

**Влияние источников углерода на запасание липидов у зеленой  
микроводоросли *Coelastrella* sp. IPPAS H-626**

**Научный руководитель – Аллахвердиев Сулейман Ифхан оглы**

***Заднепровская Елена Вадимовна***

*Аспирант*

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

*E-mail: light.midnight1994@gmail.com*

Одноклеточные зеленые водоросли (микроводоросли) на протяжении многих лет культивируются в целях получения ценных биологических соединений: каротиноидов, белков, крахмала, целлюлозы, жирных кислот и т.д. Особенно интересны в этом плане липиды, которые могут быть использованы для создания биотоплива третьего поколения, а также в качестве медицинских препаратов и косметических средств [2]. В связи с этим исследование микроводорослей, синтезирующих липиды, и поиск наиболее продуктивных штаммов - основная задача в изучении одноклеточных водорослей.

Цель исследования - изучение влияния различных органических источников углерода на накопление липидов клетками зеленой микроводоросли *Coelastrella* sp. IPPAS H-626 в различных условиях культивирования. Объектом изучения является зеленая микроводоросль *Coelastrella* sp. Chod. штамм IPPAS H-626 (коллекция IPPAS ИФР РАН им. К.А. Тимирязева, Москва).

Культивирование микроводорослей проводилось в течение 18 суток на агаризованных средах BG-11 и BG-11-N [3] при 27°C в камере роста MLR-352-PE (Panasonic, Осака, Япония) в условиях автотрофного (30 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>) и гетеротрофного питания. В качестве источника углерода использовали растворы глюкозы (0,1%), маннозы (0,1%), галактозы (0,1%) и ацетата калия (0,01 М). Наличие липидов в клетках определяли с помощью флуоресцентной микроскопии (Axio Imager Z2; Carl Zeiss, Germany); клетки окрашивали в течение 30 минут, выдерживая в темноте, флуорофором Bodipy 505/515 (Thermo Fisher Scientific, USA) с конечной концентрацией 5 мкг/мл [1].

На первом этапе исследования были изучены качественные ростовые показатели данного штамма водоросли. В условиях автотрофного питания культура *Coelastrella* sp. H-626 показала положительный прирост во всех условиях выращивания. Наиболее крупные колонии водоросли были отмечены в образцах с добавлением маннозы и глюкозы. В условиях отсутствия света наилучший результат также показали культуры, выращенные на среде с добавлением маннозы, глюкозы и, несколько хуже, на ацетате калия.

При анализе с помощью флуоресцентной микроскопии установлено наличие липидных тел в образцах, культивируемых в автотрофных условиях с наличием азота в среде; менее активное накопление липидов отмечено в условиях освещенности при азотном голодании.

Следует отметить, что в гетеротрофных условиях в присутствии азота, и при азотном голодании клетки в той или иной степени активно накапливают крахмал (клетки окрашивали 10% раствором люголя), липиды практически не наблюдаются.

#### **Источники и литература**

- 1) Сайфитдинова А.Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. Учебно-методическое пособие. – 2-е изд., испр. и доп. СПб., 2011.
- 2) Hu C.W., Chuang L.T., Yu P.C., Chen C.N. Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrella* sp. F50 // Food Chemistry. 2013. Vol. 138(4). p. 2071–2078.

- 3) Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel, M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). // *Bacteriol. Rev.* 1971, 35. p. 171–205.

**Влияние асимметричного освещения на ауксин-зависимую инициацию боковых корней *Arabidopsis thaliana***

**Научный руководитель – Бибикова Татьяна Николаевна**

***Котик Анастасия Алексеевна***

*Студент (бакалавр)*

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

*E-mail: nktow@ya.ru*

Предметом изучения в нашей работе была ауксин-зависимая инициация боковых корней *Arabidopsis thaliana*. Мы показали, что при асимметричном освещении главного корня боковые корни (БК) преимущественно иницируются на затененной стороне.

Чтобы оценить этап развития, на котором формируется асимметрия, мы подвергли асимметричному освещению растения *A. thaliana*, выращенные при симметричном освещении. Мы не наблюдали асимметрии взрослых БК в зоне сформированных при симметричном освещении клеток-основательниц и ранних примордиев. Мы выдвинули гипотезу, что светозависимая асимметрия формируется во время инициации БК или ранее. Мы также исследовали растения, содержащие флуоресцентную метку pSKP2b<sub>0.5</sub>Kb:ER-ZmCherry, экспрессирующуюся в клетках-основательницах и ранних примордиях и обнаружили, что характер их распределения относительно источника света соответствует таковому у взрослых БК, что подтвердило нашу гипотезу.

Ауксин может транспортироваться в корень из побега либо синтезироваться непосредственно клетками апекса корня. Известно, что «корневой» ауксин участвует в формировании новых примордиев, а «побеговый» - влияет на их дальнейший рост и развитие [1]. Таким образом, в соответствии с нашей гипотезой, нарушение транспорта ауксина из побега не должно влиять на светозависимую асимметрию инициации БК, в то время как дефектный синтез ауксина в корне должен приводить к нарушению этой асимметрии. Мы изучили растения с мутациями в генах транспорта «побегового» ауксина (PIN3, LAX3) и обнаружили, что потеря функций соответствующих генов не повлияла на способность БК иницироваться в сторону от источника света. Нарушение полярного транспорта ауксина также не отразилось на характере распределения БК. Напротив, у растений, мутантных по гену аминотрансферазы, участвующей в синтезе 3-ИУК в корне (WEI8), БК располагались равномерно на освещенной и затемнённой сторонах главного корня.

Далее мы исследовали основные факторы ауксинового сигналинга, участвующие в ранних процессах инициации. Асимметрия БК ожидаемо исчезла у мутантов по факторам ауксинового ответа (ARF7, ARF19), экспрессирующихся на всех этапах формирования БК до первого деления клеток-основательниц. Мы также наблюдали исчезновение асимметрии у мутанта по транскрипционному фактору GATA23, участвующему в самых ранних процессах закладки БК: разметке клеток перицикла и формировании клеток-основательниц [2]. Последнее наблюдение позволяет сдвинуть временные рамки формирования светозависимой асимметрии в сторону более ранних этапов инициации БК.

Таким образом, нам удалось показать, что асимметричное освещение влияет на ранние процессы формирования боковых корней, определяя характер их расположения.

**Источники и литература**

- 1) Bhalerao R. P. et al. Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings //The Plant Journal. – 2002. – Т. 29. – №. 3. – С. 325-332.

- 2) Du Y., Scheres B. Lateral root formation and the multiple roles of auxin //Journal of Experimental Botany. – 2018. – Т. 69. – №. 2. – С. 155-167.

## Цитофизиологические особенности суспензионных культур клеток *Dioscorea deltoidea* Wall.

Научный руководитель – Титова Мария Владимировна

*Лунькова Мария Константиновна*

*Студент (бакалавр)*

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

*E-mail: Maria393Lunkova@gmail.com*

*Dioscorea deltoidea* Wall произрастает в горных районах Азии и активно используется в местной традиционной медицине. В качестве альтернативы природному растительному сырью, в ИФР РАН был получен ряд штаммов культур клеток *D. deltoidea*, синтезирующих характерные для данного вида фураностаноловые гликозиды - биологически активные вещества с широким спектром действия [1]. Исследуемые в данной работе линии культуры клеток *D. deltoidea* были получены путём обработки исходного штамма ИФР Д1 химическим мутагеном N-нитрозо-N-метилмочевинной. Однако для линии ДМ-05к обработка была одинарной, а для ДМ-03 - двойной. Целью нашего исследования было сравнить линии ДМ-03 и ДМ-05к суспензионной культуры клеток *D. deltoidea* по цитологическим и физиологическим характеристикам.

В ходе исследования проводили определение ростовых характеристик и динамики роста по стандартным биотехнологическим методам. Клетки, находящиеся в S-фазе митотического цикла, выявляли с использованием клик-реакции 5-этинил-2'-дезоксигуанидина с азидами флюорохромов. Анализ дыхательной активности проводили полярографическим методом. Активность антиоксидантных ферментов измеряли спектрофотометрическими методами. Количественный анализ фураностаноловых гликозидов осуществили с помощью УЭЖХ ЭР МС.

Показано, что суспензионная культура клеток ДМ-05к обладала более высокими ростовыми характеристиками по сравнению с линией ДМ-03 (рис. 1). Для линии ДМ-03 были выявлены более низкие доли S-фазных клеток в начале ростового цикла (4,0%) по сравнению с ДМ-05к (6,0%), что, возможно, говорит о меньшей интенсивности пролиферации. Начиная с экспоненциальной фазы в суспензии линии ДМ-05к доля клеток с диаметром более 33 мкм была в 2 раза больше по сравнению с ДМ-03, а доля мелких (менее 20 мкм) - в 4 раза меньше. В популяции линии ДМ-03 наблюдали около 5% удлинённых изогнутых клеток. По степени агрегированности клеток обе линии являются относительно мелкоагрегированными.

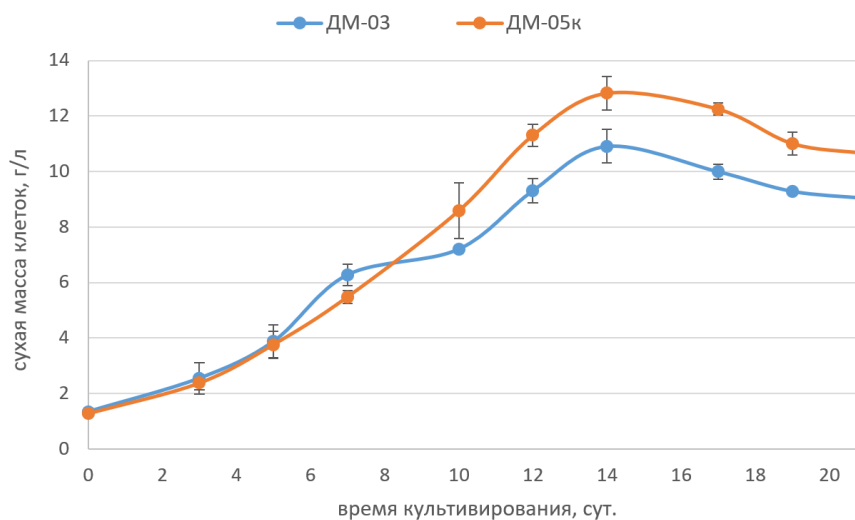
Значения скорости общего дыхания для двух линий диоскорееи практически не отличались. Однако, начиная с экспоненциальной фазы роста доля альтернативного дыхания для линии ДМ-03 была в 2 раза больше, чем для ДМ-05к (рис. 2). Первичный скрининг активности антиоксидантных ферментов (аскорбатпероксидазы, каталазы и супероксиддисмутазы) показал, что для ДМ-03 их активность в целом выше. Линия ДМ-03 также отличается от ДМ-05к в 10 раз большей долей S-форм, в 2 раза меньшим содержанием дельтозида и на 28% большим суммарным содержанием фураностаноловых гликозидов на 14 сутки.

Таким образом, для линий ДМ-03 и ДМ-05к суспензионной культуры клеток *D. deltoidea* были выявлены различия по цитофизиологическим характеристикам. Полученные данные будут использованы в дальнейшем для подбора оптимальных условий аппаратного выращивания.

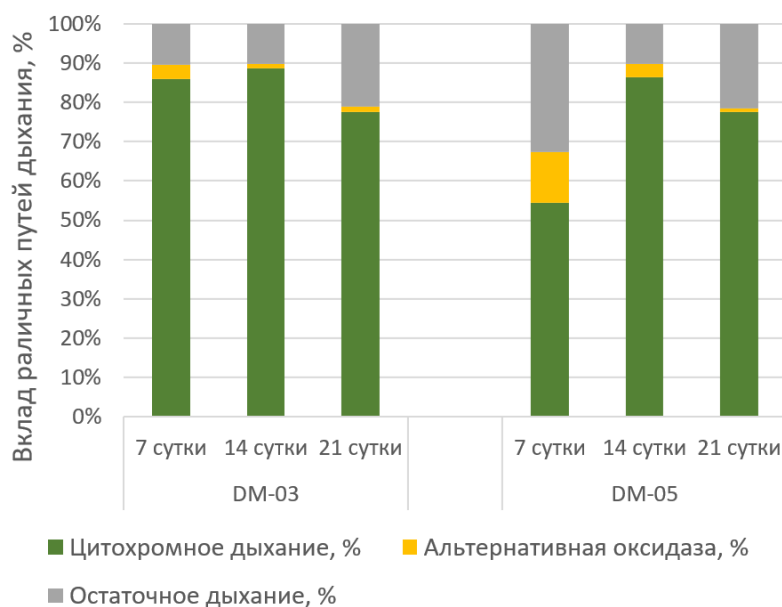
## Источники и литература

- 1) Titova M. V. et al. Suspension cell culture of *Dioscorea deltoidea* – A renewable source of biomass and furostanol glycosides for food and pharmaceutical industry //Agronomy. 2021. Т. 11. №. 2. С. 394.

## Иллюстрации



**Рис. 1.** Динамика роста по сухой биомассе линий ДМ-03 и ДМ-05 суспензионной культуры клеток *D. deltoidea*.



**Рис. 2.** Вклад различных путей дыхания (в % от общей интенсивности) в общее поглощение кислорода клетками линий ДМ-03 и ДМ-05 суспензионной культуры клеток *D. deltoidea*.

## Роль фитохромов в регуляции инициации боковых корней *Arabidopsis thaliana*

Научный руководитель – Бибикова Татьяна Николаевна

*Мамедова Джаммиля Фархадовна*

*Студент (магистр)*

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

*E-mail: centaureacyanus26@gmail.com*

Свет является одним из важнейших регуляторов программы развития растения. Известно, что он влияет на морфогенез корневой системы, в частности, на инициацию боковых корней [1].

В нашей работе показано, что при освещении с одной стороны главного корня *Arabidopsis thaliana*, растущего вдоль препятствия, боковые корни преимущественно формируются на стороне, противоположной источнику освещения, то есть наблюдается асимметричное распределение боковых корней относительно оси главного корня. При освещении растущего вдоль препятствия главного корня с обеих сторон асимметрии не наблюдается, что подтверждает существование ответной реакции корня на градиентное освещение в виде асимметричного формирования боковых корней.

Чтобы выяснить, какой фоторецептор может принимать участие в данном феномене, мы вырастили растения дикого типа под красным светом. При этом также наблюдалось образование боковых корней преимущественно на стороне, противоположной источнику освещения, что свидетельствует об участии в этом явлении фитохромов - единственных рецепторов красного света у *Arabidopsis thaliana*. Анализ двойного мутанта по основным фитохромам арабидопсис *phyAphyB* показал отсутствие асимметрии боковых корней, в то время как у одиночных мутантов *phyA* и *phyB* она сохранялась, из чего следует, что в данном ответе эти фоторецепторы взаимозаменяемы.

Из литературных источников известно, что при освещении побега восприятие дальнего красного света фитохромами стимулирует экспрессию транскрипционного фактора-регулятора фотоморфогенеза HY5, который затем транспортируется в корень и влияет на инициацию боковых корней [2]. Мутант *hy5* по гену этого трансфактора не продемонстрировал асимметричное распределение боковых корней в наших опытах с односторонним освещением главного корня.

Чтобы выяснить, где именно происходит рецепция света, определяющая асимметричное распределение боковых корней, мы провели эксперименты с затенением побега и корня. Они показали, что при освещении корня с затенением побега феномен не исчезает, и напротив, при освещении побега с затенением корня асимметрии не наблюдается, что указывает на участие рецепции света фитохромами непосредственно в корне. Таким образом, в показанном нами феномене трансфактор HY5 активируется фитохромами в самом корне.

### Источники и литература

- 1) Lee, H. J. et al. Stem-piped light activates phytochrome B to trigger light responses in *arabidopsis thaliana* roots // Science Signaling. — 2016. — Т. 9. — №.452. — С. 1–9.
- 2) Chen, X. et al. Shoot-to-Root Mobile Transcription Factor HY5 Coordinates Plant Carbon and Nitrogen Acquisition // Current Biology. — 2016. — Т. 26. — №.5. — С. 640–646.

**Влияние биологически активных веществ на размножение рябины (*Sorbus L.*)  
in vitro**

**Научный руководитель – Высоцкая Ольга Николаевна**

**Панченко Дарья Дмитриевна**

*Студент (бакалавр)*

Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева,  
Агрономии и биотехнологии, Генетики и биотехнологии, Москва, Россия

*E-mail: pan4da@yandex.ru*

Род *Sorbus L.* насчитывает более 100 видов деревьев и кустарников, которые произрастают в умеренной зоне Северного полушария. К сожалению, у растений рябины отмечается довольно слабая регенерационная способность, причем для каждого вида, сорта и клона она различна, поэтому вопрос сохранения генотипов видов и уникальных сортов очень актуален [1]. Наиболее перспективным способом долговременного сохранения разнообразных форм рябины мы считаем культивирование растительного материала *in vitro* с применением технологии криосохранения.

Целью работы была интенсификация размножения *in vitro* побегов рябины с помощью оптимизации содержания биологически активных веществ (БАВ) в питательной среде. В работе использовали клоны рябины (Титан, Мичуринская Десертная и Невежинская), которые до начала исследования длительное время сохраняли *in vitro* (более 6 лет). Размноженный растительный материал рябины затем был подготовлен для криосохранения.

Экспериментальные питательные среды соответствовали по минеральному составу среде Мурасиге и Скуга. В качестве БАВ использовали 6-бензиламинопуридин (БАП), тидиазурон (ТДМ) и индолилмасляную кислоту (ИМК). В каждой из трех сред концентрация ИМК была одинаковой (0,5 мг/л). Среда №1 была дополнена 2 мг/л БАП. Среда №2 дополнили смесью БАП (1 мг/л) и ТДМ (0,1 мг/л). Среда №3 содержала 0,2 мг/л ТДМ. Побеги рябины культивировали на этих питательных средах в течение 5 недель. На среде №3 были получены конгломераты со множественными короткими побегами. Коэффициент размножения в этом случае был максимальным и достигал 6. Стоит отметить, что у рябины Десертной этот коэффициент был значительно выше, чем у рябин Титан и Невежинская. Тидиазурон интенсивнее стимулировал образование новых побегов, чем БАП. Похожий эффект наблюдали исследователи из Чехии [2].

В результате на этих питательных средах был получен материал, который мы использовали для криосохранения меристем рябины методом, запатентованным в Институте физиологии растений [3, 4]. После кратковременного сохранения в жидком азоте (-196°C) и оттаивания были зарегистрированы первые признаки посткриогенного восстановления роста рябины *in vitro*.

#### **Источники и литература**

- 1) Chalupa V. Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on in vitro shoot proliferation of *Tilia cordata* MILL., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudoacacia* L. // *Biologia Plantarum*. 1987 29 P. 425–429.
- 2) Máchová P., Malá J., Cvrčková H., Dostál J., Buriánek V. In vitro reproduction of rare and endemic species of rowan tree // *J. For. Sci.* 201(59). P. 386–390.
- 3) Евразийский Патент № 36602
- 4) Патент РФ № 2302107



**Особенности роста и накопления тритерпеновых гликозидов в суспензионных культурах клеток *Panax japonicus* (С.А. Meyer) var. *repens* и *Polyscias fruticosa* (L.) Harms**

**Научный руководитель – Кочкин Дмитрий Владимирович**

**Тюрина Татьяна Михайловна**

*Аспирант*

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

*E-mail: tyurina.tatiana812@gmail.com*

Представители семейства Аралиевые (Araliaceae) широко применяются в традиционной и современной медицине благодаря содержанию разнообразных тритерпеновых гликозидов. В настоящее время использование культур растительных клеток в качестве источника целевых соединений является перспективным, так как плантационное выращивание растений некоторых родов бывает затруднено. Целью работы явилось комплексное исследование влияния гормонального состава питательных сред и систем культивирования на закономерности накопления вторичных метаболитов в процессе роста культур клеток двух представителей семейства Аралиевые. В работе использовали суспензионные культуры клеток *Panax japonicus* (С.А. Meyer) var. *repens* (2 линии) и *Polyscias fruticosa* (L.) Harms, (1 линия), депонированные в коллекции ИФР РАН. Культуры выращивали в колбах и в барботажных биореакторах на 20 л. Ростовые и физиологические характеристики определяли стандартными методами. Качественное и количественное определение содержания тритерпеновых гликозидов в клеточной биомассе и среде культивирования проводили методом УЭЖХ-МС. Изучение динамики роста и особенностей ростовых характеристик исследуемых штаммов в колбах не выявило существенных различий в ростовых параметрах для всех вариантов. Для всех культур клеток *P. japonicus* было показано накопление сложной смеси тритерпеновых гликозидов (гинзенозиды группы протопанаксадиола (PPD) и протопанаксатриола (PPT), малонилированных производных PPD- и PPT-гинзенозидов, гликозидов олеананового ряда), содержание которых в клеточной биомассе и среде культивирования возрастало по мере роста культур до достижения фазы деградации; преобладающими являлись гинзенозиды группы олеаноловой кислоты и группы протопанаксадиола (PPD-группа). Культуры клеток *P. fruticosa* на разных средах накапливали гликозиды только олеананового ряда в концентрациях, не превышающих 1 мг/г сухой массы. При аппаратном культивировании удаление кинетина из состава питательных сред приводило к снижению суммарного содержания гинзенозидов и индивидуальных соединений в клеточной биомассе *P. japonicus* по мере увеличения общей продолжительности аппаратного выращивания. При сравнении содержания индивидуальных гинзенозидов разных групп в образцах биомассы *P. japonicus* при выращивании в колбах и биореакторах замечено повышенное (в 2-3 раза) накопление некоторых индивидуальных гинзенозидов (Rb1, m-Rb1, Rb2, m-Rb2, Rg1, ChIVa) в колбах по сравнению с биореактором. Сравнение содержания индивидуальных гинзенозидов группы олеаноловой кислоты в образцах биомассы *P. japonicus* и *P. fruticosa* в колбах показало заметное преобладание содержания гинзенозидов этой группы над содержанием тритерпеновых гликозидов в культуре полисциас.

## Значение генерации и взаимопревращений АФК на рыльце *Nicotiana tabacum* L. для прорастания пыльцы *in vivo*

Научный руководитель – Брейгина Мария Александровна

*Щекалева Ольга Игоревна*

*Студент (бакалавр)*

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

*E-mail: anny.shirly.ganbatte@gmail.com*

Взаимодействие между мужским гаметофитом и женскими тканями спорофита в програмной фазе оплодотворения является важным аспектом репродуктивной биологии растений. Рецептивная жидкость, образующаяся на спорофите, помимо углеводов, служащих для питания пыльцевого зерна, содержит низкомолекулярные соединения, которые могут играть важную сигнальную роль во взаимодействиях с пыльцой. В нашей работе внимание было сосредоточено на анализе динамики и взаимопревращений АФК в рыльцевом экссудате табака и их роли в прорастании пыльцы *in vivo*.

На первом этапе работы с помощью метода электронного парамагнитного резонанса были получены полуколичественные данные о генерации супероксид анион-радикала на разных стадиях развития цветка. Также мы количественно оценили содержание  $H_2O_2$  в рыльцевом экссудате, собранном с пестиков на разных стадиях развития. При изучении динамики было установлено, что в процессе созревания рыльца, а особенно после опыления уровень генерации  $O_2^{\bullet -}$  снижается, такая же динамика наблюдается в количестве пероксида в экссудате. Образование и взаимопревращение АФК обеспечивают ферменты редокс-метаболизма, основными из которых на рыльце являются НАДФН-оксидаза и супероксиддисмутаза (СОД).

С помощью ингибиторного анализа было показано значение этих ферментов для скорости и эффективности прорастания пыльцевых зёрен и роста трубок *in vivo*, при этом мы использовали флуоресцентную микроскопию и подсчёт семян. Мы установили, что по сравнению с контрольными цветками за 30 минут после опыления ингибитор НАДФН-оксидазы снижает скорость прорастания примерно в 4 раза, а после обработки ингибитором СОД трубки не прорастают. На эффективность оплодотворения ингибитор СОД также оказывает заметное влияние, снижая ее в 1.5 раза.

Зимографическое определение активности супероксиддисмутазы в рыльцах табака на разных стадиях развития пестика и в опыленных цветках после нативного электрофореза позволило изучить динамику активности фермента. Показано, что в ювенильных цветках она ниже, чем на более поздних стадиях развития.

Мы можем заключить, что содержание АФК в рецептивных жидкостях является важным фактором для взаимодействия мужского гаметофита и женских тканей спорофита, влияющим на скорость и эффективность прорастания пыльцевых трубок. Кроме того, полученные данные демонстрируют наличие динамики в содержании АФК и активности СОД на разных этапах развития цветка и после опыления.