию окислительного стресса. К ним относятся сдвиг баланса оксидантов - антиоксидантов, увеличение скорости восстановления фотохимической активности фотосистемы 2 (ФС2). Ранее мы предположили, что в регуляции некоторых из этих механизмов адаптации ФА к стрессовым факторам может участвовать фитохромная система. С использованием мутанта *Arabidopsis thaliana* с дефицитом фитохрома В (ФхВ) *hy3* было обнаружено, что дефицит ФхВ приводит к снижению устойчивости ФС2 к УФ-А радиации. Однако, часто в фотоморфогенетических процессах, которые регулируются фитохромом, участвует и другой ключевой фитохром - фитохром А (ФхА). Поэтому было проведено детальное исследование влияния УФ-В радиации на фотосинтетические процессы в растениях арабидопсиса дефицитных одновременно по ФхА и ФхВ (двойной мутант, ДМ) по сравнению с растениями дикого типа (ДТ) и мутантом *hy3*. Растения выращивали в контролируемых условиях под светом белых люминесцентных ламп или красных светодиодов при интенсивности света 130 мкмоль квантов м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> с фотопериодом 12 ч или 16 ч. Растения кратковременно (0.5-2 ч) облучали УФ-В, используя различные дозы (2-7 кДж м<sup>-2</sup>). Для оценки состояния ФА растений измеряли флуоресценцию хлорофилла а, отражающую активность ФС2, с помощью РАМ-флуориметрии и JIP-теста. Дефицит фитохромов приводил к снижению содержания фотосинтетических пигментов и УФ-поглощающих пигментов (УФПП), к снижению скорости фотосинтеза (Pn) (определяемой по поглощению CO<sub>2</sub>/м<sup>2</sup>с) при насыщающей интенсивности света, при этом активность ФС2 не изменялась. Содержание каротиноидов и хлорофиллов *a* и *b* у 25-дн. растений ДМ было на 20-25% ниже, скорость фотосинтеза была ниже на 32%, а количество УФПП в 3.5 раза меньше, чем у ДТ. Выращивание растений на красном свете (максимум 660 нм), когда криптохромы не активны, приводило к заметному снижению активности ФС2 у ДМ по сравнению с ДТ. Разница между ДТ и мутантом *hy3* была менее выражена. Было показано, что максимальный и эффективный квантовые выходы ФС2 при действии УФ-В снижались сильнее у ДМ по сравнению с ДТ. Количество Q<sub>B</sub>-невосстанавливающих комплексов в реакционном центре ФС2 и эффективность диссипации поглощенной энергии света в тепло были выше у ДМ, чем у ДТ. Устойчивость ФС2 к УФ-В облучению ниже у ДМ по сравнению с растениями ДТ, выращенными как на белом или красном свете. Обнаружена особенно заметная разница в снижении скорости фотосинтеза и показателей фотохимической активности ФС2 в результате действия УФ-В у растений ДТ и ДМ, выращенных на красном свете, когда не активна криптохромная система. Пониженная устойчивость ДМ согласуется с пониженной активностью общего пула пероксидаз и сниженным биосинтезом каротиноидов и УФПП в листьях растений облученных УФ-В. Сделано заключение, что устойчивость ФА к УФ-В и свету высокой интенсивности в значительной степени зависит как от наличия ключевых у растений фитохромов А и В, так и фоторецепторов синего света криптохромов. Предполагается, что пониженная устойчивость ДМ к УФ-В и фотоингибированию по сравнению с ДТ является следствием пониженного содержания у мутанта УФПП и каротиноидов, а также пониженной активности ряда антиоксидантных ферментов, таких как аскорбатпероксидаза.